

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE

Katedra za zoohigijenu



Vladimir Lj. Drašković

Doktor veterinarske medicine

Uticaj fitogenog aditiva u kontroli proliferativne enteropatije uz procenu proizvodnih rezultata odlučene prasadi prirodno inficirane bakterijom *Lawsonia intracellularis*

Doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of Animal Hygiene



Vladimir Lj. Drašković

Doctor of veterinary medicine

**The influence of a phytogenic additive in the
control of proliferative enteropathy and the
assessment of production results in weaned
pigs naturally infected with *Lawsonia
intracellularis***

PhD Theses

Belgrade, 2021

MENTOR 1:

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za biologiju

MENTOR 2:

Dr Vladimir Kukulj, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za patološku morfologiju

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Nevenka Aleksić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za parazitologiju

Dr Radislava Teodorović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Katedra za zoohigijenu

Dr Božidar Savić, vanredni profesor

Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

Departman za veterinarsku medicinu

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Doktorska disertacija realizovana je zahvaljujući resursima naučnoistraživačkog projekta ev. br. III 46002, kojim je rukovodio prof. dr Zoran Stanimirović, a pod nazivom:

„Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane“

podržano od Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Reublike Srbije u periodu od 2011. do 2019. godine, a od 2020. godine nastavljeno institucionalno finansiranje u okviru naučnoistraživačkog rada Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu po ugovoru ev. br. 451-03-68/2020-14/200143

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici

Uticaj fitogenog aditiva u kontroli proliferativne enteropatije uz procenu proizvodnih rezultata odlučene prasadi prirodno inficirane bakterijom *Lawsonia intracellularis*

Rezime

Uzgoj svinja predstavlja jednu od najvažnijih grana stočarstva. Neadekvatna primena biosigurnosnih mera i loši ambijentalni uslovi, uz prisustvo patogenih prouzrokovaca bolesti, mogu onemogućiti uspešnu proizvodnju svinja. U preko 50% slučajeva enterične bolesti su odgovorne za ograničavanje rentabilne proizvodnje. Jedan od važnih uzročnika koji dovodi do enteričnih poremećaja i velikih ekonomskih gubitaka je i *Lawsonia intracellularis*, obliganta intracelularna Gram negativna bakterija, koja prouzrokuje proliferativnu enteropatiju (PE). „Zlatni standardi“ za identifikaciju *L. intracellularis* su imunohistohemijska i PCR metoda. Razvojem kvantitativne real-time (qPCR) metode omogućeno je rutinsko otkrivanje subkliničkih formi bolesti, a kvantifikovanje uzročnika je omogućilo da se odredi težina kliničke slike inficiranih svinja. Zbog često pogrešne dijagnostike ove bolesti na farmama, posledično prekomerne upotrebe antibiotika i razvoja antimikrobne rezistencije uzročnika, postoji potreba za pronalaženjem alternativnih rešenja u kontroli PE. Takođe, dobre biosigurnosne mere na farmama, za koje je pokazano da pozitivno utiču na zdravlje i proizvodne rezultate svinja, mogu predstavljati bitan faktor u prevenciji nastanka PE. U skladu sa tim cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je ispitivanje uticaja komercijalnog fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE kod odlučene prasadi prirodno inficirane bakterijom *L. intracellularis*, uspostavljanje i optimizacija protokola za molekularnogenetičku identifikaciju bakterije *L. intracellularis*, kao i kvantifikaciju stepena infekcije kod prasadi putem real-time qPCR i IHC metoda. Dodatno je ispitivan i uticaj različitih biosigurnosnih nivoa i Patente Herba® Plus fitogenog aditiva na proizvodne rezultate i broj izlučenih bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi.

Eksperiment je sproveden na četiri različite farme svinja na kojima je određen nivo eksternih, internih i ukupnih biosigurnosnih mera. Na svakoj od farmi (farma BS1, farma BS2, farma BS3 i farma BS4), prasad stara sedam nedelja, ujednačenih telesnih masa, bila je raspoređena u kontrolne grupe koje u hrani nisu dobijale preparat Patente Herba® Plus (K-BS1, K-BS2, K-BS3 i K-BS4) i tretman grupe koje su hrani dobijale preparat Patente Herba® Plus u koncentraciji od 2 kg/t hrane (T-BS1, T-BS2, T-BS3 i T-BS4). Kontrolne i tretman grupe formirane su sa po 72 jединke, raspoređene u devet bokseva sa po osam prasadi, odnosno 144 prasadi po farmi, ukupno 576 prasadi. Za potrebe histoloških analiza izveden je eksperiment sa individualno gajenom prasadi, po šest u kontrolnoj i tretman grupi. Tokom 28 dana eksperimenta (0., 14. i 28. dan) uzimani su uzorci fecesa za molekularnogenetička ispitivanja,

praćeni su proizvodni rezultati prasadi (telesna masa, dnevni i ukupni prorast, dnevna i ukupna konzumacija i konverzija), dok na kraju eksperimenta su uzimani uzorci ileuma za histološke (mikroskopske promene i histomorfometrijski parametri) i imunohistohemijske analize (ekspresija antigena *L. intracellularis*).

Na sve četiri farme, u okviru eksternih biosigurnosnih mera, najbolje su bile ocenjene potkategorije koje se odnose na kupovinu životinja i semena i zaposlene i posetioce, dok najniže ocene su dobile biosigurnosne mere koje se odnose na hranu, vodu i opremu. U okviru internih biosigurnosnih mera potkategorije kontrola bolesti i prasilište i period dojenja bile su najbolje ocenjene na farmama, a najlošije su bile ocenjene biosigurnosne mere koje se odnose na čišćenje i dezinfekciju, odgajivalište i mere između odeljaka i korišćenje opreme. Ukupne vrednosti biosigurnosnih mera na sve četiri farme (BS 1 60%, BS 2 64%, BS 3 77% i BS 4 86%) koje su analizirane u ovoj doktorskoj disertaciji bile su više od prosečnih vrednosti biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji (58%) i svetu (64%), izuzev farme BS 1 čija ocena ukupnih biosigurnosnih mera je bila niža u poređenju sa prosečnim vrednostima u svetu (60%).

Na farmi BS1 utvrđen je značajno manji broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tretman grupe u odnosu na kontrolnu grupu 14. i 28. dana eksperimenta ($P=0,0080$ i $P=0,0015$, pojedinačno). Takođe, prasad tretman grupe imala je značajno manji broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu 14. i 28. dana u odnosu na 0. dan eksperimenta ($P<0,0001$). Na farmi BS 2 uočen je značajan pozitivan efekat preparata Patente Herba® Plus u hrani tretman grupe prasadi na broj bakterija *L. intracellularis* 14. i 28. dana ogleđa u odnosu na kontrolnu grupu ($P=0,0470$ i $P=0,0176$, pojedinačno), dok nije uočena značajna razlika u broju bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tretman grupe tokom trajanja eksperimenta ($P=0,6174$). Na farmama BS 3 i BS 4 nije uočena razlika između kontrolne i tretman grupe prasadi u broju bakterija *L. intracellularis* za sva tri ispitivana perioda ($P>0,05$), niti je uočen značajan pad broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tretman grupa tokom trajanja ogleđa ($P>0,05$).

Uočena je značajna negativna korelaciona zavisnost ($r=-0,664$, $P<0,01$) između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi i biosigurnosnih nivoa farmi, dok nije utvrđena značajna korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. intracellularis*, tretmana fitogenim aditivom i dužine trajanja tretmana ($P>0,05$).

Histološke promene na preparatima ileuma kontrolne i tretman grupe prasadi su deskriptivno analizirane, dok je histomorfometrijskim ispitivanjima pokazano da su u tretman grupi prasadi kripte bile značajno pliće ($P=0,0284$), a odnos visina resica/dubina kripte značajno veći ($P=0,0040$) nego u

kontrolnoj grupi. Nije uočen efekat dodavanja fitogenog aditiva u hrani prasadi na visinu resica ($P=0,0607$), širinu resica ($P=0,0728$), površinu resica ($P=0,7676$) i broj peharastih ćelija/100 enterocita ($P=0,0575$).

Semikvantitativnom analizom, na osnovu imunohistohemijskih nalaza, 33,33% uzoraka ilealnog tkiva tretman grupe prasadi bilo je ocenjeno ocenom 0, a preostalih 66,67% ocenom 1, dok je u kontrolnoj grupi 50% uzoraka bilo ocenjeno ocenom 1, 33,33% ocenom 2, a 16,67% uzoraka ocenom 3.

Primena fitogenog aditiva u hrani nije značajno uticala na telesnu masu prasadi nakon 28 dana eksperimenta na svim ispitivanim farmama ($P>0,05$). Ukupni i dnevni prirast prasadi tretman grupe bio je značajno veći na farmi BS 2 u poređenju sa kontrolnom grupom ($P=0,0349$ i $P=0,0345$, pojedinačno), dok na farmama BS 1, BS 3 i BS 4 razlike u ukupnom i dnevnom prirastu tretman i kontrolne grupe nisu uočene ($P>0,05$). Najbolji prirast je postigla grupa koja je u hrani dobijala preparat Patente Herba® Plus na farmi BS 4, koji je bio značajno viši u poređenju sa K-BS1, K-BS2 i T-BS2 grupom prasadi ($P<0,0001$).

Na kraju eksperimenta (28. dan) nije uočena razlika u ukupnoj i dnevnoj konzumaciji hrane između kontrolne i tretman grupe prasadi u okviru svake farme ($P>0,05$). Značajno bolja konverzija tretman grupe prasadi u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je na farmi BS 1 ($P=0,0121$), dok na drugim farmama nije uočena razlika u konverziji hrane prasadi kontrolne i tretman grupe ($P>0,05$).

Dvofaktorijalnom analizom varijanse utvđen je značajan efekat primene preparata Patente Herba® Plus i biosigurnosnih nivoa farmi na ukupan i dnevni prirast prasadi ($P<0,05$). Biosigurnosni nivoi na farmama su značajno uticali i na ukupnu i dnevnu konzumaciju hrane ($P=0,0435$ i $P=0,0434$, pojedinačno), dok je dodavanje Patente Herba® Plus u hrani prasadi imalo i značajan efekat na konverziju ($P=0,0046$). Nije uočen značajan uticaj interakcije ova dva parametra na ukupni i dnevni prirast, ukupnu i dnevnu konzumaciju i konverziju hrane prasadi tokom ogleđa ($P>0,05$).

Ključne reči: *Lawsonia intracelularis*, fitogeni aditiv, biosigurnosne mere, real-time qPCR, imunohistohemija, histomorfometrija, ileum, prasad

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Zoohigijena, Veterinarska genetika, Biotehnologija, Patološka morfologija, Bolesti svinja

UDK broj: 619:579.84:636.4

The influence of a phytogenic additive in the control of proliferative enteropathy and the assessment of production results in weaned pigs naturally infected with *Lawsonia intracellularis*

Summary

Pig breeding is one of the most important branches of animal husbandry. Inadequate application of biosecurity measures and poor environmental conditions, in the presence of pathogens, could disable successful pig production. In over 50% of cases, enteric diseases could effect profitable production. One of the important enteric pathogens associated with large economic losses is *Lawsonia intracellularis*, an obligate intracellular Gram-negative bacterium, which causes proliferative enteropathy (PE). The “gold standards” for identifying *L. intracellularis* are immunohistochemical and PCR methods. The development of the quantitative real-time (qPCR) method enabled the routine detection of subclinical forms of the disease, and the quantification of the bacteria gives the possibility to determine the severity of the clinical symptoms in infected pigs. Since this infection is often misdiagnosed on pig farms, this results in excessive use of antibiotics and the ability of bacteria to develop resistance to antimicrobial agents. Therefore, it is necessary to find alternative solutions in PE control. Also, good biosecurity measures on farms, for which it is shown to have positive effect on health and production results of pigs, can be an important factor in the prevention of PE. Accordingly, the aim of this doctoral dissertation was to investigate the effect of commercial phytogenic additive (Patente Herba® Plus) in PE control in weaned piglets naturally infected with *L. intracellularis*, to establish and optimize protocols for molecular genetic identification of *L. intracellularis*, as well as to quantify the degree of infection in piglets via real-time qPCR and IHC methods. Additionally, the effect of different biosecurity levels and Patente Herba® Plus phytogenic additive on the production results and the number of excreted *L. intracellularis* in the faeces of piglets were investigated.

The experiment was conducted on four different pig farms on which the levels of external, internal and total biosecurity measures were determined. On each of the farms (farm BS1, farm BS2, farm BS3 and farm BS4), seven-week-old piglets of uniform body weight were assigned to control groups that did not receive Patente Herba® Plus (K-BS1, K-BS2, K-BS3 and K-BS4) and the treatment groups that received Patente Herba® Plus in their feed at a concentration of 2 kg/t feed (T-BS1, T-BS2, T-BS3 and T-BS4). Control and treatment groups consisted of 72 piglets each, distributed in nine pens with eight piglets each, i.e. 144 piglets per farm, a total of 576 piglets. For histological analyzes, an additional experiment with individually reared piglets was performed, which consistet of six piglets in each, control and treatment group. During the 28 days of the experiment (days 0, 14, and 28) faeces samples

were taken for molecular genetic analysis, the production results of piglets (body weight, daily and total weight gain, daily and total consumption and feed conversion ratio) were monitored, while at the end of the experiment ileum samples were taken for histological (microscopic changes and histomorphometric parameters) and immunohistochemical analyzes (*L. intracelullaris* antigen expression).

On all four farms, within the external biosecurity, the subcategories related to the purchase of animals and semen and personnel and visitors were rated the best, while the biosecurity measures related to the feed, water and equipment supply were rated the lowest. Within the internal biosecurity, the subcategories of disease management and farrowing and suckling period had the highest score on farms, while the lowest score had biosecurity measures related to cleaning and disinfection, nursery unit and measures between compartments and use of equipment. The total biosecurity values of all four examined farms (BS 1 60%, BS 2 64%, BS 3 77% and BS 4 86%) in this doctoral dissertation were higher than the average biosecurity values on farms in Serbia (58%) and in the world (64%), with exception of farm BS 1 where total biosecurity value was lower compared to the average values in the world (60%).

On the farm BS1, a significantly lower number of *L. intracellularis* was found in the faeces of piglets in the treatment group compared to the control group on days 14 and 28 of the experiment ($P=0.0080$ and $P=0.0015$, respectively). Also, the piglets of the treatment group had a significantly lower number of *L. intracellularis* in the faeces on days 14 and 28 compared to day 0 of the experiment ($P<0.0001$). On the farm BS 2, a significant positive effect of Patente Herba[®] Plus in the feed on the number of *L. intracellularis* in the treatment group of piglets was observed on the 14th and 28th day of the experiment in relation to the control group ($P=0.0470$ and $P=0.0176$, respectively), while in the treatment group alone no significant difference was observed in the number of *L. intracellularis* in the faeces of piglets during the experiment ($P=0.6174$). On the farm BS 3 and BS 4, there were no significant difference between the control and treatment groups of piglets in the number of *L. intracellularis* in faeces for all three examined periods ($P>0.05$), also a significant decrease in the number of *L. intracellularis* in the faeces of piglets in the treatment groups during the experiment was not observed ($P>0.05$).

A significant negative correlation was determined ($r=-0.664$, $P<0.01$) between the number of *L. intracellularis* in faeces and on-farm biosecurity levels, while no significant correlation was found between the number of *L. intracellularis* in faeces, the phytogenic additive treatment and the treatment duration ($P>0.05$).

Histological changes on ileum preparations of the control and the treatment groups of piglets were descriptively analyzed, while histomorphometric examinations showed that in the treatment group the crypts were significantly shallower ($P=0.0284$) and the villus height/crypt depth ratio significantly higher ($P=0.0040$) than in the control group. No effect of the addition of phytogenic additive was observed in piglet feed on villus height ($P=0.0607$), villus width ($P=0.0728$), villus surface area ($P=0.7676$) and the number of goblet cells/100 enterocytes ($P=0.0575$).

Using semiquantitative analysis, based on immunohistochemical findings, 33.33% of ileal tissue samples of the treatment group piglets were rated with a grade 0, and the remaining 66.67% with a grade 1, while in the control group 50% of samples were rated with a grade 1, 33.33% with grade 2, and 16.67% of samples with grade 3.

The use of phytogenic additive in feed did not significantly affect the body weight of piglets after 28 days of the experiment on all tested farms ($P>0.05$). The total and daily weight gain of piglets in the treatment group was significantly higher compared to the control group on the farm BS 2 ($P=0.0349$ and $P=0.0345$, respectively), while on farms BS 1, BS 3 and BS 4 the differences in total and daily weight gain in treatment and control groups of piglets were not observed ($P>0.05$). The best weight gain was achieved in the group that received the preparation Patente Herba® Plus in feed on farm BS 4, which was significantly higher compared to K-BS1, K-BS2 and T-BS2 group of piglets ($P<0.0001$).

At the end of the experiment (day 28), no differences in total and daily feed consumption were observed between the control and treatment groups of piglets within each farm ($P>0.05$). Significantly better feed conversion ratio of piglet in the treatment group compared to the control was found on farm BS 1 ($P=0.0121$), while on other farms no differences were observed in the feed conversion ratio of piglets in control and treatment groups ($P>0.05$).

Two-way analysis of variance revealed a significant effect of the application of Patente Herba® Plus and biosecurity levels of farms on the total and daily weight gain of piglets ($P<0.05$). Biosecurity levels on farms significantly affected both total and daily feed consumption ($P=0.0435$ and $P=0.0434$, respectively), while the addition of Patente Herba® Plus in piglet feed also had a significant effect on feed conversion ratio ($P=0.0046$). No significant influence of the interaction of these two parameters on the total and daily weight gain, total and daily feed consumption and feed conversion ratio during the experiment was found ($P>0.05$).

Key words: *Lawsonia intracelularis*, phytogenic feed additives, biosecurity measures, real-time qPCR, immunohistochemistry, histomorphometry, ileum, piglets

Scientific field: Veterinary Medicine

Field of academic expertise: Animal hygiene, Biotechnology, Veterinary Genetics, Pathological morphology, Swine disease

UDK number: 619:579.84:636.4

Sadržaj:

1. Uvod	1
2. Pregled literature	3
2.1. Svinjarstvo u svetu i Republici Srbiji	3
2.2. Biosigurnost kao disciplina u okviru zootehničkih i zoohigijenskih mera u stočarskoj proizvodnji	4
2.2.1. Biosigurnosne mere	5
2.2.1.1. Eksterne biosigurnosne mere	7
2.2.1.2. Interne biosigurnosne mere	14
2.3. Enterične bolesti svinja	18
2.4. <i>Lawsonia intracellularis</i> uzročnik proliferativne enteropatije (PE) svinja	21
2.5. Mikrobiom creva i <i>L. intracellularis</i>	30
3. Cilj i zadaci ispitivanja	35
4. Materijal i metode	36
4.1. Materijal	36
4.1.1. Formiranje grupa i postavka terenskog eksperimenta	36
4.2. Metode	40
4.2.1. Procena biosigurnosnih mera na farmama svinja	40
4.2.2. Molekularnogenetička identifikacija i kvantifikacija DNK <i>L. intracellularis</i>	40
4.2.2.1. Ekstrakcija DNK <i>L. intracellularis</i> iz fecesa	41
4.2.2.2. Real-time qPCR analiza	42
4.2.3. Histološka ispitivanja	44
4.2.3.1. Histomorfometrijska analiza.	44
4.2.3.2. Imunohistohemijska (IHC) metoda.	44
4.2.3.3. Semikvantitativna analiza.	45
4.2.4. Praćenje proizvodnih rezultata.	46
4.3. Statistička analiza.	46
5. Rezultati ispitivanja	48
5.1. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 1	48
5.2. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 2	51
5.3. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 3	55
5.4. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 4	59
5.5. Uporedni prikaz eksternih biosigurnosnih nivoa na četiri farme	63
5.6. Uporedni prikaz internih biosigurnosnih nivoa na četiri farme	64
5.7. Ukupne vrednosti biosigurnosnih mera	66
5.8. Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE	66
5.9. Korelaciona zavisnost broja bakterija <i>L. intracellularis</i> u fecesu, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana	69
5.10. Mikroskopske promene, histomorfometrijska i imunohistohemijska analiza ileuma prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus	70
5.11. Uticaj fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima tokom 28 dana eksperimenta	75
5.12. Uticaj tretmana i biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate prasadi	79
6. Diskusija	80
6.1. Biosigurnosne mere na farmama	80
6.2. Efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmama različitim biosigurnosnih nivoa	81
6.3. Korelaciona zavisnost broja bakterija <i>L. intracellularis</i> u fecesu, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana	86
6.4. Mikroskopske promene, histomorfometrijska i imunohistohemijska analiza ileuma prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus	89
6.5. Uticaj fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima tokom 28 dana eksperimenta	90
6.6. Uticaj tretmana i biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate prasadi	97

7. Zaključci	101
8. Spisak literature	103
9. Prilozi	132
Prilog A	132

1. Uvod

Sa porastom broja stanovnika na zemlji poslednjih decenija rasla je i potreba za proizvodnjom namirnica animalnog porekla. Od 1970. godine u zemljama u razvoju proizvodnja mesa je zabeležila prosečni godišnji rast od 5,1%, a širenje urbanih područja je bio jedan od glavnih razloga koji je doveo do ovog rasta. Uzgoj svinja, kako s društveno-ekonomskog, tako i sa biološko-zootehničkog stanovišta, predstavlja značajnu granu stočarstva. Svinjsko meso i pored kulturoloških i verskih ograničenja jedno je od najviše konzumiranih vrsta mesa, kako u svetu, tako i u Srbiji. Istraživanja ukazuju da u zemljama u razvoju potrošnja hrane životinjskog porekla po glavi stanovnika raste. Veća proizvodnja vođena potražnjom može se obezbediti intenziviranjem proizvodnje, odnosno uzgojem životinja visokog genetskog potencijala u objektima koji zadovoljavaju njihove fiziološko-proizvodne potrebe. Intenzivan uzgoj svinja na farmama omogućava odvojeno držanje različitih starosnih i proizvodnih kategorija svinja, primenu biosigurnosnih mera i adekvatnu ishranu i napajanje velikog broja životinja. Kako se poslednjih godina industrijalizovala proizvodnja hrane za životinje, potpune krmne smeše bi trebalo da zadovoljavaju hranidbene potrebe različitih kategorija svinja. Međutim, ukoliko se ne primenjuje pravilan način ishrane, kao i ukoliko se ne sprovedu odgovarajuće biosigurnosne mere i optimalni ambijentalni uslovi, stvaraju se preduslovi za pojavu i razvoj određenih patoloških stanja.

Narušavanje zdravstvenog stanja svinja ograničava uspešnu i održivu proizvodnju. Učestalo pojavljivanje bolesti, dužina trajanja kliničkih simptoma i nepovoljan ishod razlozi su direktnih i indirektnih troškova u proizvodnji. U najvećem broju slučajeva radi se o enteričnim bolestima koje predstavljaju velike probleme u svinjarstvu širom sveta. Enterične bolesti mogu biti bakterijske, virusne ili parazitske etiologije. Od bakterijskih uzročnika najčešće se javljaju *Lawsonia intracellularis* i *Brachyspira* spp., dok se kod svinja ređe javlja *Salmonella* spp.

L. intracellularis je obligatna intracelularna Gram negativna bakterija koja izaziva proliferativnu enteropatiju (PE), poznatu pod nazivima ileitis ili intestinalna adenomatoza. Uprkos tome što je opisana kod mnogih vrsta sisara i ptica, uključujući konje, jelene, pse, lisice, feretke, zečeve, morske prasiće, pacove, emue, nojeve i druge životinjske vrste, ipak nije potvrđena kod ljudi. *L. intracellularis* prvenstveno napada epitelne ćelije crevnih kripti, što dovodi do njihove hiperplazije i proliferacije. To rezultira zadebljanjem crevne sluznice kaudalnog dela tankog creva, ileuma, ali mogu biti zahvaćena i debela creva. Infekcija dovodi do anoreksije, dijareje, slabog rasta i, ponekad, do iznenadne smrti. Bakterija se uglavnom prenosi sa zaraženih na zdrave životinje feko-oralnim putem. U fecesu uzročnik može opstati i do 14 dana.

Efikasna kontrola PE uključuje antimikrobnu terapiju i vakcinaciju. Međutim, prekomerna upotreba antibiotika može dovesti do razvoja antimikrobne rezistencije kod ljudi i životinja. Pored toga, primena antibiotika u lečenju životinja mogu uticati na pojavu rezistentnih bakterija u namirnicama animalnog porekla. To je jedan od razloga zašto je upotreba antibiotika kao promotora rasta u hrani za životinje zabranjena u Evropskoj uniji (EU) od 2006. godine. S druge strane, smanjena profilaktička upotreba dovela je do povećanja terapijske upotrebe antimikrobnih sredstava, uključujući one lekove efikasne u kontroli infekcije prouzrokovane bakterijom *L. intracellularis*. Iz navedenih razloga, od velike je važnosti utvrditi i obezbediti alternativne metode u kontroli PE.

Fitogeni aditivi, koji su opšteprihvaćeni kao bezbedni, smatraju se dobrim alternativnim sredstvom u kontroli enteričnih bolesti bakterijske etiologije. Zbog svog uticaja na zdravstveni status i proizvodne rezultate, fitogeni aditivi se definišu kao proizvodi biljnog porekla koji se dodaju stočnoj hrani radi poboljšanja produktivnosti životinja. Pored toga, implementacija visokih nivoa biosigurnosnih mera utiče na poboljšanje produktivnosti i zdravstvenog statusa životinja, što dovodi do smanjene upotrebe antibiotika.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Svinjarstvo u svetu i Republici Srbiji

Uzgojem životinja ostvaruje se proizvodnja namirnica animalnog porekla kojima se zadovoljavaju potrebe u ishrani za skoro milijardu ljudi na zemlji (FAO, 2009; FAO, 2011). Poslednjih decenija primetna je povećana potrošnja hrane životinjskog porekla (Alexandratos i Bruinsma, 2012). Kako se sve više šire urbana područja, raste broj stanovnika i povećavaju njihovi prihodi, tako se stvaraju preduslovi koji omogućavaju da stočarstvo bude jedan od najbrže rastućih sektora u poljoprivredi (FAO, 2009). Uzgoj svinja, zbog dobro poznatih činjenica: intenzivnog prirasta, dobrog iskorišćavanja hrane, skladne strukture masnog i mišićnog tkiva i visoke plodnosti, predstavlja veoma važnu granu stočarstva, kako sa ekonomskog, tako i sa biološko-zootehničkog stanovišta, dok proizvodnja svinjskog mesa ima izuzetno važno mesto na svetskom tržištu (Radojković i sar., 2010). U 2014. godini u svetu je potrošeno 115,5 miliona tona svinjskog mesa, što ga čini jednim od najviše konzumiranih vrsta mesa na svetu (FAO, 2014).

Svinjarstvo u ukupnoj stočarskoj proizvodnji u Srbiji u 2018. godini je zabeležilo proizvodnju od 2 782 000 svinja, dok je organska proizvodnja u svinjarstvu učestvovala sa 284 svinja i obuhvatila je proizvođače sertifikovane za organsku proizvodnju i njihove kooperante. Međutim, prema Saopštenju Republičkog zavoda za statistiku Republike Srbije (RZS, 2020) u 2019. godini u odnosu na desetogodišnji prosek od 2009. do 2018. godine ukupan broj svinja smanjen je za 9,1%, goveda za 2,5% i živine za 13,1%, a jedino se uvećao broj ovaca za 0,7%. Ako se posmatra proizvodnja mesa u Srbiji u 2018. godini, ubedljivo je najzastupljenija proizvodnja svinjskog mesa sa 58,61%, zatim živinsko meso sa 20,50%, goveđe meso sa 14,70% i ovčije meso sa 6,19% (RZS, 2019).

Povećanje broja životinja nije ravnomerno raspoređeno širom sveta, pa tako Azija beleži najveći rast broja svinja, dok se broj svinja u Severnoj Americi i Evropi povećava nešto sporije ili se broj životinja održava na istom nivou. U Africi se broj svinja u poslednje vreme konstantno povećava, što se ogleda u proširenju uzgoja svinja na delovima kontinenta gde su se tradicionalno preživari uzgajali. Poslednjih decenija komercijalna proizvodnja svinja se znatno intenzivirala. Sve veći broj mesnatih rasa svinja se uzgaja na manjem broju farmi, ali se proizvodnja povećala zbog njihovih proizvodnih osobina. Veliki proizvodni sistemi postigli su visok nivo uniformnosti, jer se baziraju na istom genetskom materijalu, izbalansiranim obrocima i odgovarajućim smeštajnim kapacitetima koji su prilagođeni tipu

eksploatacije. Međutim, svaka pojava bolesti uzrokuje velike ekonomske štete, kako kod proizvođača svinja, tako i kod srodnih industrija, a pre svega industrije mesa (FAO, 2012).

Sprečavanje unošenja i prenošenja patogena čini osnovu biosigurnosnih mera i predstavlja temelj moderne veterinarske delatnosti u svinjarskoj proizvodnji. Iskorenjivanje bolesti sa farmi svinja cilj je svakog uzgajivača, iako se to retko postiže. Na sreću, kroz proces eliminisanja bolesti, smanjuje se prevalenca bolesti, mogućnost prenošenja, a često i sama jačina bolesti. Sa širenjem terorizma, koji je globalna bezbedonosna pretnja, i izbijanjem velikih žarišta bolesti, uključujući pojavu novih zoonotskih patogena, biosigurnosne mere sve više dobijaju na značaju. Uz ogromne potencijalne gubitke povezane sa bolestima životinja, dolazi se do zaključka da je važnost strogog sprovođenja biosigurnosnih mera od ključnog značaja za uspešnu i rentabilnu proizvodnju (Neumann, 2012). Odnosno, sprovođenje odgovarajućih biosigurnosnih mera, kojima se sprečava unošenje i širenje patogena, ključni je faktor koji omogućava nesmetani promet svinja i ekonomsku održivost svinjarske proizvodnje (Simon-Grifé i sar., 2013).

2.2. Biosigurnost kao disciplina u okviru zootehničkih i zoohigijenskih mera u stočarskoj proizvodnji

Pojam biosigurnosti u stočarskoj proizvodnji u literaturi se prvi put pojavio tokom devedesitih godina prošlog veka. Tada je više autora pokušalo da se usaglasi oko definicije pojma i okvira delatnosti biosigurnosti kao discipline (England 2002; Pyburn 2001). Ovom temom, otprilike u isto vreme, bavili su se i Amass i Clark. (1999) koji su potvrdili niz faktora koji utiču na efikasnost sprovođenja biosigurnosnih mera, a koji su se odnosili na već postojeće postupke koje su preporučivali veterinari na farmama. Amass i sar. (2000) su pokrenuli niz inovativnih istraživanja za dokazivanje efikasnosti biosigurnosnih mera, kao i istraživanja kojima je utvrđena efikasnost često korišćenih dezinfekcionih sredstava i načina njihove primene (Amass, 2004a), a istraživanja koja su za cilj imala razumevanje uloge ljudi, opreme i objekata u procesu prenošenja bolesti (Amass i sar., 2003a-c).

Adekvatna primena biosigurnosnih mera u velikoj meri zavisi od razvijene svesti uzgajivača, odnosno njihovog poznavanja zaraznih bolesti, kao i načina njihovog sprečavanja. Istraživanja sprovedena u Velikoj Britaniji među uzgajivačima različitih životinjskih vrsta ukazala su da uzgajivači imaju negativan stav prema biosigurnosnim merama i da nisu svesni značaja i ekonomske koristi koju mogu da ostvare usvajanjem biosigurnosnih mera (Gunn i sar., 2008). Postoji više razloga koji objašnjavaju ovaj problem, a to su: nedostatak poverenja uzgajivača u efikasnost biosigurnosnih mera, nedostatak

znanja, ekonomski trošak prilikom sprovođenja ovih mera, dodatni rad koji zahtevaju primene ovih mera i odbojnost prema obaveznim pravilima koja se moraju poštovati (Gunn i sar., 2008, Fraser i sar., 2010, Kristensen i Jakobsen, 2011). Stoga veterinari imaju ključnu ulogu u obuci i edukaciji uzgajivača i za većinu njih predstavljaju glavni izvor informacija (Gunn i sar., 2008).

Biosigurnosne mere imaju veoma važnu ulogu u sprečavanju unošenja patogena, kao i njegovom širenju unutar farme (Barceló i Marco, 1998; Amass, 2005a). Međutim, ne postoji univerzalni biosigurnosti protokol koji je primenjiv za sve farme i kojim bi se smanjio rizik od unošenja infekta na farmu. Svaka farma je jedinstvena celina u pogledu samog objekta, lokacije, menadžmenta (upravljanje farmom), prijemčivosti domaćina i drugih faktora. Prema tome, biosigurnosne mere predstavljaju kontinuirani proces koji primenjuje protokole prema potrebama i troškovima, procenjuje rizike i efikasnost primenjenih mera i menja procedure koje čine kritične tačke u proizvodnji (Amass, 2005a).

2.2.1. Biosigurnosne mere

Biosigurnosne mere se definišu kao primena mera kojima se smanjuje rizik od unošenja i širenja patogena na farmi. Zahteva usvajanje niza stavova i ponašanja kako bi se smanjili rizici u svim aktivnostima koje uključuju domaće, egzotične i divlje životinje kao i njihove proizvode (FAO, 2008).

Biosigurnosne mere imaju ključnu ulogu u borbi protiv izazova koje prete intenzivnom uzgoju svinja (Filippitzi i sar., 2017; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Takvi izazovi predstavljaju pre svega bolesti koje se pojavljuju usled nedostataka ili pogrešno postavljenih biosigurnosnih mera, uključujući afričku kugu svinja, klasičnu kugu svinja, slinavku i šap, Aujeckijevu bolest, virusni epidemični proliv svinja, kao i mnoge druge bolesti (Amass i sar., 2004; Ellis-Iversen i sar., 2011; Lowe i sar., 2014; Bellini i sar., 2016; Milicevic i sar., 2016; Kim i sar., 2017; Hayama i sar., 2020). Pored toga, održavanje visokog nivoa biosigurnosnih mera dovodi do poboljšanja produktivnosti i zdravlja životinja i smanjuje potrebu za lečenjem životinja i upotrebe antibiotika (Laanen i sar., 2013; Postma i sar., 2016). Visok nivo antimikrobne rezistencije na različite antibiotike kod komensalnih bakterija tovnih svinja primećen je u nekoliko evropskih zemalja, što dodatno naglašava potrebu za biosigurnosnim merama (Chantziaras i sar., 2014; Chantziaras i sar., 2020).

Kako bi se bolje razumeo koncept i značaj biosigurnosnih mera one su podeljene u dve grupe: eksterne (spoljašnje) biosigurnosne mere i interne (unutrašnje) biosigurnosne mere. Eksterne biosigurnosne mere obuhvataju primenu mera za sprečavanje unošenja patogena na farmu, dok interne biosigurnosne mere obuhvataju primenu mera koje imaju za cilj sprečavanje širenja patogena unutar farme.

Biosigurnosne mere se zasnivaju na poznavanju načina prenošenja bolesti, trajanja infektivnog perioda, glavnih puteva širenja patogena, kao i dužine opstanka patogena u spoljašnjoj sredini (FAO/OIE, 2010).

Tip farme u funkciji biosigurnosnih mera. Unošenje i širenje patogena na farmi značajno je olakšano gajenjem različitih životinjskih vrsta. Uzgoj goveda, ovaca ili živine na razdaljini manjoj od 100 m predstavlja ogroman rizik za prenošenja infektivnih agenasa (Alexander i Harris, 1992).

Veličina farme, takođe, može predstavljati biosigurnosni rizik. Smatra se da što je veći zapat, veći je i rizik od unošenja infektivnih agenasa na farmu (Moore, 1992). Uočeno je da je sa većim zapatom veći rizik od prenošenja infekcije, s obzirom da je veći broj životinja, pa samim tim i veće šanse za uspostavljanje kontakta između životinja (Correia-Gomes i sar., 2012). Nasuprot tome, smatra se da se velikim farmama može, prilično, efikasno upravljati, pridržavajući se dobre odgajivačke prakse i poštovanjem principa mera „sve unutra - sve napolje“ (all in/all out), što omogućava lakšu kontrolu pojave određenih patogena (Andres i Davies, 2015). Prema rezultatima Van der Wolf i sar. (2001) uočeno je da *Salmonella* može biti češće prisutna u malim i srednjim zapatima nego u velikim zapatima, zbog činjenice da velike farme mogu implementirati viši nivo biosigurnosnih mera. Slični rezultati uočeni su u istraživanju Laanen i sar. (2013) koji su takođe ustanovili da se biosigurnosne mere bolje implementiraju na većim farmama. Međutim, može se doći do pogrešnog zaključka ukoliko se analizira samo veličina farme. Treba uzeti u obzir i ostale parametre kao što su broj objekata na farmi, gustina bokseva, kontakt svinja između susjednih bokseva, nivo stresa na farmi, kupovina životinja, režim ishrane i drugi parametri koji mogu imati ogroman uticaj. Pritom svi ovi parametri su veoma promenljivi između farmi slične veličine (Wong i sar., 2004; García-Feliz i sar., 2009; Andres i Davies, 2015). Veličina farme može se dovoditi u vezu i sa različitim načinima upravljanja (menadžmentom) koji mogu povećati rizik. Veće farme nekada mogu biti primorane da nabave prasid iz drugih zapata, što zahteva učestali transport životinja, a samim tim i više rizika za unos patogena, dok uzgajanjem vlastitih životinja za priplod mogu se prevenirati ti rizici (Boklund i sar., 2004).

U funkciji biosigurnosti na farmama od izuzetnog značaja je i pristup farmi. Kontakt sa farmom se ostvaruje pristupnim saobraćajnicama koje povezuju farmu sa klanicama, preduzećima za sakupljanje đubriva, dobavljačima hrane za životinje, kafilerijama i sve ovo predstavlja potencijalni rizik od unosa određenih patogena na farmu, pa se preporučuje da farma bude udaljena od ovih objekata (Pritchard i sar., 2005). Farme svinja će svakako morati da transportuju životinje do klanice, ali ako se klanice nalaze na udaljenosti manjoj od 1 km utoliko je veći rizik za prenos određenih bolesti, dok se rizik

značajno smanjuje ukoliko su klanice udaljene na razdeljini većoj od 5 km. Takođe se velikim rizikom smatra i ako je udaljenost od farme do kafilerije manja od 2 km (Barceló i Marco, 1998). Glavne saobraćajnice i magistralni putevi treba da budu relativno udaljeni od farme, a farma treba da obezbediti pristup kamionima, i to na obodu fame, kako transporna vozila ne bi ulazila u krug farme (Morillo Alujas, 2005). Velikim rizikom za prenos respiratornih infekcija, koje se prenose posredstvom vazduha, smatraju se saobraćajnice sa velikim tranzitom svinja ukoliko su udaljene manje od 50 metara od farme, dok udaljenost od 400 do 800 m smanjuje ovaj rizik (Barceló i Marco, 1998).

Putevi prenošenja patogena u funkciji biosigurnosnih mera. Nisu svi putevi prenošenja patogena jednako važni za biosigurnosnu bezbednost farmi. Stoga nije lako klasifikovati sve puteve prema njihovom značaju prenošenja. Razlog uglavnom leži u činjenici da postoje velike razlike među infektivnim agensima u pogledu njihove infektivnosti, kao i dužine opstanka u spoljašnjoj sredini. Takođe je poznato da ne doprinose sve biosigurnosne mere na isti način prevenciji različitih infektivnih bolesti (Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Direktni kontakt između životinja smatra se glavnim prenosnim putem infektivnih agenasa. Stoga se više pažnje posvećuje biosigurnosnim merama kojima se sprečava direktan kontakt između životinja, nego merama preduzetim za sprečavanje indirektnog prenosa, putem opreme ili ljudi (Amass, 2003; Amass, 2004b; Pritchard i sar., 2005; Amass i Baysinger, 2006; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Takođe, važan faktor je učestalost kojom patogen može zaraziti populaciju životinja na određenom mestu. Tako da manje važan put prenošenja patogena može postati veoma važan onog trenutka kada se više puta stvore uslovi za ulaz patogena na farmi (Fèvre i sar., 2006; Laanen i sar., 2013).

2.2.1.1. Eksterne biosigurnosne mere

Eksterne biosigurnosne mere odnose se na: kupovinu životinja i semena, transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja, hranu vodu i opremu, kontrolu zaposlenih i posetilaca, kontrolu štetočina i ptica i lokaciju farme.

Kupovina životinja i semena. Nabavljanje svinja ili kupovina semena predstavlja značajan rizik za već prisutne svinje na farmi koje još uvek nisu razvile imunitet protiv potencijalno unetih infektivnih agenasa (Filippitzi i sar., 2017). Inficirane svinje mogu izlučivati patogene preko sekreta i eksekreta (feces, urin, pljuvačka, sperma, krv). Kada je prijemčiva životinja izložena tim infektivnim agensima ili kada postoji direktan kontakt između dve životinje, patogeni se lako mogu preneti sa jedne na drugu životinju (Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Potpuno zatvoren sistem proizvodnje ima znatno niži rizik od unošenja bolesti, jer se u tim zaptima svinja ne uvode nove životinje (Amass, 2005a). Wong i sar. (2004) su ustanovili da nabavka svinja sa više od tri farmi predstavlja rizik za unošenje patogena na farmu. Slično ovome, rezultati istraživanja od strane Correge i sar. (2009) su ukazali da na farmama za tov svinja, snabdevanje odlučenom prasadi sa dve ili više farmi predstavlja faktor rizika za pojavu bolesti. Rizik od prenosa patogena se povećava sa nabavljanjem većeg broja novih životinja (Fèvre i sar., 2006; Laanen i sar., 2013). Tako da Dewulf i Van Immerseel, (2019) navode da je od velike važnosti ograničiti broj farmi sa kojih se nabavljaju životinje i seme, kako bi se izbeglo unošenje određenih zaraznih bolesti. Zbog toga je veštačko osemenjavanje krmača široko rasprostranjena tehnika koja se koristi u intenzivnom uzgoju svinja. Ova tehnika nudi brojne prednosti, kao što su primena boljeg genetskog materijala i bolja kontrola bolesti, a pored toga je i ekonomski opravdana. Međutim, sve ove prednosti se u nekom trenutku mogu smatrati i nedostatkom, jer seme može biti potencijalni izvor infektivnih agenasa ili genetskih nedostataka (Pritchard i sar., 2005; Maes i sar., 2008a; Althouse i Rossow, 2011).

Novonabavljene životinje ili genetski materijal trebalo bi da potiču sa farmi sa jednakim ili boljim zdravstvenim i sanitarnim statusom od farme koja vrši nabavku (Pritchard i sar., 2005; Kirwan, 2008; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Utvrđeno je da farme sa višim zdravstvenim statusom imaju niži rizik od infekcije prouzrokovane *Salmonella* spp. (Funk i Gebreyes, 2004). Kako bi se rizik sveo na minimum preporučuje se izolacija ili karantin za novonabavljene životinje na određeni vremenski period, gde je potrebno pratiti zdravstveno stanje životinja tokom perioda inkubacije i utvrditi da li je prisutna neka hronična bolest (Barceló i Marco, 1998). Dobro sprovedena karantinska procedura, pored toga što povećava šanse za otkrivanje bolesti kod novonabavljenih životinja, ubrzo nakon nabavke, omogućava efikasnije laboratorijsko testiranje tih životinja na mnoge infektivne uzročnike i uspešniju vakcinaciju (Pritchard i sar., 2005).

Većina autora preporučuje karantin za novonabavljene životinje kada god je to moguće. Ukoliko to nije moguće, onda se preporučuje izolacija sa minimalnom udaljenosti od 100 do 150 metara od glavnih objekata farme (Moore, 1992). Da bi karantin bio efikasan trebalo bi ga voditi kao potpuno zasebnu jedinicu od ostatka farme. Radnici na farmi koji obilaze životinje trebalo bi da posećuju karantin na kraju radnog vremena, sa posebnom zaštitnom odećom i sa minimalnim kontaktom. Sistemi za upravljanje otpadom (djubretom) trebalo bi da budu nezavisno od ostatka farme i sva oprema koja se koristi u karantinu ne bi se smela koristiti u drugim delovima farme. Strogo poštovanje principa mera

„sve unutra - sve napolje“ (all in/all out), kao i temeljno čišćenje i dezinfekciju treba sprovoditi između iseljavanja i useljavanja karantinskih prostorija (Wong i sar., 2004).

Da bi se utvrdilo vreme trajanja karantina, mora se uzeti u obzir vreme inkubacije određenih bolesti (vreme između infekcije do pojave prvih kliničkih simptoma) i period izlučivanja infekta (Amass, 2005a). Trajanje karantina treba da bude najmanje četiri nedelje, međutim za neke bolesti ovaj period je potrebno da traje duže (virus reproduktivnog i respiratornog sindroma svinja (PRRSV) i svinjski cirkovirus tip 2 (PCV2) - šest do osam nedelja; *Mycoplasma hyopneumoniae* - osam do deset nedelja) (Eijck, 2003; Pritchard i sar., 2005; Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Uprkos tome što je karantin široko prihvaćena i preporučena praksa, pridržavanje karantinskih mera u velikoj meri varira. Istraživanja u Čileu su pokazala da 56% proizvođača koristi karantin prilikom nabavljanja novih svinja. Slični podaci su dobijeni od strane Nacionalnog sistema za nadzor zdravlja životinja (National Animal Health Monitoring Systems) u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), gde je pokazano da između 33,6% i 60,9% proizvođača razdvaja ili smešta novonabavljene životinje u karantin po dolasku na farmu (Pinto i Urcelay, 2003). U istraživanju sprovedenim u Španiji takođe je ustanovljeno da 66% od svih ispitanih farmi sprovodi karantinske mere (Simon-Grifé i sar., 2013).

Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja. Transportna vozila za životinje mogu učestvovati u prenošenju patogena sa jedne farme na drugu (Amass, 2005b; Neumann, 2012). Transportna vozila za prevoz svinja, kao i vozači, u stalnom su kontaktu sa farmama i klanicama zbog čega predstavljaju značajan rizik u pogledu prenošenja patogena. Iz ovih razloga potrebno je zabraniti pristup transportnim vozilima čistim područijima farme, kako bi se izbegla na ovaj način svaka mogućnost prenošenja infektivnih agenasa (Andres i Davies, 2015). Parking za posetioce i vozila za transport životinja bi trebalo da budu najmanje 300 m udaljeni od objekta sa smeštaj životinja (Amass, 2005a). Svinje treba prevoziti samo transportnim sredstvima koja su temeljno očišćena i dezinfikovana. Pored toga, sve mrtve životinje, sav kontaminirani otpad i sav stajnjak moraju biti uklonjeni iz transportnih vozila (Pritchard i sar., 2005; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Svinje koje su bile u kontaktu sa transportnim sredstvima tokom utovara ne smeju se vraćati nazad na farmu, kako bi se smanjio rizik unošenja patogena iz transportnog sredstva na farmu. Utovarni prostor treba očistiti i dezinfikovati nakon svakog utovara životinja (Pritchard i sar., 2005; Backhans i sar., 2015).

Leševi se smatraju glavnim izvorom infektivnog materijala. Zbog toga se savetuje da se leševi što pre uklone sa farmi i skladište na dobro izolovanom mestu (Meroz i Samberg, 1995; Pritchard i sar., 2005).

Skladište leševa trebalo bi da bude lokalizovano što dalje od smeštajnih objekata farme, na mestu gde kamioni mogu da sakupe leševe bez ulaska na farmu, kako bi se izbegli rizici unošenja bolesti ovim putem (Evans i Sayer, 2000; McQuiston i sar., 2005; Pritchard i sar., 2005; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Takođe, treba sprečiti kontakt štetočina sa leševima, kako ne bi došlo na ovaj način do širenja potencijalnih patogena (Evans i Sayer, 2000). Farme sa hladnjačama za skladištenje leševa imaju mnoge prednosti. Primarno, potpuno zatvoreni sistem sprečava širenje infektivnog materijala i efikasan je u izbegavanju kontakta sa štetočinama, a zatim, ovi rashladni sistemi usporavaju procese truljenja leševa, čime doprinose manjim razvojem neprijatnih mirisa i smanjuju učestalost transporta leševa do kafilerija (Vangroenweghe i sar., 2009; Dewulf i Van Immerseel, 2019; Tanquilut i sar., 2020).

Patogeni kao što su *Escherichia coli*, PRRSV, *Salmonella*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*, kao i mnogi drugi, mogu dugo preživeti u fecesu i uglavnom se prenose feko-oralnim putem (Filippitzi i sar., 2017). Zbog toga se savetuje da se feces sa drugih farmi svinja ne širi u opsegu od oko +/- tri kilometra oko farme svinja (Amass, 2005b). Preporučuje se da se polutečna frakcija stajnjaka (osoka) iz farmskih objekata odvodi pomoću kanala sa nagibom (padom) u jame osočare kako bi se izbeglo ponovo vraćanje na farmu (Barceló i Marco, 1998). Oprema koja se koristi za rasturanje stajnjaka ne sme se koristiti na drugim farmama, pogotovu ne na farmama slabijeg zdravstvenog statusa, jer predstavlja veliku opasnost po zdravlje životinja (Moore, 1992; Pritchard i sar., 2005; Kirwan, 2008). Paluszak i sar. (2012) ukazuju da fermentacija uz aeraciju osposobljava stajnjak koji se dalje može koristiti za đubrenje zemljišta. Urea i u manjoj meri amonijak su dobri za dezinfekciju stajnjaka kontaminiranog *Yersinia enterocolitica* i/ili *Salmonella* spp., čime se smanjuje vreme skladištenja stajnjaka i povećava se njegova vrednost (Bolton i sar., 2013; Andres i Davies, 2015).

Postoje velike razlike u konstrukciji i izgradnji podova na farmama koji značajno utiču na to kako se stajnjak iz smeštajnih objekata uklanja i skladišti. Poželjno je da se koristi sistem koji sprečava nakupljanje fecesa na farmi i kojim se ograničava vremenski period izloženosti životinja fecesu, kako bi se sprečio feko-oralni put kruženja patogena. Takođe, onemogućavanje različitim životinjama pristup stajnjaku od velikog je značaja za smanjenje rizika od širenja određenih bolesti. Dobro dizajnirani i održavani rešetkasti podovi su najpogodniji jer sprečavaju nakupljanje fecesa u boksevima, čime se smanjuje kontakt između životinja i njihovog izmeta (Andres i Davies, 2015). Belœil i sar. (2004) su ustanovili da pražnjenje kanala ispod rešetkastih podova pre nego što se useli sledeća grupa krmača u prasilište predstavlja zaštitni faktor u borbi protiv *Salmonella* spp. U istraživanjima sprovedenim u SAD-u utvrđeno je da je prevalenca *Salmonella* bila niža kod svinja

smeštenih na rešetkastim podovima u poređenju sa svim drugim tipovima podova (Davies i sar., 1997a,b). Slično ovome smanjena prevalenca *Salmonella* kod svinja smeštenih na potpuno rešetkastim podovima utvrđena je na farmama u Nemačkoj (Hotes i sar., 2010) i Belgiji (Nollet i sar., 2004). Ovime se potvrđuje da se puni podovi obično mehanički čiste, pa je na taj način lakše prenošenje fecesa između bokseva svinja, za razliku od rešetkastih sistema u kojima je svaki boks zasebna jedinica (Twomey i sar., 2010).

Snabdevanje hranom, vodom i opremom. Hrana generalno ne bi trebalo da predstavlja rizik po zdravlje životinja zbog strogih uslova proizvodnje. Međutim, ranija praksa koja je podrazumevala prihranjivanje pomijama, koja je sada zadržana u zemljama Evropske unije (EC, 2002), dovodila se u vezu sa pojavom zaraznih bolesti, poput klasične svinjske kuge, afričke svinjske kuge i slinavke i šapa (Zu Ermgassen i sar., 2016; Filippitzi i sar., 2017; Van Rensburg i sar., 2020).

Hrana može biti potencijalni izvor patogena na farmi svinja. Mikroorganizmi poput *E. coli* ili *Salmonella* spp. mogu kontaminirati hranu za životinje (Tran i sar., 2018; De Lucia i sar., 2018). Kontaminiranje hrane može se desiti tokom proizvodnje, transporta ili skladištenja (Lister, 2008). Takođe, kontaminirana voda za piće potencijalno može negativno uticati kako na zdravlje ljudi, tako i na zdravlje životinja. Patogeni se na farmi lako mogu proširiti putem kontaminirane vode za piće (Dewulf i Van Immerseel, 2019). Bakteriološke osobine vode su jako bitne za napajanje životinja. Bakterije mogu duže vreme preživeti u vodi i predstavljati opasnost za zapat svinja na farmi (Hémonic i sar., 2010; Gelaude i sar., 2014). Stoga je svakako preporučljivo redovno (poželjno je dva puta godišnje) ispitivanje kvaliteta vode za piće, a takođe savetuje se i sistematsko čišćenje cevi (Pritchard i sar., 2005; Hémonic i sar., 2010; Gelaude i sar., 2014; Backhans i sar., 2015; Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Posetioci i radnici na farmi. Poznato da se infektivni agensi mogu preneti sa čoveka na životinju i obrnuto. Upravo iz tog razloga, broj posetilaca na farmi treba biti ograničen, kako bi se omogućilo što manje kontakata između ljudi i životinja. Čovek može biti mehanički i biološki vektor prilikom prenosa infektivnih agenasa na farmi (Amass i sar., 2003b; Amass, 2005b; Lister, 2008; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Ljudi mogu imati ulogu mehaničkog vektora ako su bili u kontaktu sa zaraženim životinjama, a nakon toga dođu u kontakt sa prijemčivim životinjama bez preduzimanja bilo kakvih mera predostrožnosti (Amass i sar., 2003b; Pritchard i sar., 2005; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Prenos se odvija uglavnom ostacima sekreta ili eksekreta zaraženih životinja na obući i odeći ljudi. Ovaj način prenošenja dokazan je kod nekoliko infektivnih agenasa među kojima su virus klasične

kuge svinja (Filippitzi i sar., 2017), bakterijska oboljenja prouzrokovana *E. coli* (Amass i sar., 2003b), *B. hyodysenteriae* (Giacomini i sar., 2018), kao i *L. intracellularis* (Vannucci i sar., 2019). Postoji mogućnost da ljudi imaju ulogu i bioloških vektora u prenošenju patogenih agenasa koji su infektivni kako za ljude, tako i za životinje, poput virusa influence H1N1 (Newman i sar., 2008) ili *Staphylococcus aureus* (Boss i sar., 2016). Smatra se da se prenos infekta između ljudi i svinja odvija direktnim kontaktom (Huijsdens i sar., 2006).

Na farmama sa visokim zdravstvenim statusom radnici i posetioci u obavezi su da se istuširaju pre ulaska na farmu. Glavna prednost ove procedure je sigurnost da će sva eventualno kontaminirana odeća biti zamenjena odećom i obućom dobijenom od strane farme i da će ruke ljudi biti temeljno oprane (Vangroenweghe i sar., 2009; Hémonic i sar., 2010; Pritchard i sar., 2005). Pored toga, ova mera smanjuje učestalost hitnih poseta na farmi (Amass i Clark, 1999; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Mnogi autori naglašavaju da posetioci i osoblje kada uđu na farmu, uvek treba da nose čistu odeću i obuću kako bi se izbegla mogućnost prenošenja bolesti kontaminiranom odećom (Pritchard i sar., 2005; Hémonic i sar., 2010; Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Na farmama sa visokim zdravstvenim statusom posetioci ne bi trebalo, prethodno, da budu u kontaktu sa svinjama sa drugih farmi minimalno 24, pa do 48 sati (Amass, 2005a; Pritchard i sar., 2005; Vangroenweghe i sar., 2009). Infektivni agensi, kao na primer *Mycoplasma hyopneumoniae*, može preživeti na odeći ljudi od 24 do 48 časova, dok virus svinjske gripa može opstati u nosu ljudi 11 časova, a ispod noktiju čak nekoliko dana (Moore, 1992).

Kontrola štetočina i ptica. Poznato je da su glodari prenosioci mnogih mikroorganizama kao što su *B. hyodysenteriae* (dizenterija svinja), *Leptospira interrogans*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, PRRSV, PCV2, *Salmonella*, *E. coli* i *L. intracellularis* (Filippitzi i sar., 2017). Regulacija populacije glodara je od izuzetne važnosti i ima epidemiološko-epizootiološki i ekonomski značaj, ne samo zbog šteta koje mogu prouzrokovati na farmi, kao na primer: oštećenje zidova, izolacije, električne instalacije, opreme, pojedene i kontaminirane hrane, već i zbog prenošenja bolesti virusne, bakterijske i parazitske etiologije (Backhans i Fellstrom, 2012). Glodari igraju značajnu ulogu, i kao mehanički, i kao biološki vektori, u prenošenju infektivnih agenasa. Oni mogu da budu odgovorni za širenje određenih patogena unutar farme svinja, ali i za širenje patogena sa susednih farmi (Amass i Baysinger, 2006; Vangroenweghe i sar., 2009). Iako se smatra da su štetočine izvor infekcija i da su odgovorne za unošenje infekata na farmu, ipak je veća verovatnoća da predstavljaju rezervoare patogena koji su već prisutni na farmi (Andres i Davies, 2015). Istraživanja sprovedena u Španiji i Danskoj ukazuju da

farme svinja dovode do infekcije divljih ptica salmonelom (Hald i Andersen 2001; Andrés i sar., 2013). Slična istraživanja sprovedena u Švedskoj su takođe, ukazala da patogeni koji se javljaju kod svinja, kao što su *L. intracellularis* i *Y. enterocolitica*, se prenose na glodare sa inficiranih svinja ili okoline zaražene farme (Backhans i sar., 2013). Uticaj vektora je naročito važan u okolini same farme, gde je mnogo teže sprovesti kontrolu. Glodari, a pre svega miševi i pacovi, mogu doprineti širenju *L. intracellularis* i *Salmonella*, prevashodno tako što patogene mogu širiti u okolini i preneti ih na životinje preko kontaminirane hrane ili kontaminirane opreme (Davies i Cook, 2008; Friedman i sar., 2008). Na isti način kao što to čine glodari, ptice mogu direktno ili indirektno da prenose patogene na populaciju svinja. Pored toga, mogu oštetiti poljoprivredne zgrade ili opremu (Amass i Baysinger, 2006; Filippitzi i sar., 2017). Ptice takođe mogu igrati značajnu ulogu u prenošenju određenih patogena kao što je *Salmonella* spp. (De Lucia i sar., 2018).

Kućni ljubimci (psi i mačke) mogu biti indirektni vektori infektivnih agenasa ukoliko imaju pristup farmama. Na taj način mogu preneti infektivni materijal prijemčivim životinjama. Dakle, regulacija populacije pacova ili miševa od strane kućnih ljubimaca nije preporučljiva metoda i stoga je apsolutno nedopustiva (Vangroenweghe i sar., 2009; Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Insekti, takođe, mogu igrati značajnu ulogu u prenošenju patogena na farmi svinja. Nekoliko studija je pokazalo da mikroorganizme poput *Salmonella* spp., virus transmisivnog gastroenteritisa, *Streptococcus suis*, PRRSV, *Bordetella bronchiseptica*, *Clostridium perfringens*, virus klasične kuge svinja, *Brucella suis*, *E. coli* i *L. intracellularis* i PCV2 prenose određeni beskičmenjaci (Otake i sar., 2003; Filippitzi i sar., 2017; Pritchard i sar., 2005).

Da bi se redukovala populacija insekata važno je koristiti različite vrste insekticida i drugih mera poput postavljanja mrežica na svim prozorima uključujući i ventilacione otvore (Vangroenweghe i sar., 2009; Gelaude i sar., 2014).

Lokacija farme. Različiti patogeni svinja, kao što su *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica*, *M. hyopneumoniae*, *B. suis*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Pasteurella multocida*, virus klasične kuge svinja, PRRSV, *S. suis*, *Salmonella* spp. kao i mnogi drugi uzročnici mogu se širiti aerosolom (Filippitzi i sar., 2017). Kako se ovi patogeni mogu preneti vazduhom, tako se lokacija farme smatra kritičnom tačkom u okviru eksternih biosigurnosnih mera (Pinto i Urcelay, 2003; Hartung i Schulz, 2007; Vangroenweghe i sar., 2009). Kada se planira izgradnja farme svinja prvo se mora izabrati odgovarajuća lokacija koja je u saglasnosti sa potrebama farme, planovima, postojećim

ograničenjima, ekološkim propisima i drugim uslovima, pošto su to sve parametri koji se ne mogu promeniti kada se farma izgradi (Amass, 2005a; Casal i sar., 2007). Udaljenost od susednih farmi svinja, prisustvo javnih saobraćajnica za prevoz životinja i dominantan pravac vetra na farmi, može uticati na prenos bolesti putem vazduha (Pritchard i sar., 2005). Istraživanja su pokazala da broj farmi u krugu od dva kilometra ima značajan uticaj na učestalost pojave respiratornih bolesti svinja (Rose i Madec, 2002). Zbog toga se predlaže da minimalna udaljenost između dve različite farme svinja bude 500 metara, jer se na taj način može značajno smanjiti rizik od širenja zaraznih bolesti. Vrsta, broj i gustina farmi u prečniku od 2 km se smatraju presudnim faktorom za unošenje zaraznih bolesti na farmu (Pritchard i sar., 2005). Međutim, postoje primeri gde udaljenost između farmi je bila mala, pa ipak nije došlo do pojave bolesti, kao što je slučaj u Danskoj (Moore, 1992). Smatra se da su biosigurnosne mere u područjima gusto naseljenim farmama svinja bolje usaglašene sa poštovanjem procedura i adekvatnim menadžmentom čime uspešno sprečavaju unošenje i širenje bolesti, pa na taj način mogu da nadomeste nedostatak vezan za lokaciju (Barceló i Marco, 1998; Amass i Clark, 1999; Ribbens i sar., 2008).

Divlje životinje, uključujući divlje svinje, mogu predstavljati ozbiljnu pretnju za populaciju svinja na farmama, jer te životinje mogu biti rezervoari za infektivne bolesti svinja (Ruiz-Fons i sar., 2007; Filippitzi i sar., 2017). Ako se svinje drže napolju, povećaće se rizik od prenosa bolesti direktnim kontaktom sa divljim svinjama, naročito ako u okruženju farme ima mnogo divljih svinja (Ribbens i sar., 2008; Vangroenweghe i sar., 2009). To se odnosi na primer afričke i klasične kuge svinja (Ito i sar., 2019) kao i na Aujeskijevu bolest (Casades-Martí i sar., 2020). Da bi se izbegao kontakt između divljih svinja i drugih divljih životinja sa domaćim svinjama na farmi, preporučuje se ograda oko farme svinja (Pritchard i sar., 2005).

2.2.1.2. Interne biosigurnosne mere

Interne biosigurnosne mere odnose se na: kontrolu bolesti, prasilište i period dojenja, odgajivalište, tovilište, mere između odeljaka i korišćenje opreme i čišćenje i dezinfekciju.

Kontrola bolesti. Za kontrolu bolesti na farmama svinja od izuzetne važnosti je da se zakržljala prasid ne meša sa mlađom grupom prasadi. Naime, takva prasid sporijeg rasta kada se vraćaju u legla mlađe prasadi predstavljaju rizik, jer potencijalno mogu preneti infektivne agense. Na ovaj način, bolest se lako može proširiti u grupu imunološki osetljivih prasadi (Dewulf i Van Immerseel, 2019). Obolele životinje treba što je moguće pre izolovati iz zapata kako bi se izbegao direktan ili indirektan kontakt sa

ostalim svinjama. Potrebno ih je odvojiti u potpuno izolovani prostor, u izdvojeni boks ili poseban smeštajni objekat (Hémonic sar., 2010; Filippitzi i sar., 2017; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Premeštanje bolesnih svinja u nenaseljeni odeljak istog objekta gde su i druge zdrave svinje ili premeštanje bolesnih svinja u hodnik istog objekta ima veoma mali značaj, jer na ovaj način obolele životinje i dalje mogu učestvovati u prenošenju bolesti. Leševi obolelih životinja, takođe, predstavljaju izvor zaraza i moraju se što pre ukloniti sa farmi (Pritchard i sar., 2005; Andres i Davies, 2015; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Da bi se izbegao prenos patogena između obolelih i prijemljivih životinja, savetuje se manipulisanje ili lečenje obolelih svinja uvek posle manipulacije sa zdravim svinjama (Vangroenweghe i sar., 2009; Backhans i sar., 2015; Vidic i sar., 2015).

Vakcinaciju svinja treba sprovoditi prema unapred utvrđenom protokolu kako bi se stvorio uravnotežen i bolji imunitet svinja (Filippitzi i sar., 2017). Vakcinacijom životinja obezbeđuje se zaštita od razvoja kliničkih simptoma bolesti, ali takođe sprečava se prenos patogena u zapatu svinja. Prema tome, vakcinacija može smanjiti rizik od bolesti ili smrtnosti svinja, ali je i od koristi za opštu dobrobit svinja (Andres i Davies, 2015).

Prasilište i period dojenja. Infektivni agensi se mogu preneti horizontalno, sa krmače na prasad preko kože i mlečne žlezde, i vertikalno putem placentе i mleka (Amass i sar., 1996; Filippitzi i sar., 2017). Pre nego što se krmače prebace u prasilište, potrebno je izvršiti tretman protiv endo i ekto parazita i oprati krmače kako bi se sprečio prenos patogena iz čekališta u prasilište. Pranje krmača treba obaviti pre nego što uđu u prasilište, kako bi se izbegla kontaminacija prasilišta tokom procesa pranja (Vangroenweghe i sar., 2009; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Mešanje legla u prasilištu je opasno, jer se infektivni agensi mogu preneti sa zaražene krmače na osetljivu prasad, koja nemaju maternalna antitela (Filippitzi i sar., 2017).

U prasilištu se izvode brojne intervencije na prasadima kao što je kastracija, stavljanje ušnih markica, aplikacija gvožđa za čiju primenu je potrebna određena oprema. Ova oprema može da predstavlja put širenja patogena ukoliko se nakon upotrebe ne očisti i dezinfikuje (Vangroenweghe i sar., 2009; Filippitzi i sar., 2017).

Odgajivalište. Poštovanje principa mera „sve unutra - sve napolje“ (all in/all out) predstavlja jednu od najvažnijih biosigurnosnih mera za prekidanje ciklusa širenja patogena iz jednog dela proizvodnje u drugi (Clark i sar., 1991). Ova mera podrazumeva da se svinje drže u različitim grupama u zavisnosti od starosti i mase. Ove različite grupe ne mogu se mešati tokom boravka na farmi svinja, a kada se

grupa svinja prebaci u sledeću fazu proizvodnje (npr. iz prasilišta u odgajivalište), cela proizvodna jedinica se mora potpuno isprazniti (Maes i sar., 2008b; Hémonic i sar., 2010; Dewulf i Van Immerseel, 2019; Backhans i sar., 2015). Ovaj princip omogućava da se temeljno očisti i dezinfikuje svaki odeljak kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija između uzastopnih proizvodnih ciklusa (Dewulf i Van Immerseel, 2019).

Gustina naseljenosti svinja u objektima za smeštaj svinja utvrđena je minimalnim uslovima za zaštitu svinja koje propisuje Evropska unija (Council Directive 2008/120/EC).

Tovilište. Važno je usvojiti pravila za sprečavanje širenja bolesti između različitih starosnih kategorija svinja. Ta pravila podrazumevaju utvrđivanje kretanja radnika unutar farme. Potrebno je ustanoviti smerove kretanja posetilaca i radnika na farmi. Tokom obilazaka smeštajnih objekata u okviru farme, treba se strogo pridržavati utvrđene rute i sve radnje na farmi svinja treba izvoditi po strogim propisanim redosledom, s tim da nema vraćanja u prethodni odeljak (Vangroenweghe i sar., 2009; Laanen i sar., 2011).

Životinje različite starosti su različito osetljive na određene patogene. Zbog toga je presudno držati odvojeno različite starosne kategorije svinja, kako bi se izbegao prenos patogena među svinjama različite starosti. Pored toga, rad na farmi treba obavljati počevši od najmlađih kategorija prasadi, pa nakon toga preći na starije kategorije svinja, kao i po strogo definisanom redosledu prvo rad sa zdravim životinjama, pa nakon toga sa bolesnim (prvo pregledati prasad na sisi, a potom gravidne krmače, prasad u odgoju, tovne svinje, karantin, bolesne životinje i na kraju skladište leševa). Poštovanjem ovog redosleda može se sprečiti prenos bolesti na farmi (Filippitzi i sar., 2017).

Mere između odeljaka i korišćenje opreme. Prenošenje patogena može biti i indirektno preko opreme koja se koristi na farmi svinja (Laanen i sar., 2011; Gelaude i sar., 2014; Filippitzi i sar., 2017). Da bi se izbegao prenos bolesti, potrebno je da svaka smeštajna jedinica farme ima zasebnu opremu, koja se ne sme koristiti kod različitih starosnih kategorija svinja. Zbog toga je preporučljivo koristiti opremu koja je jasno prepoznatljiva (različite boje) kako bi se sprečilo njeno premeštanje iz jednog odeljka u drugi (Vangroenweghe i sar., 2009; Laanen i sar., 2011; Gelaude i sar., 2014; Dewulf i Van Immerseel, 2019). Patogeni se lako mogu uneti preko opreme koja se koristi na farmi. To se naročito dešava ukoliko se oprema koristila kod različitih kategorija svinja ili na različitim farmama (Pritchard i sar., 2005; Filippitzi i sar., 2017). Da bi se sprečio prenos patogena preko opreme sa jedne farme na drugu, savetuje se da oprema koja se koristi bude predodređena samo za jednu farmu (Lister, 2008;

Gelaude i sar., 2014). Na primer, svaka farma treba da ima opremu za fiksiranje svinja koju ne bi trebalo pozajmljivati drugim farmama. Takođe, treba podići interne biosigurnosne mere kako bi se sprečio prenos bolesti između različitih osetljivih starosnih grupa svinja, jer se ova oprema može brzo kontaminirati pljuvačkom i drugim organskim materijalom što može dovesti do širenja patogena na farmi (Vangroenweghe i sar., 2009).

Upotreba šprica i igle za aplikaciju lekova ili preparata gvožđa može imati značajnu ulogu u prenošenju zaraznih bolesti, naročito ukoliko se ne menjaju redovno (Hémonic i sar., 2010; Filippitzi i sar., 2017). Igle se mogu kontaminirati patogenima sa kože svinje ili preko krvi inficiranih životinja, pa na taj način mogu predstavljati rizik za prenošenje bolesti između svinja (Hémonic i sar., 2010). Preporučljivo je koristiti nove igle za sve vidove aplikacije medicinskih sredstava (igle za jednokratnu upotrebu), ali na većini farmi svinja igla se koristi dok potpuno ne zatupi. Da bi se postigao kompromis, preporučuje se da se igla menja za svako novo leglo ili na svakih 10 životinja (Vangroenweghe i sar., 2009).

Čišćenje i dezinfekcija. Da bi se kontrolisale zarazne bolesti na farmi svinja, veoma je važno sprovesti temeljno čišćenje i dezinfekciju, jer klinički zdrave svinje mogu izlučivati patogene putem sekreta i eksekreta i na taj način mogu kontaminirati svoju okolinu (Amass i Clark, 1999).

Temeljni postupak čišćenja i dezinfekcije sastoji se od sedam koraka (Dewulf i Van Immerseel, 2019):

1. Mehaničko čišćenje (uklanjanje organske materije),
2. Natapanje (kvašenje) svih površina deterdžentom,
3. Pranje prostorija vodom pod pritiskom kako bi se uklonila sva zaostala nečistoća,
4. Sušenje nakvašenih prostorija kako bi se izbeglo razblaživanje dezinficijensa,
5. Dezinfekcija prostorija,
6. Sušenje dezinfikovanih prostorija i
7. Kontrola izvršenog postupka (higijenogram).

Da bi se sprečilo širenje patogena preko obuće, uređaji za pranje čizama i dezobarijere mogu se postaviti između različitih odeljaka jednog smeštajnog objekta na farmi ili različitih smeštajnih objekata u okviru farme. Ako se dezobarijere ne održavaju i ne koriste na pravi način mogu predstavljati put širenja infektivnih agenasa (Vangroenweghe i sar., 2009). Zbog toga je važno održavati higijenu smeštajnih objekata za uzgoj svinja, jer pored zdravstvenog aspekta, čišćenje i dezinfekcija pozitivno utiču na proizvodne performanse svinja, a naročito na prosečan dnevni prirast (Laanen i sar., 2013).

2.3. Enterične bolesti svinja

Poznato je da zdravstveno stanje svinja na području Republike Srbije ograničava uspešnu i održivu proizvodnju. Konstantan rast učestalosti pojavljivanja bolesti, njihov tok i nepovoljan ishod razlozi su ogromnih direktnih i indirektnih gubitaka. U preko 50% slučajeva radi se o enteričnim bolestima, među čijim uzročnicima pored *E. coli* (Gagrčin i sar., 2002) je i *L. intracellularis*, koja izaziva proliferativnu enteropatiju (PE), poznatu pod nazivima ileitis ili intestinalna adenomatoza.

Enterične zarazne bolesti predstavljaju velike probleme u svinjarstvu širom sveta. One su od velikog ekonomskog značaja za uzgajivače zbog slabijeg napredovanja, manjeg prirasta i veće smrtnosti svinja. Takođe su prisutni i indirektni gubici usled povećane upotrebe antibiotika i promena u samom upravljanju farme kako bi se kontrolisala bolest (Wood i Lysons, 1988; McOrist i sar., 1997a). Drugi problemi koji se javljaju usled enteričnih bolesti jesu ugrožavanje zdravlja životinja, povećani rizici od prenošenja bolesti, zoonoze koje se mogu preneti na ljude (Poppe i sar., 1998) i rezistencija na antibiotike (Aarestrup i sar., 2000). Mnogi patogeni koji se nađu u crevima izazivaju lezije, poremećaj u transportu hranljivih materija ili promene u enzimskoj aktivnosti (Holland, 1990). Ishod ovakvih stanja je često varijabilan i zavisi od etiologije enterične bolesti. Tako da u nekim slučajevima dolazi do visokog morbiditeta, dok u drugim do visokog mortaliteta. Posledice nekih enteričkih bolesti smanjene su primenom vakcina i napretkom u upravljanju farme, odnosno primeni biosigurnosnih mera (Springer i Selbitz, 1999; Dean-Nistrom i sar., 2002; Laine i sar., 2008; Pejsak i sar., 2010), kao što je poštovanje principa mera „sve unutra - sve napolje“ (all in/all out) (Smith i sar., 1998; Mirko i Bilkei, 2006).

Enterične bolesti mogu biti bakterijske, virusne ili parazitske etiologije. Načestći uzročnici su *L. intracellularis*, *E. coli*, *C. perfringens*, *Brachyspira* spp., *Salmonella* spp., rotavirus, (PCV2) i *Isospora suis*, a prevalenca ovih bolesti varira širom sveta (Stegé i sar., 2000; Thomson i sar., 2001; Merialdi i sar., 2003; Suh i Song, 2005; Katsuda i sar., 2006). Od bakterijskih uzročnika najčešće se javljaju *L. intracellularis* i *Brachyspira* spp. (Jacobson i sar., 2005), dok se *Salmonella* spp. ređe javljaju kod svinja (Boqvist i sar., 2003).

Klinička slika enteričnih bolesti. Dijareja je najčešća klinička manifestacija bolesti digestivnog trakta kod svinja koja se javlja širom sveta. Dijareja se može definisati kao malapsorpcija vode i elektrolita (Jubb i Kennedy, 1970), učestale pasaže mekog ili vodenastog fecesa (Liebler-Tenorio i sar., 1999), ili stanje kada se u fecesu nalazi preko 80% vode (Makinde i sar., 1996). Enterične bolesti odlikuju

različiti klinički simptomi, koji se kreću od meke stolice koja traje nekoliko dana kod životinja koje naizgled deluju zdravo, do obilnog vodenastog fecesa sa dehidracijom i ubrzanim gubitkom telesne mase (Svendsen i sar., 1974; Morin i sar., 1983; Johnston i sar., 2001). Crevni sadržaj može biti mukozan, hemoragičan ili nekrotičan, a bolest se može brzo pojaviti sa smrtnim ishodom bez prethodnih kliničkih simptoma (Alexander i Taylor, 1969; Svendsen i sar., 1974).

Dijareja se ponekad pojavljuje kod pojedinačnih životinja, ali češće se javlja kao ponovljeni problem u zapatu i zahvata veći broj životinja (Svendsen i sar., 1974; Jestin i sar., 1985; Nabuurs i sar., 1993). Ekonomski gubici su značajni zbog povećane stope smrtnosti, slabijeg napredovanja svinja i troškova lečenja (McOrist i sar., 1997a; Wills, 2000). Slabije napredovanje svinja dovodi do produžavanja vremena tova i prekovremenog boravka svinja u jednom zapatu. Sve to ima uticaj na sistem uzgoja dovodeći do remećenja biosigurnosnih mera i higijene, čime se povećava rizik od prenošenja bolesti (Pearce, 1999; Wills, 2000; Morris i sar., 2002).

Dijareja može prouzrokovati velike ekonomske gubitke (Morris i sar., 2002). Na primer, u Australiji krajem osamdesetih godina, proizvodni gubici usled kolibaciloze kod odlučene prasadi procenjene su na oko 80 \$ po krmači godišnje, a za dizenteriju svinja proizvodni gubici iznosili su 100 \$ (Cutler i Gardner, 1988). U SAD-u za proizvodnju tovljenika od 100 kg utroši se 32 \$ više na farmama sa izraženom dijarejom u poređenju sa farmama sa visokim zdravstvenim statusom, što jasno ukazuje na ekonomske gubitke izazvane raznim bolestima (Batista i Pijoan, 2002). Stoga dijareja kod svinja izaziva znatne ekonomske gubitke, ne samo za pojedinačnog poljoprivrednog proizvođača, već i za celu zemlju.

Dijareja kod svinja može imati i druge uticaje na društvo (Glossop, 2002; Hayes, 2002). Pre svega, neke od enteričnih bolesti svinja su zoonoze i mogu se preneti na ljude direktnim kontaktom sa zaraženih svinjama ili preko mesa i proizvoda od mesa (Helms i sar., 2001; Nielsen, 2002). Zatim, postoji sve veća zabrinutost zbog razvoja antibiotske rezistencije i prisustva rezidua antibiotika u hrani animalnog porekla, s obzirom da je velika upotreba antibiotika i kod životinja i kod ljudi (Wills, 2000; Glossop, 2002). Takođe, dobrobit životinja je jedno od najvažnijih pitanja u stočarstvu i bolesti se moraju smatrati važnim pitanjem dobrobiti životinja (Fraser, 2002; Glossop, 2002), kao i prekomerna emisija azota i fosfata na farmama svinja (Hatfield, 2002).

Patogeneza enteričnih bolesti. Dijareja nastaje kao posledica poremećaja izlučivanja tečnosti i apsorpcije vode, elektrolita i hranljivih materija u crevima. Nezrele epitelne ćelije crevnih kripta imaju

pretežno sekretornu funkciju, dok zrele epitelne ćelije na površini vila tj. crevnih resica imaju pretežno apsorpcionu funkciju. Ovo je važno imati u vidu, jer kod nekih enteričnih bolesti prvenstveno dolazi do lezija na površinskom epitelu, što dovodi do poremećaja apsorpcije tečnosti i elektrolita, dok sekrecija u kriptama ostaje nepromenjena ili je čak povećana. Povećana sekrecija spira sluz u lumenu koji je potreban za varenje i pasažu crevnog sadržaja kroz gastrointestinalni trakt. Povećana propustljivost (permeabilnost) creva i povećano osmotsko opterećenje u lumenu dovodi do dijareje (Moeser i Blikslager, 2007).

Enterotoksični soj *E. coli* je primer patogena koji izaziva sekretornu dijareju. Bakterije stvaraju enterotoksine, termostabilan toksin, termolabilan toksin i termostabilan enterotoksin-1 koji podstiču sekreciju u crevima (Söderlind i Möllby, 1979; Savarino i sar., 1993). Atrofija crevnih resica i malapsorpcija često se javljaju kod virusnih dijareja, kao što je to slučaj kod rotavirusnih infekcija (Ward i sar., 1996). Rotavirusi se vezuju za zrele enterocite na crevnim resicama. Zatim ulaze u ćeliju gde se razmnožavaju i smanjuju apsorpciju glukoze što dovodi do razvoja osmotske dijareje (Halaihel i sar., 2000). Dijareja izazvana delimično malapsorpcijom je prisutna i kod infekcija izazvanih *Brachyspira* spp. Smanjena apsorpcije natrijuma i vode, takođe, dovodi do dijareje (Argenzio i sar., 1980).

Iako je *B. hyodysenteria* uzročnik dizenterije svinja, smatra se da prisustvo drugih bakterija (Whipp i sar., 1979) ili promena ishrane (Durmic i sar., 1998) utiču na nastanak bolesti. Većina ostalih bakterija je nepokretna u viskoznoj sluzi, što predstavlja odbranbenu barijeru na površini epitela, dok *B. hyodysenteriae* je jako pokretljiva u sluzi i može lako doći do površine enterocita (Kennedy i sar., 1988). Imunski odgovor domaćina takođe se smatra važnim faktorom u razvoju bolesti (Hontecillas i sar., 2005). Na primer, zapaljenjska oboljenja creva rezultat su poremećaja u regulaciji CD4+ T (CD4+ T helper cells) ćelijskog odgovora na antigene iz creva od strane regulatornih T ćelija (Cong i sar., 2000).

L. intracellularis inficira mlade, nezrele enterocite u crevnim kriptama, i to najčešće u ileumu, gde se umnožavaju u citoplazmi ćelija. Inficirane ćelije počinju da se progresivno umnožavaju, prenoseći uzročnika na ćerke ćelije koje ne uspevaju da se razviju u zrele apsorptivne enterocite (Kroll i sar., 2005). Smatra se da smanjena sposobnost apsorpcije dovodi do dijareje, ali još uvek nije potpuno jasno da li *L. intracellularis* utiče i na sekretornu funkciju.

PCV2 je uzročnik multisistemskog slabljenja prasadi nakon odlučnja i dovodi do limfoidne deplecije i granulomatoznog enteritisa sa infiltracijom epitelnih ćelija i multijedarnim džinovskim ćelijama u Pajerovim pločama. Intraćelijska inkluziona tela često se vide u multijedarnim džinovskim ćelijama, kao i histocitoza (Kim i sar., 2004; Jensen i sar., 2006b). Međutim, uglavnom nisu samo uzročnici dovoljni da izazovu dijareju, već najčešće u sadejstvu sa drugim nespecifičnim faktorima, kao što su prenatrpani objekti, mešanje životinja, uticaj sredine, transporta i kolebanje temperature, stvaraju se preduslovi da svinje budu podložnije enteričnim infekcijama (Laine i sar., 2008).

2.4. *Lawsonia intracellularis* uzročnik proliferativne enteropatije (PE) svinja

Enterične bolesti svinja se vrlo često javljaju nakon odlučnja i uglavnom su infektivne prirode (Ramirez, 2012). Dok virusi igraju glavnu ulogu u pojavljivanju određenih patoloških stanja kod mladih svinja, bakterije i protozoe često uzrokuju pojavu dijareje dovodeći do smanjenja prosečnog dnevnog prirasta svinja. *L. intracellularis* je rasprostranjena širom sveta i dovodi do velikih ekonomskih gubitaka. Infekcija ovom bakterijom manifestuje se kod svinja u dve kliničke forme (McOrist i sar., 2012):

- Hronična proliferativna forma, opisana kao proliferativna enteropatija (PE) ili proliferativna enteropatija svinja (PPE), koja se javlja kod odlučene prasadi i tovljenika mlađih od četiri meseca. Karakteriše se smanjenjem prirastom i malim procentom uginuća usled proliferacije i zadebljanja ileuma i proksimalnog kolona;
- Akutna forma je poznata kao proliferativni hemoragični enteritis (PHE), i karakteriše se intestinalnim krvarenjima i iznenadnom smrću, koja se javlja kod svinja starijih od četiri meseca (McOrist i sar., 2012).

Klinička slika PE i izolacija bakterije *L. intracellularis*. Intestinalna adenomatoza kod svinja prvi put je opisana 1931. godine od strane Beister i Schwarte sa Departmana za veterinarska istraživanja u Ajovi (Department of Veterinary Investigation, Iowa State College, Ames, Iowa, USA). Ovi autori su je definisali kao „epitelnu degeneraciju sa formiranjem adenomatoznih izraslina i zamenom peharastih ćelija nediferenciranim ćelijama u ileumu i kolonu“. Beister i Schwarte su opisali ovu bolest kod 12 svinja koje su inficirali crevnim sadržajem i skarifikatom sluznice creva zaraženih svinja, što se manifestovalo akutnom dizenterijom i proliferativnim epitelnim lezijama u crevima (Biester i Schwarte, 1931). Ovo istraživanje je dokazalo infektivnu prirodu „intestinalne adenomatoze svinja“ danas poznate kao proliferativna enteropatija. Rowland i sar. sa veterinarskog fakulteta u Edinburgu

(Royal Dick, School of Veterinary Studies, Edinburgh, UK) su 1973. godine pomoću elektronskog mikroskopa identifikovali „nepravilno zakrivljenu bakteriju“ u inficiranim epitelnim ćelijama svinja sa PHE. Bojenje epitelnih ćelija creva sa serumom obeleženim fluoroforom kod inficiranih svinja otkrilo je specifične promene u njihovoj apikalnoj citoplazmi (Rowland i sar., 1973, Lawson i sar., 1985). Ista grupa istraživača je 1989. godine uspela da identifikuje kampilobakter - slične organizme (*Campylobacter*-like) u citoplazmi enterocita gnotobiotičkih svinja eksperimentalno inficiranih homogenatom crevne mukoze svinja sa PHE (McOrist i sar., 1989). Oni su ukazali da ovi mikroorganizmi (uzročnici) ulaze u enterocite i umnožavaju se u njima nakon infekcije. Lawson i sar., (1993) su uspešno umnožili bakterije koje su izazivale PE/PHE svinja u ćelijama tankog creva pacova (IEC-18; ATCC® CRL1589™) pri smanjenom nivou kiseonika u kulturi na 8%. Tada je uočeno da inficirane ćelije prenose intracelularne bakterije na svoje ćerke ćelije tokom deobe, na šta nije imao uticaj neomicin u ćelijskoj kulturi. Opisani intracelularni organizam je bio 0,3 µm širine i 1,0 µm dužine i bio je zakrivljen u obliku stapića sa troslojnim spoljašnjim omotačem (Lawson i sar., 1993). Ćelijska kultura sa umnoženim intracelularnim organizmima, bez drugih bakterija, uključujući i hlamidije, bila je u stanju da izazove PHE kod svinja putem oralne inokulacije (McOrist i sar., 1993). Čiste IEC-18 ćelijske kulture sa intracelularnim bakterijama dobijenim od prirodno inficiranih svinja sa PHE korišćene su za eksperimentalnu infekciju hrčaka oralnom inokulacijom. Kod inficiranih hrčaka došlo je do razvoja proliferativnog enteritisa koji je pokazao zajedničku etiologiju proliferativnih lezija (Jasni i sar., 1994). Bakterija, označena kao *ilealni simbiot intracellularis* (*IS intracellularis*), pripadala je gram-negativnim bakterijama. Sekvenca 16S rRNK *IS intracellularis* pokazala je najveću sličnost sa *Desulfovibrio desulfuricans*, bakterijom koja redukuje sulfat i koja se nalazi u anaerobnoj sredini (Gebhart i sar., 1993). Dalja potvrda fenotipskih i genotipskih karakteristika dovela je 1995. godine do preimenovanja *IS intracellularis* u *Lawsonia intracellularis* u čast škotskog naučnika dr G. H. K. Lawson, koji je prvi identifikovao intracelularnu bakteriju 1973. godine (McOrist i sar., 1995a). *L. intracellularis* je klasifikovana u familia *Desulfovibrionacea*, phylum *Proteobacteria* (Vannucci i Gebhart, 2014). Prvobitno je smatrano da uzročnik nema flagelum, međutim kasnija istraživanja su pokazala da *L. intracellularis* ima monopolarni flagelum koji služi za kretanje u ekstracelularnom prostoru (Lawson i Gebhart, 2000; Vannucci i Gebhart, 2014) (Slika 2.1.) Prirodno ili eksperimentalno izazvana infekcija ovom bakterijom uočena je kod konja, pacova, zečeva, lisica, pasa, ovaca, jelena, ptica trkačica i primata koji ne pripadaju nadporodici čovekolikih majmuna (Vannucci i Gebhart, 2014). U prirodnim uslovima *L. intracellularis* se širi feko-oralnim putem infekcije, i poznato je da

uzročnik može preživeti u fecesu na temperaturi između 5 °C i 15 °C do dve nedelje (Collins i sar., 2000).



Slika 2.1. Čista kultura *L. intracellularis* slikana elektronskim mikroskopom.

Strelica označava polarni flagelum (bič).

(Gebhart i Guedes, 2010)

Patogeneza infekcije uzrokovane bakterijom *L. intracellularis*. Klinička slika kod svinja se često karakteriše akutnom dijarejom različitog intenziteta sa povremenim katranasto crnim fecesom koji može preći u vodenastu dijareju sa primesama čiste krvi (McOrist i sar., 2012). Kod proliferativne enteropatije često se javlja bledilo, slabost i iznenadna smrt. Subklinička forma bolesti karakteriše se neujednačenošću u masi svinja, praćena sporadičnom dijarejom, smanjenim prirastom i mogućom anoreksijom i apatijom (McOrist i sar., 2012). Praćenjem individualnog prirasta može pomoći u ranom otkrivanju subkliničke infekcije prouzrokovane bakterijom *L. intracellularis*. Eksperimentalna oralna inokulacija ovom bakterijom dovodi do nastanka infekcije crevnog epitela nakon tri do pet dana, sa pojavom vidljivih lezija koje nastaju nakon 11-15 dana i koje ostaju prisutne još 14 dana do oporavka (Lawson i Gebhart, 2000; Boutrup i sar., 2010; Vannucci i Gebhart, 2014; Guedes i sar., 2017). Uzročnik se izlučuje fecesom oko sedam dana nakon infekcije, a izlučivanje može trajati i do 12 nedelja (McOrist i sar., 2012) (Šema 2.1).

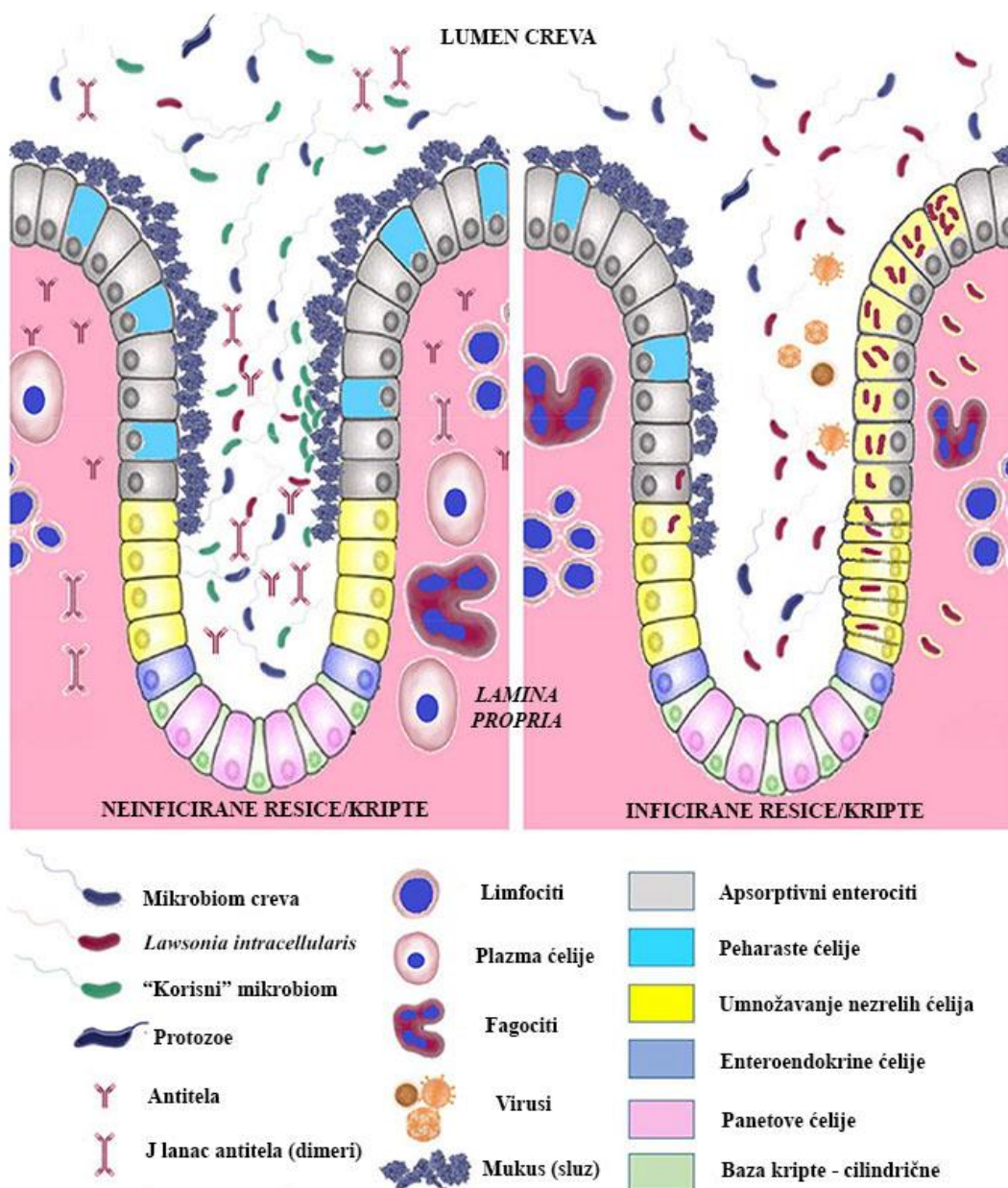


Šema 2.1. Tok proliferativne enteropatije kod eksperimentalno zaraženih pet nedelja starih prasadi.

Pojava i trajanje kliničkih simptoma, izlučivanje uzročnika putem fecesa i sistemski humoralni i ćelijski posredovan imunski odgovor prikazani su nakon inokulacije *L. intracellularis* 0. dana (Gebhart i Guedes, 2010).

Dijareja počinje, već, devetog dana nakon infekcije i primetna je tokom 21. dana. Antigeni *L. intracellularis* prisutni su u epitelnim ćelijama distalnih partija tankog creva, kao i u proksimalnom delu debelog creva do 28 dana posle infekcije. Makroskopske promene ogledaju se u zadebljanju zida creva i primarno se nalaze u terminalnom ileumu, ali se često šire 60 cm proksimalno od ileocekalne valvule u gornju trećinu proksimalnog kolona (Jensen i sar., 2006a; McOrist i sar., 2012). U crevima je često prisutan krvav sadržaj povremeno sa krvnim ugrušcima. U težim slučajevima lezije mogu biti prisutne u jejunumu, cekumu i distalnom kolonu, a ponekad lezije mogu biti ograničene samo na debela creva (Jensen i sar., 2006a). Histološki lezije se retko mogu naći u rektumu. Smatra se da su epitelne ćelije kripte, a naročito one epitelne ćelije koje se nalaze na prelazu između kripte i crevnih resica, (Slika 2.2.) prve koje bivaju inficirane (Bouttrup i sar., 2010). Inficirane epitelne ćelije šire infekciju dok se dele i migriraju. Može se primetiti i hiperplastična proliferacija nezrelih epitelnih ćelija crevnih kripte, dok inficirani enterociti nagomilavaju uzročnike u apikalnom delu citoplazme. Jako inficirane ćelije su uvećane i formiraju protruzije (proširenja), za koje se smatra da posreduju u širenju infekcije u lumen creva (McOrist i sar., 1996a). Kako infekcija napreduje, bakterije se mogu primetiti u makrofagima smeštenim u *lamina propria*, čak i nakon uklanjanja antigena *L. intracellularis* iz epitelnih ćelija. Stoga se smatra da makrofagi imaju ulogu u širenju infekcije (Jensen i sar., 2006a; Bouttrup i sar., 2010). Apoptotske epitelne ćelije i makrofagi pojavljuju se u fazi izlečenja PE (McOrist i sar., 1996a). Danas se smatra da procesi apoptoze nisu uključeni u patogenezi PE, iako su se u prošlosti zastupali suprotni stavovi (Vannucci i Gebhart, 2014; Guedes i sar., 2017). Nedavna

istraživanja ukazuju da kombinacija Notch-1 signalizacije i prekid Wnt β -katenin signalnog puta može biti povezana sa proliferacijom nezrelih ćelija kripti. Nemogućnost ćelija kripti da se diferenciraju u peharaste i apsorptivne ćelije dovodi do gubitka glikoproteina MUC2 u zahvaćenom epitelu na vrhuncu infekcije (Huan i sar., 2017). Među ostalim istraživanjima koja su se bavila odgovorom ćelija domaćina na infekciju *L. intracellularis*, nedavno je izvršena mikrodisekcija laserom i RNAseq sekvenciranje (Oh i sar., 2010; Jacobson i sar., 2011; Vannucci i sar., 2013a; Smith i sar., 2014). Ova istraživanja su pokazala da inficirani enterociti dodatno regulišu gene koji učestuju u G1 fazi ćelijskog ciklusa, dovodeći do aktivacije transkripcije i sinteze proteina. Sa izuzetkom transportera za unos bakra, geni koji su odgovorni za unos hranljivih materija bili su inhibirani u inficiranim enterocitima, što dovodi do malapsortivne dijureje (Vannucci i sar., 2013a). Faktori odgovorni za prijanjanje, unošenje i širenje *L. intracellularis* u ćelije domaćina, uključujući i proliferaciju ćelija i kasnije širenje bakterija u susedne ćelije, još uvek nisu poznati. Uočena je ograničena sposobnost uzročnika da izazove oboljenje kod različitih vrsta domaćina (svinje i konji) (Vannucci i sar., 2012). Zanimljivo je da sojevi *L. intracellularis* koji dovode do oboljenja kod svinja i konja, mogu inficirati i hrčke i zečeve, dok svinjski izolati *L. intracellularis* nisu patogeni za zečeve, a konjski izolati *L. intracellularis* nisu patogeni za hrčke (Sampieri i sar., 2013).



Slika 2.2. Infekcija bakterijom *L. intracellularis*.

Mikrobiom creva, „korisni“ mikrobiom, sloj mukusa i zaštitna antitela koji učestvuju u borbi protiv *L. intracellularis* (levo). „Disbioza“ koju karakteriše izmenjeni mikrobiom, nepotpun sloj mukusa i nizak nivo zaštitnih antitela primećen je kod infekcije *L. intracellularis* (desno) (Karuppattan i Opriessnig, 2018).

Genom bakterije *L. intracellularis*. Do sada su obavljane dve celokupne genomske sekvence od dva svinjska izolata bakterije *L. intracellularis* (Sait i sar., 2013; Mirajkar i sar., 2017). Genom se sastoji od 1,46 Mb hromozoma i tri plazmida od 0,03, 0,04 i 0,19 Mb. Između ova dva genoma zabeleženo je

osam polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNPs) i 70 insercija/delecija u intronima. Pored toga, 16 SNPs (3 sinonimna i 13 nesinonimna) i 20 insercija/delecija su zabeležena u intergenskim regionima. Treći objavljeni celokupni genom je konjski izolat *L. intracellularis* (Mirajkar i sar., 2017). U poređnom analizom genoma identifikovano je genomsko ostrvo sa 18 kb profaga (Vannucci i sar., 2013b).

Genom *L. intracellularis* je prvi put sekvencioniran 2003. godine, ali do sada ima malo dostupnih informacija o kodiranim proteinima. Dale i sar. su 1998. godine otkrili da groES/EL operon *L. intracellularis* kodira 60k Da GroEL protein koji reaguje sa specifičnim antiserumom *L. intracellularis* dobijene iz zečeva. Površinski antigen A (LsaA) bakterije *L. intracellularis* ekspimiran u ćelijskoj kulturi i u inficiranom tkivu ileuma identifikovan je upotrebom posebnih prajmera (McCluskey i sar., 2002). Monoklonska antitela protiv LsaA su bila u stanju da blokiraju *in vitro* infekciju epitelnih ćelija od strane *L. intracellularis*. Gen za kodiranje ATP/ADP translokaze *L. intracellularis*, za koji se zna da je uključen za obezbeđivanje energije za parazitizam intracelularnim patogenima, identifikovan je na osnovu homologije, a njegova funkcionalnost je potvrđena heterolognom ekspresijom *E. coli* (Schmitz-Esser i sar., 2008). U drugim istraživanjima pokazano je da se sekrecione komponente N (lscN), lscO, i lscQ gena *L. intracellularis* su familija gena za virulenciju pronađena u mnogim bakterijama gde je zapaženo da poseduju iste gene koji kodiraju sisteme sekrecije tipa 3 i ekspimiraju se u zaraženim epitelnim ćelijama creva. Utvrđeno je da rekombinantni LscQwas reaguje sa serumom inficiranih i vakcinisanih svinja (Alberdi i sar., 2009). Drugi protein *L. intracellularis*, autotransportni protein A (LatA), identifikovan je na osnovu masene spektrometrijske analize ćelijskih kultura ekspresijom proteina *L. intracellularis* koji su reagovali sa zaraženim serumom svinja (Watson i sar., 2011). Uočeno je da LatA specifično reaguje na serume inficiranih svinja. U drugim istraživanjima masene spektrofotometrije, koja je koristila pristup proteomike, identifikovano je pet proteina spoljašnje membrane *L. intracellularis*, od kojih su dva antigena koja su reagovala sa zaraženim serumom svinja (Watson i sar., 2014).

Kontrola PE (*L. intracellularis*) primenom dezinfekcionih sredstava. Dostupni su različiti komercijalni dezinficijensi na bazi kvaternernih amonijumovih jedinjenja (Roccal-D Plus[®], DC&R[®], Synergize[™]), aldehida (DC&R[®], Synergize[™]), oksidacionih sredstava (Virkon[®] S), biguanidi (Nolvasan[®] Solution), fenola (Tek-Trol[®]), joda (Cetridine), hlora, kalijum peroksimonosulfata, fosfatnih jedinjenja (Stalosan[®] F) i sulfatnih jedinjenja koji efikasno inaktiviraju *L. intracellularis*. Da bi se uzročnik inaktivisao u prisustvu organske materije i vode tvrdoće oko 400 ppm neophodno je da

uzročnik bude najmanje 10-30 minuta izložen dejstvu dezinfekcionog sredstva (Wattanaphansak i sar., 2009a,b; Wattanaphansak i sar., 2010a; Collins i sar., 2013). Sa povećanjem tvrdoće vode (1000 ppm kalcijum karbonata) opada efikasnost dezinfekcionog sredstva (Wattanaphansak i sar., 2009a).

Kontrola PE (*L. intracellularis*) primenom antibiotika. Profilaktička primena antibiotika u hrani se pokazala kao efikasna mera protiv PE/PHE (Love i Love, 1977). Sa razvojem ćelijskih kultura za *in vitro* uzgajanje *L. intracellularis* na enterocitima pacova (IEC- 18; ATCC® CRL-1589™), dokazana je antimikrobna osetljivost na penicilin, eritromicin, difloksacin, virginiamicin i hlortetraciklin, dok je najveću aktivnost inhibicije razmnožavanja bakterija pokazao tiamulin i tilmikozin (McOrist i sar., 1995b). Mnogi antibiotici, kao što su tiamulin, tilozin, tetraciklin, linkomicin i neki kvinoksalini, smatraju se efikasnim sredstvima u kontroli infekcije izazvane *L. intracellularis* kada se primene u profilaktičkim dozama (McOrist i sar., 1996b; McOrist i sar., 1997b; McOrist i sar., 2000; Kyriakis i sar., 2002; Alexopoulos i sar., 2006; Guedes i sar., 2009; Wattanaphansak i sar., 2009b; McOrist i sar., 2012; Larsen i sar., 2016). Istraživanja su pokazala da su makrolidi i pleuromutilini najefikasnija profilaktička sredstva u borbi sa PE/PHE (McOrist i sar., 2012). Subterapijska doza antibiotika u stočnoj hrani bila je sastavni deo svinjarske proizvodnje više od 70 godina (Li, 2017). Međutim sa sve većom i učestalijom pojavom antimikrobne rezistencije, u zemljama širom sveta se promoviše smanjena upotreba ili potpuna zabrana upotrebe antibiotika kao promotera rasta u hrani za životinje. Tako da je ta zabrana u zemljama Evropske unije (EU) (Regulation 1831/2003 of the European parliament) stupila na snagu od 2006. godine (Windisch i sar., 2008).

Tokom pojave kliničkih simptoma bolesti, obično se u većim dozama koriste antibiotici koji su efikasni u terapiji PE kao što su tilozin, enrofloksacin, tetraciklini, tiamulin i tilmikozin (McOrist i sar., 2012). S druge strane, antimikrobni lekovi za koje se zna da su neefikasni protiv kliničkih slučajeva PE/PHE su penicilin, bacitracin i aminoglikozidi, kao i neomicin, virginiamicin i jonofori. Pored njih, jedinjenja bakra ili cinka i sredstva za zakišeljavanje hrane takođe ne daju željene rezultate (McOrist i sar., 2012).

Vakcinacija u kontroli PE (*L. intracellularis*). Smatra se da prirodna infekcija sa *L. intracellularis* daje snažan imunitet (Collins i Love, 2007). Dokazano je da su veštački inficirane svinje sa homogenatom intestinalne mukoze od prirodno inficiranih svinja, tretirane antibioticima od 21. do 31. dana nakon infekcije, postale potpuno otporne na reinfekciju 49. dana i izostao je odgovor akutne faze, što je dokaz prirodnog imuniteta nakon primarne infekcije (Riber i sar., 2011; Riber i sar., 2015). Kod infekcije svinja bakterijom *L. intracellularis* posredovan je ćelijski imuni odgovor, a u lumenu inficiranih creva uočavaju se imunoglobulini A klase (IgA) (Guedes i Gebhart, 2010). Danas su za

preventivnu namenu dostupne komercijalne žive atenuirane i inaktivisane vakcine, sa svojim prednostima i nedostacima.

Živa atenuirana vakcina prema uputstvu proizvođača primenjuje se oralno preko vode za piće ili preko hrane tečne konzistencije. Antibiotici se ne smeju davati tri dana pre i tri dana posle vakcinacije živom atenuiranom vakcinom. Za razliku od ovih vakcina, antibiotici ne ometaju dejstvo inaktivisane vakcine, ali je neophodna parenterna primena vakcine. Maternalna antitela protiv *L. intracellularis* obično opadaju nakon tri nedelje, ali mogu biti prisutna i do pet nedelja (Guedes i sar., 2002a). Prisustvo maternalnih antitela nakon odlučnja ne ometa imunski odgovor na dejstvo žive atenuirane vakcine. Da bi se razvio imunitet potrebno je od tri do četiri nedelje nakon primene žive atenuirane vakcine (Walter i sar., 2004). Zbog duže komercijalne dostupnosti žive atenuirane vakcine u literaturi je dostupno mnogo više podataka o ovim vakcinama. Na primer, imunitet indukovani živom atenuiranom vakcinom *L. intracellularis* manje je efikasan od imuniteta koji je indukovani prirodnom infekcijom usled brze indukcije specifičnog IFN γ -T ćelijskog odgovora na *L. intracellularis* (Cordes i sar., 2012). Na osnovu korelacije između nivoa imunoglobulina kod oralno ili intramuskularno vakcinisanih svinja sa postinfektivnim lezijama ileuma i količinom izlučivanja *L. intracellularis*, pokazano je da je neutralizacija glavni način delovanja atenuiranih vakcina (Nogueira i sar., 2013). Oralna, intramuskularna ili intraperitonealna vakcinacija sa živom atenuiranom vakcinom daje sličan odgovor imunoglobulinima G klase (IgG). Međutim, oralna ili intraperitonealna primena žive atenuirane vakcine indukuje značajno veći odgovor imunoglobulinima A klase (IgA) nego intramuskularna primena vakcine (Nogueira i sar., 2015). Pored antitela, smatra se da i drugi mehanizmi, kao što je ćelijski posredovani imunski odgovor, se takođe aktivira dejstvom žive atenuirane vakcine (Nogueira i sar., 2013; Nogueira i sar., 2015). Humoralni imunski odgovor može biti ključni mehanizam imuniteta izazvan inaktivisanim vakcinama. Humoralni i ćelijski posredovani imunski odgovor su uključeni u zaštitu protiv infekcije *L. intracellularis*, a kvalitet imunskog odgovora indukovani vakcinalnim sojem *L. intracellularis* koji se razlikuje od onog koji indukuju patogeni izolati sa terena (Karuppanan i Opriessnig, 2018).

Uprkos nekim nedostacima, dokazano je da su žive atenuirane i inaktivisane vakcine *L. intracellularis* korisne u mnogim slučajevima i poznato je da smanjuju lezije i izlučivanje bakterija preko fecesa (Guedes i Gebhart, 2003; Kroll i sar., 2004; Almond i Bilkei, 2006; McOrist i Smits 2007; Leite i sar., 2018a; Roerink i sar., 2018). Osim toga, vakcinacija takođe smanjuje upotrebu antibiotika koji se koriste u kontroli infekcije izazvane *L. intracellularis* (Holyoake i sar., 2009; Bak i Rathkjen, 2009).

Međutim, vakcine ne daju potpunu zaštitu protiv *L. intracellularis*, pa mogu biti potrebne i dodatne intervencije za kontrolu PE/PHE (Riber i sar., 2015; Kruse i sar., 2017).

Alternativna sredstva u kontroli PE. Dodaci ishrani kao što su fitogeni aditivi, etarska ulja i drugi dodaci, sve više se koriste u kontroli mnogih bolesti životinja (Windisch i sar., 2008). Mnoga alternativna sredstva, kao što su prebiotici, probiotici, acidifikatori creva i manan oligosaharidi se danas koriste za kontrolu nekrotičnog enteritisa koji može poslužiti kao model za kontrolu *L. intracellularis* (Caly i sar., 2015; M'Sadeq i sar., 2015). Antimikrobni promoteri rasta, kao što je tilozin, često su korišćeni u kontroli *L. intracellularis*. Poznati su po tome da favorizuju rast poželjnih bakterija u crevima (Kim i sar., 2012; Kim i sar., 2016). Stoga, direktna manipulacija mikrobiomom creva sa suplementima, a ne antimikrobnim promotorima rasta, može biti održiv pristup u kontroli *L. intracellularis*.

2.5. Mikrobiom creva i *L. intracellularis*

Mikrobiom creva ljudi je dobro proučen i poznato je da se sastoji od 150 do 400 različitih vrsta bakterija, uglavnom iz tipa (phylum) *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria* (Davenport i sar., 2017; Costea i sar., 2018). Poznato je da bakterijska raznolikost mikrobioma creva kod ljudi zavisi od starosti, uticaja okoline, sastava hrane, vlakana, genetike domaćina i drugih faktora. Uzorci mikrobioma creva ljudi se svrstavaju u tri „enterotipa“ bazirana na taksonomskom statusu (Costea i sar., 2018). Enterotip 1 (ili B) je opisan kao dominantan *Bacteroides*, enterotip 2 (ili P) kojim dominira *Prevotella* i enterotip 3 (ili F) gde dominiraju *Firmicutes*, od kojih su najznačajnije *Ruminococcus* (Costea i sar., 2018).

Pored toga što svinje imaju drugačiji tip ishrane od ljudi, ipak u fiziološkom smislu creva svinja su veoma slična crevima ljudi i imaju slične obrasce razvoja i održavanja mikrobioma creva. Ispitivanja su pokazala da se mikrobiom creva razlikuje od jejunuma do rektuma, pri čemu tip *Firmicutes* ima predominantnu zastupljenost u ileumu (Isaacson i Kim, 2012; Frese i sar., 2015; Kim i Isaacson, 2015; Mach i sar., 2015; Gresse i sar., 2017). U cekumu i kolonu najdominantnije su bakterije iz tipova *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Kim i Isaacson, 2015). Istraživanja takođe pokazuju da se mikrobiom creva menja sa starošću svinja i da odlučenje prasadi ima snažan uticaj na mikrobiom creva, čineći ih podložnijim za crevne infekcije (Kim i Isaacson, 2015; Gresse i sar., 2017). U savremenom načinu uzgoja svinja, prasad se odbija od majke u uzrastu od tri ili četiri nedelje, međutim u prirodnim

uslovima odlučenje se dešava sa 17 nedelja, pa se iz tog razloga smatra da je period odlučnja glavni stresor za gastrointestinalni trakt (Jensen, 1986; Gresse i sar., 2017).

U istraživanjima sprovedenim 2004. godine u Danskoj utvrđeno je da se *L. intracellularis* izlučuje putem fecesa dve do tri nedelje nakon odlučnja prasadi, čime je potvrđeno da stres usled promene ishrane i odlučnja potencijalno ima značajnu ulogu u nastanku i razvoju infekcije ovom bakterijom (Stege i sar., 2004). Poznato je da je infekcija *L. intracellularis* česta kod odlučjenih prasadi (McOrist i sar., 2012). Takođe je poznato da infekcija *L. intracellularis* dovodi do promena crevnog mikrobioma, što ukazuje na složenu povezanost između uzročnika i mikrobioma creva (Leite i sar., 2018a; Mølbak i sar., 2008; Borewicz i sar., 2015). Istraživanja su pokazala da eksperimentalna infekcija sa čistim kulturama *L. intracellularis* ne izaziva bolest kod gnotobiotičkih svinja, dok isti inokulum izaziva infekciju kod konvencionalnih svinja (McOrist i sar., 1993). Osim toga, gnotobiotičke svinje inficirane mukozom od prirodno inficiranih svinja tretiranom neomicinom imale su kolonizaciju *L. intracellularis* i infekciju ograničenu samo na tanka creva, što ukazuje da je za nastanak opšte infekcije potrebno i prisustvo drugih anaeroba (McOrist i sar., 1989; Lawson i Gebhart, 2000).

Infekcija *L. intracellularis* povezana je sa smanjenjem broja peharastih ćelija, koje luče sluz u tankom crevu, i odsustvom glikoproteina MUC2 na vrhuncu infekcije (Huan i sar., 2017). Modeli miševa bez ekspresije MUC2 su bili podložniji intestinalnoj disbiozi i infekcijama, dok MUC2 miševi hranjeni probioticima su pokazali otpornost prema neuravnoteženoj mikrobioti digestivnog trakta i infekcijama (Kumar i sar., 2017). Iz navedenog se može zaključiti da primena različitih dodataka hrani za životinje, kao što su npr. fitogeni aditivi na bazi etarskih ulja koji menjaju sastav mikrobiote digestivnog trakta, može biti jedan od efikasnih načina za sprečavanje infekcija izazvanih *L. intracellularis*, kao i ublažavanje kliničkih simptoma bolesti.

Uticao ishrane i fitogenih aditivi na pojavu i kontrolu PE (*L. intracellularis*). Poslednjih godina, velika pažnja je posvećena nutritivnim suplementima koji potencijalno mogu pomoći u kontroli intestinalne infekcije uzrokovane bakterijom *L. intracellularis*. Probiotici se definišu kao „korisne“ bakterije koje doprinose zdravlju domaćina. S druge strane, prebiotici su sastojci hrane koji indukuju rast ili aktivnost probiotika. Međutim, treba voditi računa koji su to „korisni“ mikroorganizmi, jer su često u literaturi oprečna mišljenja u vezi ovih informacija. Nutritivne promene mogu potencijalno biti korisne u kontroli infekcije prouzrokovane *L. intracellularis* (Barba-Vidal i sar., 2018).

Prebiotici su jedinjenja koja se ne vare u precekalnim segmentima digestivnog trakta i mogu biti već prisutni u hrani, kao sastavni deo nekih hraniva, ili se u vidu suplemenata dodaju hrani za životinje. Prebiotici su supstrat za određene intestinalne mikroorganizme, one koje proizvode metabolite (npr. kratkolančane masne kiseline) i bakteriocine, koji zatim utiču na mikrobiotu creva, morfologiju creva, imunski sistem, i ostvaruju mnoge druge povoljne efekte u organizmu životinja (Pourabedin i Zhao, 2015; Holscher, 2017; Umu i sar., 2017). Pored toga, smatra se da nesvarljiva vlakna fizički sprečavaju adheziju patogena na ćelijama domaćina, pa ovaj mehanizam potencijalno može sprečiti i adheziju *L. intracellularis* na enterocite. Fruktoligosaharidi, inulin i manan-oligosaharidi su samo neki od dobro definisanih prebiotičkih aditiva hrani za životinje (Pourabedin i Zhao, 2015). Pored njih rezistentni skrob i kompleks polisaharida kao što su celuloza, hemiceluloza i pektin su poznati po prebiotičkom dejstvu (Holscher, 2017; Umu i sar., 2017). Ispitivanja hrane za svinje pokazuju da nerastvorljivi b-glukani, prisutni u ječmu, pogoduju povećanju broja bakterija *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. u crevima, koji se smatraju korisnim, probiotskim bakterijama u intestinalnom traktu (Murphy i sar., 2012). Struktura hraniva i smeša za ishranu utiče na sadržaj i sastav mikrobiote creva kod svinja. Gruba nepeletirana hrana smanjuje prevalencu *L. intracellularis* i pogoduje korisnim mikroorganizmima kod prirodno i eksperimentalno inficiranih svinja (Steger i sar., 2001; Mølbak i sar., 2008). Pokazano je da dodavanjem zrna žitarica koja su nusproizvod procesa destilacije (dried distiller's grain with solubles - DDGS) i sojinih ljuski u hrani svinja smanjuje intenzitet infekcije *L. intracellularis* eksperimentalno izazvane (Whitney i sar., 2006).

Dodavanje suplemenata kao što su kratkolančani fruktooligosaharidi (short-chain fructooligosaccharide - scFOS) u hrani za krmače tokom poslednje trećine graviditeta i tokom laktacije doprinosi poboljšanim opštim imunološkim parametrima creva i specifičnom imunskom odgovoru legla na infekciju *L. intracellularis*. Zapaženo je takođe da prasadi od krmača koje su u hrani dobijale suplement scFOS ima veći broj peharastih ćelija i zdraviju morfologiju creva u poređenju sa kontrolnim leglima gde krmače nisu dobijale ovaj suplement putem hrane. Smatra se da hrana za krmače sa scFOS može povećati broj korisnih bakterija u crevima koje se zatim prenose i na prasadi, pa posledično je kod prasadi veća proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina od strane ovih mikroorganizama u digestivnom traktu (Le Bourgot i sar., 2017). Druga istraživanja su pokazala da sastav hrane može da utiče na infekciju *L. intracellularis* kod svinja koje se uzgajaju na farmama (Visscher i sar., 2018). Iako je nekoliko istraživanja sprovedeno primenom prebiotika u kontroli *L. intracellularis*, čini se da ovaj pristup deluje obećavajuće, s obzirom da menja sastav mikrobiote u crevima. U drugim sličnim istraživanjima, primena prirodnih suplemenata sa antimikrobnim svojstvima, kao što su ekstrakti *Origanum vulgare*

(origano) i *Allium sativum* (beli luk), u hrani za svinje dovodi do smanjenja broja *L. intracellularis* u crevima i ublažavanja kliničkih simptoma bolesti uz poboljšanje proizvodnih parametara u zapaćima svinja (Papatsiros i sar., 2009). Slični rezultati su uočeni i u eksperimentu sa komercijalnim fitogenim aditivom na bazi etarskih ulja pri terenskom istraživanju u zapatu prirodno inficiranim bakterijom *L. intracellularis* (Draskovic i sar., 2018). Maksimalni nivo neresorptivnih sastojaka hrane, kao i prisustvo razlićitih fitogenih biološki aktivnih jedinjenja u hrani za životinje je važno istražiti kako bi se izbegao potencijalni negativni efekti sastava hrane na unos i potpunu iskoristivost hrane.

Poznato je da fermentisani proizvodi, sa ili bez živih mikroorganizama, u ljudskoj ishrani kontrolišu enterićne patogene i povoljno utiću na zdravlje creva (Fuller, 1989; Fuller, 1991). Još od 1920. godine se zna za korisne efekte, koje bakterije *Lactobacillus* spp., imaju na zdravlje ljudi (Cheplin i Rettger, 1920). Dokazano je da *Enterococcus faecium* suzbija dijareju i moguću smrt svinja usled patogenog dejstva *E. coli* (Underdahl, 1983). Dodavanje mlećne kiseline u hrani i primena fermentisane tećne hrane delimićno ublaćava patogenezu i izlućivanje *L. intracellularis* kod svinja (Boesen i sar., 2004). Probiotici koji se primenjuju u ishrani su otporni na želudaćnu kiselinu i Źuć i proizvode jedinjenja koja inhibiraju patogene, izazivaju imunski odgovor i menjaju sastav i aktivnost mikrobioma creva (Patterson i Burkholder, 2003). *E. coli* Nissle, smatra se probiotićkim mikroorganizmom, koji pojaćava barijeru crevnog epitela i poboljšava zašćitu protiv rotavirusa kod svinja. Smatra se da ovaj mehanizam bi potencijalno mogao biti ukljućen i u slućaju infekcije sa *L. intracellularis* (Kandasamy i sar., 2017). Poznato je da neki mikrobi mogu direkćno inhibirati „patogenu“ mikrobiotu sekrecijom razlićitih inhibitornih molekula, enzimima i metabolitima, što pretstavlja mehanizam koji moće biti ukljućen u kontroli infekcije izazvane *L. intracellularis* (Chiu i sar., 2017; Lebeer i sar., 2018). Takoće, poznato je da razlićite korisne bakterije u crevima formiraju biofilmove koji onemogućavaju kolonizaciju patogena (Chiu i sar., 2017). Kada se govori o infekciji bakterijom *L. intracellularis*, još uvek nema dovoljno podataka u literaturi o uticaju razlićitih suplemenata u hrani svinja i njihovoj efikasnosti u kontroli ove bolesti.

Fitogeni aditivi, poznati kao fitobiotici, definišu se kao biljni proizvodi koji se dodaju stoćnoj hrani u cilju poboljšanja proizvodnih performansi životinja, zbog efekata koji oni ostvaruju na zdravstveno stanje i prirast, a kako bi se istovremeno dobili i što kvalitetniji proizvodi animalnog porekla. Oni predstavljuju mešavinu biljaka, zaćina, etarskih ulja i uljanih smola. Ove komponente imaju širok spektar dejstva i godinama unazad se koriste u medicini. Fitogene komponente utiću na organoleptićka svojstva stoćne hrane, što ćini hranu piamamljivijom životinjama, a samim tim se povećava i njena

konzumacija (Windisch i sar., 2008). Ove komponente stimulišu lučenje pankreasnih enzima (Platel i Srinivasan, 2004) i poboljšavaju varenje (Amad i sar., 2011).

Fitogeni aditivi su proizvodi koje uzgajivači životinja primenjuju u ishrani tokom celog perioda uzgoja životinja, za razliku od veterinarskih lekova koji se primenjuju u preventivne i terapijske svrhe određenih patoloških stanja pod kontrolom veterinara i u ograničenom vremenskom periodu, nakon koga je određen i period karence (Windisch i sar., 2008).

Antibiotici kao promotori rasta korišćeni su za kontrolu gastrointestinalne disfunkcije i za bolje napredovanje životinja. Kako je posledično došlo do povećane otpornosti mikroorganizama na antibiotike, odnosno razvoja antimikrobne rezistencije, i zabrane njihove upotrebe u profilaktičke svrhe od 2006. godine u Evropskoj uniji, tako su fitogeni aditivi privukli sve veću pažnju u stočarskoj proizvodnji (Windisch i sar., 2008). Mnoga istraživanja su dokazala korisne efekte fitogenih aditiva na prirast i konverziju hrane kod svinja i živine (Hashemi i Davoodi, 2011). Pretpostavlja se da fitogeni aditivi ostvaruju dejstvo tako što moduliraju imunski odgovor creva i ćelijski antioksidativni kapacitet (Mueller i sar., 2012; Liu i sar., 2014).

Antibiotici kao promotori rasta korišćeni su u mnogim zemljama za kontrolu subkliničke infekcije izazvane bakterijom *L. intracellularis*, međutim u Danskoj je upotreba antibiotika kao promotora rasta ukinuta 1999. godine, i od tada je došlo do povećane upotrebe antibiotika u terapijske svrhe, posebno antibiotika efikasnih u kontroli infekcije izazvane *L. intracellularis* (WHO Report, 2003).

Zdravlje gastrointestinalnog trakta kod svinja direktno je povezano sa produktivnošću životinja i to predstavlja glavni problem u modernom svinjarstvu. Izloženost svinja raznim stresorima (npr. rano odlučenje, prelazak na drugi tip ishrane ili patogeni) povezano je sa poremećajem oksidativne ravnoteže i oslobađanjem imunoloških agenasa u crevima koji doprinose gastrointestinalnim poremećajima i lošem zdravstvenom stanju (Pié i sar., 2004; Dong, 2007; Yin i sar., 2014). Smatra se da dobra primena biosigurnosnih mera na farmama povoljno utiče na zdravlje i proizvodne performanse životinja, što za rezultat ima smanjenu upotrebu antibiotika, čime se stvaraju svi neophodni preduslovi za održivu stočarsku proizvodnju (Ribbens i sar., 2008).

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je da se ispita uticaj fitogenog aditiva (Patente Herba[®] Plus) u kontroli PE i njegov uticaj na proizvodne rezultate odlučene prasadi prirodno inficirane bakterijom *L. intracellularis* na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima, kao i da se uspostave i optimizuju protokoli za molekularnogenetičku identifikaciju bakterije *L. intracellularis* i da se kvantifikuje stepen infekcije kod prasadi putem real-time qPCR metode i imunohistohemijske IHC metode. Takođe, nakon određivanja biosigurnosnog nivoa svake od četiri ispitivane farme, uporedno je ispitivan uticaj biosigurnosnih nivoa i fitogenog aditiva na proizvodne rezultate (telesnu masu, prirast, konzumaciju i konverziju hrane), broj izlučenih bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi, kao i na mikroskopske promene i histomorfometrijske parametre creva prasadi.

Za ostvarenje ovih ciljeva, realizovani su sledeći zadaci:

- Utvrđivanje biosigurnosnih nivoa na četiri farme svinja u Srbiji;
- Ispitivanje uticaja različitih biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate odlučene prasadi (telesna masa, prirast, konzumacija i konverzija hrane) na ispitivanim farmama;
- Uspostavljanje i optimizacija molekularnogenetičkog protokola real-time qPCR za preciznu dijagnostiku PE i kvantifikaciju njenog uzročnika;
- Ispitivanje uticaja fitogenog aditiva (Patente Herba[®] Plus) na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi bakterijom *L. intracellularis*;
- Uspostavljanje i optimizacija protokola za utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva u kontroli *L. intracellularis* praćenjem stepena infekcije pre i posle tretmana;
- Uspostavljanje i optimizacija imunohistohemijskog protokola za preciznu dijagnostiku i semikvantitativnu procenu nivoa infekcije bakterijom *L. intracellularis*;
- Utvrđivanje uticaja fitogenog aditiva (Patente Herba[®] Plus) na mikroskopske promene i histomorfometrijske parametre creva.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Formiranje grupa i postavka terenskog eksperimenta

Sprovođenje oglada, kao i svih procedura koje su izvedene na životinjama odobrene su od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, kao i od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede – Uprava za veterinu (Rešenje br. 323-07-4087/2016-05/1, od 09.05.2016. godine u Beogradu).

Terenski eksperiment u cilju utvrđivanja efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba[®] Plus) u kontroli PE, procene njegovog uticaja na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi bakterijom *L. intracellularis*, kao i uticaja biosigurnosnih nivoa farmi na prethodno navedene parametre, izveden je na ukupno četiri farme (Institut za stočarstvo - Zemun, Napredak - Stara Pazova, Halovo - Zaječar, Neoplanta - Čenej) na teritoriji Republike Srbije, koje su na osnovu rezultata biosigurnosnih nivoa rangirane na sledeći način:

1. Farma svinja biosigurnosnog nivoa 1 (BS 1) kapaciteta 1000 krmača;
2. Farma svinja biosigurnosnog nivoa 2 (BS 2) kapaciteta 250 krmača;
3. Farma svinja biosigurnosnog nivoa 3 (BS 3) kapaciteta 1400 krmača;
4. Farma svinja biosigurnosnog nivoa 4 (BS 4) kapaciteta 1600 krmača.

Na farmama svinja biosigurnosnog nivoa 1 (BS 1) i biosigurnosnog nivoa 4 (BS 4) rasni sastav prasadi činio je danski jorkšir/danski landras/danski durok, na farmi svinja biosigurnosnog nivoa 2 (BS 2) rasni sastav prasadi činio je švedski landras/jorkšir, dok na farmi svinja sa biosigurnosnim nivoom 3 (BS 3) rasni sastav prasadi bio je landras/jorkšir.

Podaci o zdravstvenom stanju prasadi na farmama dobijeni su kontinuiranim kliničkim posmatranjima i rutinskim laboratorijskim testovima. Kod prasadi nisu uočeni klinički simptomi infekcija bakterijama *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Brachyspira hyodysenteriae* i *B. pilosicoli*.

Eksperimentalne grupe na četiri različite farme bile su formirane na osnovu rezultata PCR metode kojom je prethodno potvrđeno prisustvo DNK bakterije *L. intracellularis* u fecesu odlučene prasadi. Prasad sedam nedelja stara, ujednačenih telesnih masa, je bila raspodeljena u kontrolne grupe (grupe koje u hrani nisu dobijale preparat Patente Herba[®] Plus) i tretman grupe (grupe koje su u hrani dobijale

preparat Patente Herba[®] Plus) na svakoj ispitivanoj farmi. Kontrolna grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 1 (K-BS1); Kontrolna grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 2 (K-BS2); Kontrolna grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 3 (K-BS3); Kontrolna grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 4 (K-BS4); Tretman grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 1 (T-BS1); Tretman grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 2 (T-BS2); Tretman grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 3 (T-BS3) i Tretman grupa na farmi sa biosigurnosnim nivoom 4 (T-BS4). Nazivi i skraćenice eksperimentalnih grupa, kao i dani uzorkovanja fecesa prikazani su u Tabeli 4.1.

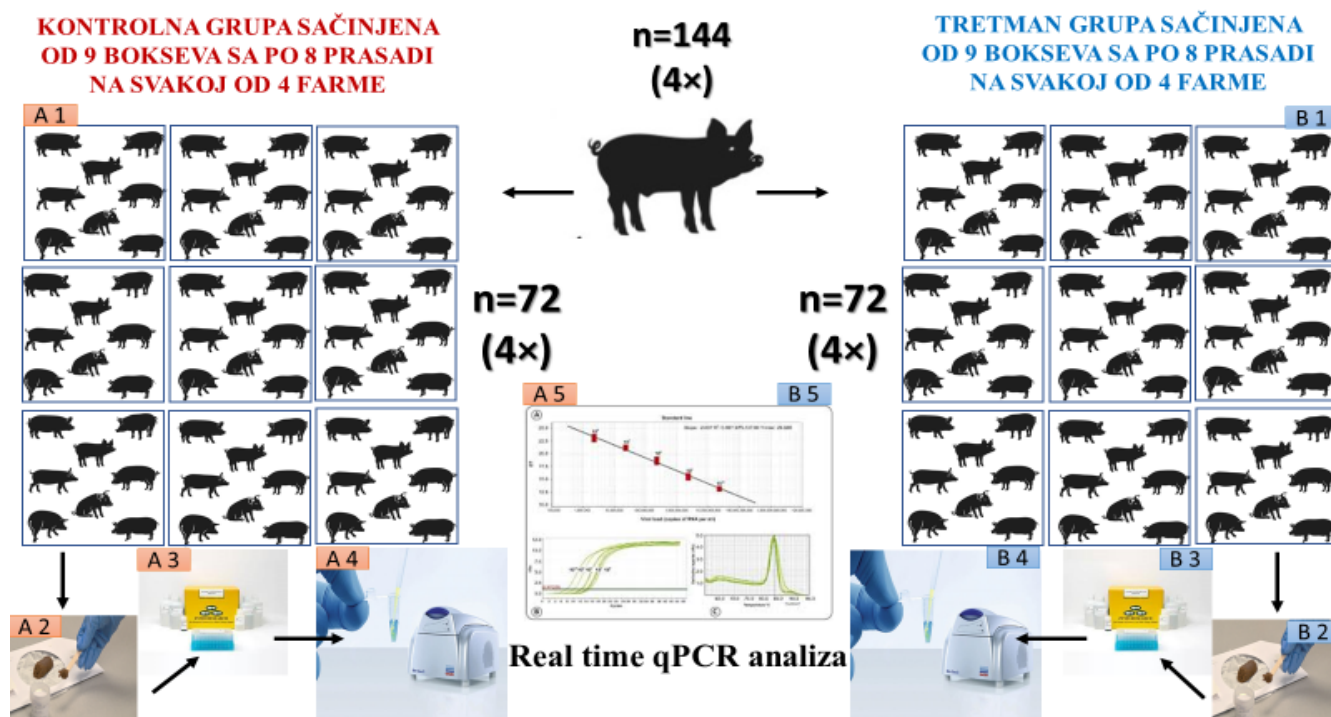
Tabela 4.1. Nazivi i skraćenice eksperimentalnih grupa i dani uzorkovanja fecesa

Oznaka grupa	Opis eksperimentalne grupe	Dan uzorkovanja		
K-BS1, K-BS2, K-BS3 i K-BS4	Kontrolna grupa - Grupa koja dobijala samo kompletnu krmnu smešu	0.	14.	28.
T-BS1, T-BS2, T-BS3 i T-BS4	Tretman grupa - Grupa koja je sa kompletnom krmnom smešom dobijala i fitogeni aditiv (Patente Herba [®] Plus) u koncentraciji od 2 kg/t	0.	14.	28.

Svaka grupa prasadi se sastojala od 72 jedinice muškog pola. Na farmama BS 1, BS 2, BS 3 i BS 4, kontrolna i tretman grupa sastojala se od po osam prasadi raspoređenih u devet bokseva. Na svakoj od četiri farme, kontrolne (K-BS1, K-BS2, K-BS3 i K-BS4) i tretman grupe prasadi (T-BS1, T-BS2, T-BS3 i T-BS4) bile su smeštene u odvojene bokseve, tako da je fizički bio onemogućen kontakt između bokseva, odnosno bio je onemogućen kontakt između prasadi držanih u različitim boksevima (Šema 4.1.). Sve kontrolne i tretman grupe prasadi su dobijale potpunu krmnu smešu istog sirovinskog i hemijskog sastava koja je zadovoljavala potrebe u ishrani za ispitivanu kategoriju svinja (NRC, 2012). Tretman grupa prasadi je u hrani dobijala preparat Patente Herba[®] Plus u koncentraciji od 2 kg/t tokom četiri nedelje eksperimenta.

Sakupljanje uzoraka fecesa. Uzorci fecesa za molekularnogenetičke analize sakupljeni su prilikom formiranja grupa, na dan početka eksperimenta, odnosno neposredno pre prvog davanja ispitivanog fitogenog aditiva (0. dan), kao i 14. i 28. dana od početka primene Patente Herba[®] Plus u hrani prasadi. Od životinja držanih u grupnim boksevima (po osam prasadi) uzimani su zbirni uzorci fecesa (200 g fecesa po eksperimentalnom boksu). Devet bokseva činilo je kontrolnu grupu i isto toliko bokseva činilo je tretman grupu na svakoj od farmi (devet zbirnih kontrolnih uzoraka fecesa + devet zbirnih tretman uzoraka fecesa) × tri uzorkovanja (0., 14. i 28. dan), na svakoj od četiri farme različitih biosigurnosnih nivoa. Od životinja držanih u individualnim boksevima uzimani su pojedinačni uzorci

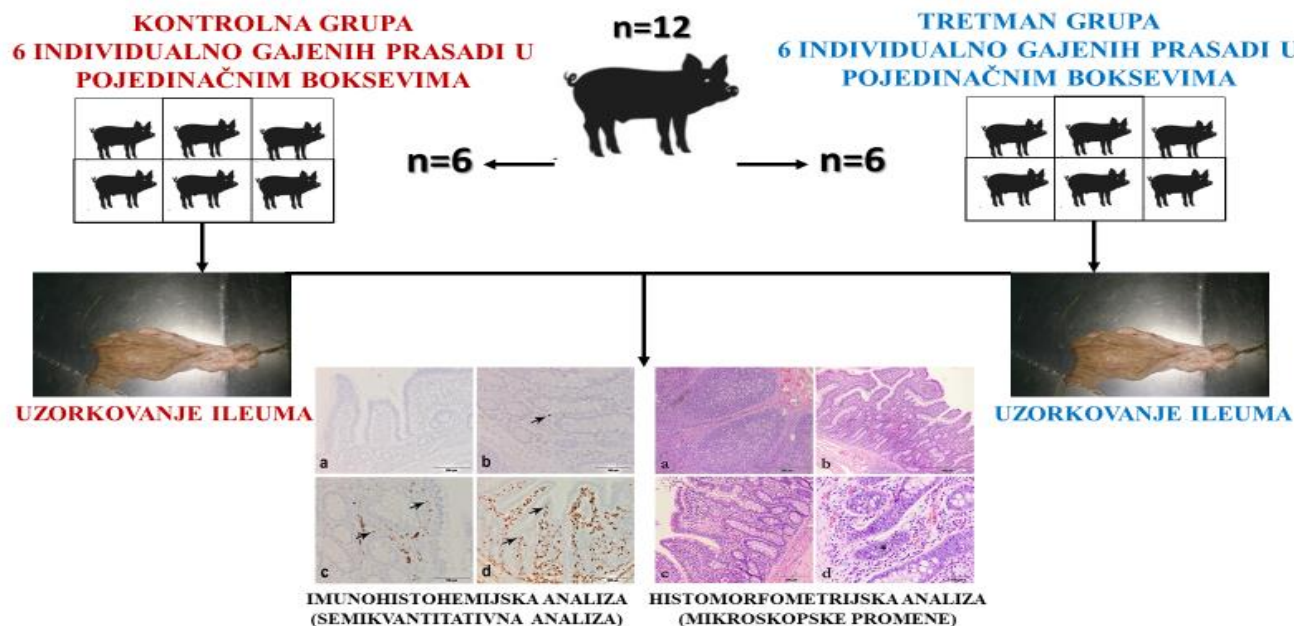
fecesa, direktno iz rektuma od svake životinje, u količini od 30 g. Pri uzimanju svakog uzorka korišćene su sterilne rukavice, a uzorci fecesa su pakovani u sterilne bočice. Uzorci su transportovani u ručnom frižideru na 4 °C do laboratorije gde su odmah analizirani.



Šema 4.1. Protokol za utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva putem real-time qPCR metode

A 1 - Formiranje kontrolnih grupa prasadi (devet bokseva sa po osam prasadi ukupno 72 praseta po farmi) na četiri farme različitih biosigurnosnih nivoa, A 2 – Sakupljanje zbirnih uzoraka fecesa od prasadi iz kontrolnih grupa (devet zbirnih uzoraka fecesa × tri uzorkovanja (0., 14. i 28. dan) ukupno 27 uzoraka po farmi × četiri farme (27 × 4=108 uzoraka), A 3 - Ekstrakcija dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) *L. intracellularis* od prasadi iz kontrolnih grupa, A 4 - Amplifikacija i kvantifikacija DNK bakterije *L. intracellularis* od prasadi iz kontrolnih grupa, A 5 - Vizuelizacija dobijenih rezultata. B 1 - Formiranje tretman grupa prasadi (devet bokseva sa po osam prasadi ukupno 72 praseta po farmi) na četiri farme različitih biosigurnosnih nivoa, B 2 - Sakupljanje zbirnih uzoraka fecesa od prasadi iz tretman grupa (devet zbirnih uzoraka fecesa × tri uzorkovanja (0., 14. i 28. dan) ukupno 27 uzoraka po farmi × četiri farme (27 × 4=108 uzoraka), B 3 - Ekstrakcija DNK *L. intracellularis* od prasadi iz tretman grupa, B 4 - Amplifikacija i kvantifikacija DNK bakterije *L. intracellularis* od prasadi iz tretman grupa, B 5 - Vizuelizacija dobijenih rezultata.

Za potrebe histoloških i imunohistohemijskih (IHC) analiza organizovan je odvojeni eksperiment koji je trajao 28 dana i koji se sastojao od individualno držanih prasadi (jedno prase po boksu). Šest prasadi je sačinjavalo kontrolnu grupu i šest prasadi je sačinjavalo tretman grupu (Šema 4.2.). Pre početka eksperimenta kod prasadi ovih grupa, takođe je PCR metodom potvrđeno prisustvo bakterije *L. intracellularis* u fecesu. Prasad kontrolne i tretman grupe su dobijala potpunu krmnu smešu istog sirovinskog i hemijskog sastava kao i prasad držana na farmama različitih biosigurnosnih nivoa, s tim da je prasad iz tretman grupe dobijala u hrani preparat Patente Herba® Plus u koncentraciji od 2 kg/t.



Šema 4.2. Protokol za utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva putem histoloških analiza

Uzorkovanje ileuma. Uzorci ileuma za histološka ispitivanja uzeti su od šest kontrolnih i šest tretiranih životinja držanih u individualnim boksevima, nakon klanja 29. dana od početka eksperimenta. Uzorci ileuma veličine 10 cm su fiksirani u 10% neutralnom puferizovanom formalinu i transportovani do laboratorije gde su odmah analizirani.

Fitogeni aditiv i način njegove primene. Fitogeni aditiv Patente Herba® Plus (Patent Co. DOO, Mišićevo, Srbija), dodat je u potpunu krmnu smešu za ishranu prasadi u tretman grupama u skladu sa preporukama proizvođača u koncentraciji od 2 kg/t hrane tokom četvoronedelnog trajanja eksperimenta, odnosno od 1. do 28. dana ekseperimenta. Preparat Patente Herba® Plus je mešavina etarskih ulja bogatih različitim aktivnim supstancama (timol, karvakrol, eukaliptol, *p*-cimen, mentol i eugenol) poreklom iz biljaka *Rosmarinus officinalis* (ruzmarin), *Thymus vulgaris* (timijan), *Origanum*

vulgare (origano), *Allium sativum* (beli luk), *Coriandrum sativum* (korijander) i *Eucalyptus globules* (eukaliptus), sa dodatkom ekstrakta biljke *Castanea sativa* (pitomi kesten), lizozima, klinoptilolita i nikotinamida.

4.2. Metode

4.2.1. Procena biosigurnosnih mera na farmama svinja

Za procenu biosigurnosnih mera korišćen je unapred uspostavljen sistem bodovanja biosigurnosnih mera pomoću validovanog upitnika BioCheck.UGent™ dostupnog na adresi https://biocheck.ugent.be/sites/default/files/2020-02/Pigs_EN_1.pdf (Prilog A). Biocheck.UGent™ sistem bodovanja formiran je na Univerzitetu u Gentu i njime se procenjuje biološka sigurnost na osnovu procene rizika, a već više godina se uspešno primenjuje u nekoliko zemalja EU (Postma i sar., 2016; Filippitzi i sar., 2017; Kruse i sar., 2018; Rodrigues da Costa i sar., 2019). BioCheck.UGent™ upitnik sastoji se od ukupno 109 pitanja grupisanih u 12 potkategorija, od toga šest potkategorija se odnosi na eksterne (spoljašnje) i šest potkategorija na interne (unutrašnje) biosigurnosne mere (Laanen i sar., 2013; Backhans i sar., 2015). Za izračunavanje eksternih i internih biosigurnosnih mera korišćene su ocene za svaku od potkategorija koje su bile između „0“ (potpuno odsustvo biosigurnosnih mera) i „100“ (maksimalna primena biosigurnosnih mera). Procena spoljašnjih i unutrašnjih biosigurnosnih mera na farmama izražena je kao prosečna vrednost rezultata dobijenih po odgovarajućim potkategorijama, a ukupna biosigurnost farme izračunata je kao srednja vrednost unutrašnje i spoljašnje biosigurnosti (Laanen et al., 2010). Pored toga, baza BioCheck.UGent™ omogućavala prikaz prosečnih vrednosti svih eksternih i internih potkategorija, kao i ukupnih vrednosti biosigurnosnih mera u Srbiji i svetu. Prikupljanje podataka je izvršeno na taj način što se papirna kopija upitnika Biocheck.UGent™ (https://biocheck.ugent.be/sites/default/files/2020-02/Pigs_EN_1.pdf) popunjavala na svakoj farmi, a nakon posete farmi, ti odgovori sa svake farme su unošeni direktno u online Biocheck.UGent™ upitnik (<https://biocheck.ugent.be/en/questionnaires/pigs/start-questionnaire?language=en>). Rezultati četiri različite farme predstavljeni su u programu Microsoft Office Excel.

4.2.2. Molekularnogenetička identifikacija i kvantifikacija DNK *L. intracellularis*

Molekularna identifikacija i kvantifikacija *L. intracellularis* izvršena je u Laboratoriji za genetiku domaćih životinja, divljači i pčela na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

4.2.2.1. Ekstrakcija DNK *L. intracellularis* iz fecesa

Ekstrakcija bakterijske DNK *L. intracellularis* urađena je primenom komercijalnog seta – ZR Fecal DNA Kit™ (Zymo Research, USA) prema uputstvu proizvođača na sledeći način:

1. Izmereno je 150 mg uzorka fecesa i stavljeno u epruvetu ZR BashingBead™ Lysis Tube 0,5 mm i dodato 750 µl Lysis Solution u ZR BashingBead™ Lysis Tube.
2. Sadržaj ZR BashingBead™ Lysis Tube je dobro homogenizovan na vorteks aparatu na maksimalnoj brzini u trajanju ≥ 5 minuta.
3. Nakon toga je sadržaj ZR BashingBead™ Lysis Tube centrifugiran 1 minut na $\geq 10\ 000 \times g$.
4. 400 µl supernatanta je prebačeno u kolonicu Zymo-Spin™ IV Spin Filter postavljenu u sabirnu epruvetu i centrifugiran je 1 minut na $7\ 000 \times g$.
5. Zatim je dodato 1200 µl Genomic Lysis Buffer u filtrat iz sabirne epruvete iz prethodnog koraka.
6. Potom je 800 µl mešavine prebačeno iz sabirne epruvete u kolonicu Zymo-Spin™ IIC Column postavljenu u novu sabirnu epruvetu i centrifugirano 1 minut na $10\ 000 \times g$.
7. Zatim se odbacuje iscedak (flow-through) iz sabirne epruvete iz prethodnog koraka.
8. Nakon toga je dodato 200 µl DNA Pre-Wash Buffer u kolonicu Zymo-Spin™ IIC Column postavljenu u novu sabirnu epruvetu i centrifugirano 1 minut na $10\ 000 \times g$.
9. Potom je dodato 500 µl Fecal DNA Wash Buffer u kolonicu Zymo-Spin™ IIC Column i centrifugirano 1 minut na $10\ 000 \times g$.
10. Zatim je prebačena kolonica Zymo-Spin™ IIC Column u čistu epruvetu (od 1,5 ml) i dodato 100 µl DNA Elution Buffer direktno na matriks kolonicu koja se centrifugira 30 sekundi na $10\ 000 \times g$.
11. Nakon toga, kolonica Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter je prebačena u čistu sabirnu epruvetu i dodato 600 µl Prep Solution i centrifugirano 3 minuta na $8\ 000 \times g$.
12. Na kraju je elucirana DNK prebačena u Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter kolonicu koja je postavljena u čistu epruvetu (od 1,5 ml) i centrifugirana tačno 1 minut na $8\ 000 \times g$.

Nakon ekstrakcije, koncentracija izolovane DNK izmerena je na aparatu BioSpec-nano Spectrophotometer (BioSpec-nano, Shimadzu, Kyoto, Japan) i izolati su čuvani na $-20\ ^\circ\text{C}$ do daljih analiza.

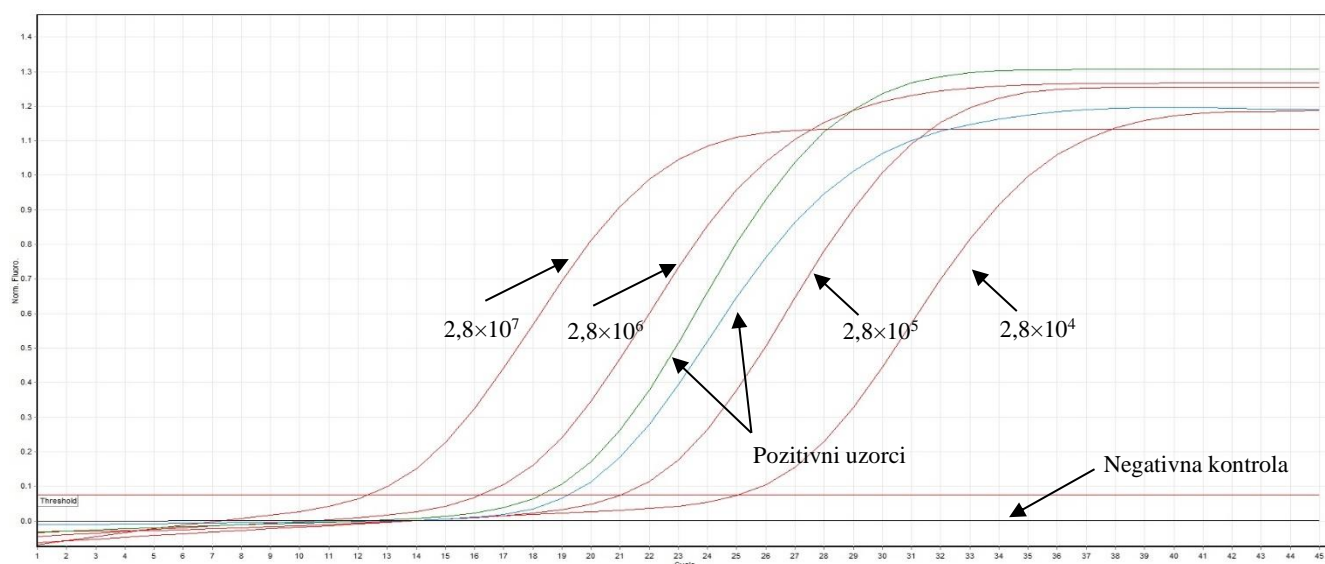
4.2.2.2. Real-time qPCR analiza

Amplifikacija i kvantifikacija bakterijske DNK obavljena je primenom real-time qPCR metode. Za Real-time qPCR kvantifikaciju DNK *L. intracellularis* korišćen je komercijalni set „KAPA PROBE FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal” (KAPA Biosystems, USA) uz upotrebu specifičnog para prajmera i TaqMan probe koji omogućavaju detekciju 16S ribozomalnog RNK (rRNK) gena *L. intracellularis*.

Tabela 4.2. Korišćeni prajmeri i proba za amplifikaciju DNK *L. intracellularis* u real-time qPCR

Naziv prajmera i probe	Sekvenca prajmera (5'-3')	Uzročnik	Ciljani gen	Veličina qPCR produkta (bp)
F prajmer	GTTCCCGGGCCTTGACAC	<i>L. intracellularis</i>	16S (rRNK) gena	61
R prajmer	CCGGCTTTGGGTAAAACCA			
TaqMan proba	FAM-CCGCCCGTCACACCACGAAA-TAMRA			

Prajmeri i proba, dizajnirani od strane Richter i sar. (2010), daju proizvod amplifikacije veličine 61 bazni par (Tabela 4.2.). Za potrebe kvantifikacije bakterija u uzorku, korišćen je metod apsolutne kvantifikacije. U svakoj reakciji su korišćena serijska razblaženja standardne pozitivne kontrole (Law DNA LC standard) koja je sadržala $2,8 \times 10^7$ gen-kopija (donirana od strane Danskog Tehničkog Univerziteta - Nacionalnog Veterinarskog Instituta - Technical University of Denmark – National Veterinary Institute) na osnovu kojih je formirana standardna kriva i vršen proračun kopija za ispitivane uzorke (Slika 4.1.). Real-time qPCR reakcija izvedena je na aparatu „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen, Valencia, CA). Efikasnost amplifikacije (E) je izračunata pomoću nagiba standardne krive primenom jednačine: $E = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ (Rasmussen, 2001). Kao negativna kontrola korišćena je voda (Nuclease free water) koja je dodata u pripremljenu PCR smešu umesto ispitivane DNK.



Slika 4.1. Real-time qPCR fluorescentnih kriva standarda za *L. intracellularis*. Serijska razblaženja standarda od $2,8 \times 10^7$ do $2,8 \times 10^4$, pozitivni uzorci i negativna kontrola.

Za izvođenje real-time qPCR amplifikacije korišćen je komercijalni set hemikalija KAPA PROBE FAST PCR Kit Master Mix (2X) Universal (KAPA Biosystems, USA). Reakciona smeša bila je zapremine 20 μ l i sadržala je: 3 μ l PCR-grade water, 10 μ l KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) Universal, 1 μ l F prajmera, 1 μ l R prajmera, 1 μ l TaqMan proba i 4 μ l izolovane DNK.

Vizuelizacija umnoženih produkata ostvarena je beleženjem nivoa fluorescencije u vidu specifičnih dijagrama a zatim je uz pomoć softvera (Rotor-Gene Q Series Software), koji je obezbeđen od strane proizvođača aparata „Rotor-Gene Q 5plex“ i rezultata amplifikacije standardnih razblaženja pozitivne kontrole izvršena i kvantifikacija DNK u ispitivanim uzorcima.

Kompletna metodologija za molekularnogenetičke analize u ovom eksperimentu (identifikacija i kvantifikacija uzročnika) obavljena je u skladu sa protokolom Richter i sar. (2010), a efikasnost amplifikacije real-time qPCR produkata prema Rasmussen, (2001) i sve optimizovao prema našim eksperimentalnim uslovima Draskovic i sar., (2018), Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Temperaturni protokol real-time qPCR reakcije (Richter i sar., 2010, optimizovano po Draskovic i sar., 2018).

1.	50 °C	2 min	Inicijalni korak
2.	95 °C	10 min	Aktivacija DNK polimeraze
3.	95 °C	15 sec	Denaturacija
4.	60 °C	1 min	
5.	72 °C	30 sec	Hibridizacija
			DNK ekstenzija

4.2.3. Histološka ispitivanja

Nakon klanja, evisceracije organa i detaljnog makroskopskog pregleda izvršeno je uzorkovanje isečaka creva za histomorfometrijska i imunohistohemijska ispitivanja. Histološka ispitivanja uzoraka tkiva izvršena su na Katedri za patološku morfologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Isecci tkiva distalnog ileuma (nedaleko od ileocekalne valvule) veličine 10 cm su fiksirani u 10% neutralnom puferizovanom formalinu u trajanju od 48 časova. Nakon fiksacije izvršeno je modeliranje tkiva posle kojeg je tkivo dehidrirano kroz niz razblaženja alkohola, i to 70%, 96% i apsolutni alkohol, u automatskom tkivnom procesoru za tkiva "Leica TP 1020", a nakon toga su uzorci prosvetljavani u ksilolu i impregnirani parafinom. Tkivo je uklopljeno u parafinske kalupe u parafinatoru "Leica EG 1120". Parafinski kalupi su sečeni na isečke debljine 4 μm na mikrotomu "Leica RM 2235", zatim deparafinizovani u ksilolu, rehidrirani kroz niz razblaženja etanola (apsolutni alkohol, 96% i 70%,) i isprani destilovanom vodom, a potom su uzorci obojeni tehnikom hematoksilin-eozin za histomorfometrijsku analizu (Smirnov i sar., 2005).

4.2.3.1. Histomorfometrijska analiza

Na ovako pripremljenim histološkim preparatima opisane su mikroskopske promene uzoraka ileuma, a nakon toga su izvršena sledeća morfometrijska merenja (izražena u μm): visina resice, širina resice, dubina kripte i broj peharastih ćelija/100 enterocita. Ovi parametri su određivani na preparatima svake životinje, na deset nasumično odabranih, dobro orjentisanih crevnih resica korišćenjem svetlosnog mikroskopa sa objektivom uveličanjem 10 \times . Visina resice dobijena je merenjem od mesta spajanja resice sa kriptom do vrha resice, a dubina kripte merenjem rastojanja od baze kripte do mesta spajanja kripte sa resicom. Širina crevne resice merena je na sredini visine resice kao rastojanje od njenih bočnih krajeva. Na osnovu dobijenih merenja deljenjem izračunat je odnos visina resice/dubina kripte (Aptekmann i sar., 2001), dok je površina resica izračunata iz podataka visine i širine resica (Van Zuidewijn i sar., 1992). Data merenja su izvedena i digitalne fotografije napravljene pomoću optičkog mikroskopa Olympus BX51 sa digitalnom kamerom CCD (Color View III, Olympus) koja je povezana kompjuterskim softverom za analizu slike (Olympus Cell B, Olympus, Japan).

4.2.3.2. Imunohistohemijska (IHC) metoda

Imunohistohemijska analiza izvršena je sa monoklonskim antitelima specifičnim za *L. intracellularis* (Law1- DK, 21 kDa molekula *L. intracellularis*, Danski Tehnički Univerzitet - Nacionalni veterinarski institut - Technical University of Denmark – National Veterinary Institute) (Boesen i sar., 2005).

Prvo je izvedeno demaskiranje antigena, tj. razotkrivanje antigena u isečcima creva kuvanjem isečaka u citratnom puferu (pH 6,0) u mikrotalasnoj pećnici na 560 W tokom 21 minuta. Endogena peroksidaza blokirana je u 0,6 % rastvoru H₂O₂ u TBS puferu (Tris-buffered saline) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6) u trajanju od 20 minuta. Nakon toga isečci su isprani u TBS puferu u trajanju od pet minuta i inkubirani sa primarnim antitelima (razređenja 1:100 u TBS puferu) (Law1- DK, 21 kDa molekula *L. intracellularis*, Danski Tehnički Univerzitet - Nacionalni veterinarski institut - Technical University of Denmark – National Veterinary Institute) na sobnoj temperaturi (22 ± 3 °C) tokom 60 minuta. Nakon toga je sledilo ispiranje tri puta po pet minuta u TBS puferu. Zatim su isečci inkubirani 30 minuta sa sekundarnim antitelima. Potom je vršeno ispiranje tri puta po pet minuta u TBS puferu, a reakcija je vizuelizovana sa DAB + (3,3'-diaminobenzidin tetrahidrohlorid, DAKO, K3468) u trajanju od 15 minuta. Kontrastiranje je obavljeno koncentrovanim hematoksilinom (Majerovim (Mayer) hematoksilinom) u periodu od 15 sekundi. Na kraju, nakon bojenja izvršeno je montiranje isečaka pomoću Glycergela (Dako, C563). Vizuelizacija je bila obavljena primenom kita Novolink™ Min Polymer Detection System (reference RE7290-K; Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) prema uputstvu proizvođača. Negativnom kontrolom smatrali su se isečci ileuma koji su tretirani na isti način, sa tom razlikom što su isečci umesto primarnog antitela inkubirani fosfatnim puferom (PBS). Isečci ileuma u kojima je proliferativna enteropatija prethodno potvrđena smatrani su za pozitivnu kontrolu. Pozitivna reakcija očitavala se pojavom precipitata smeđe boje, dok je kod negativne reakcije izostala pojava precipitata smeđe boje.

4.2.3.3. Semikvantitativna analiza

Dobijeni rezultati IHC kvantifikovani su na osnovu semikvantitativne analize intenziteta ekspresije antigena *L. intracellularis*. Kriterijum primenjen za semikvantitativnu analizu bio je sličan onima koje su prethodno usvojili drugi autori (Boesen i sar., 2004; Riber i sar., 2011; Vannucci i sar., 2012), a u uslovima našeg eksperimenta optimizovali Draskovic i sar. (2018). Na osnovu IHC nalaza uzorci ilealnog tkiva su ocenjeni u skladu sa kriterijumima datim u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Kriterijum za ocenu uzoraka ileuma primenom IHC metode (optimizovano po Draskovic i sar., 2018).

Gradus 0	U uzorcima ileuma se ne uočava ekspresija antigena <i>L. intracellularis</i> .
Gradus 1	Ekspresija antigena je ustanovljena u pojedinačnim makrofagima koji su grupisani u manje fokuse koji su lokalizovani u lamini propriji.
Gradus 2	Ekspresija antigena <i>L. intracellularis</i> se uočava u citoplazmi makrofaga u vidu depozita smeđe boje, imunopozitivni makrofagi se uočavaju u multifokalnim područjima lamine proprije ileuma.
Gradus 3	Ekspresija antigena je vidljiva u citoplazmi velikog broja makrofaga koji su difuzno raspoređeni po celoj lamini propriji ileuma.

4.2.4. Praćenje proizvodnih rezultata

Na svakoj od četiri ispitivanih farmi zoohigijenski uslovi smeštaja bili su isti, kako za tretman grupu, tako i za kontrolnu grupu prasadi i životinje nisu bile izložene nepotrebnom stresu koji može negativno uticati na stepen rasta (Tan and Shackleton, 1990; Hessing and Tielen, 1994) tokom trajanja eksperimenta. Obavljeno je grupno merenje prasadi iz svakog boksa (9 po grupi) na početku ogleda (0. dana) i na kraju ogleda (28. dana). Na osnovu podataka o telesnoj masi na početku i kraju eksperimenta izračunat je ukupan i dnevni prirast prasadi. Svakodnevno je merena količina utrošene hrane i rastur hrane po boksu i na osnovu dobijenih podataka izračunata je ukupna i dnevna konzumacija hrane za period trajanja eksperimenta. Na osnovu podataka o utrošku hrane i prirastu izračunata je konverzija hrane prasadi (tj. utrošak hrane po kilogramu prirasta) za period od četiri nedelje koliko je trajao eksperiment. Kompletna procedura praćenja proizvodnih rezultata obavljena je u skladu sa protokolom Draskovic i sar. (2018).

4.3. Statistička analiza

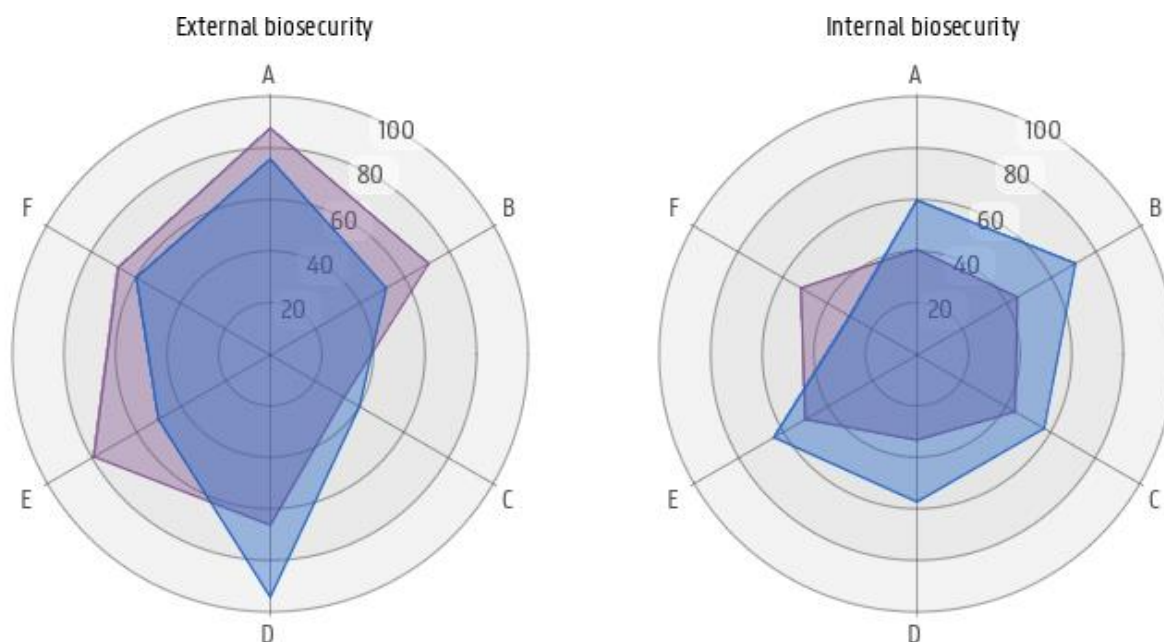
U statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćene su osnovne statističke metode i deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, minimalna, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije). Normalna distribucija dobijenih rezultata određena je preko vrednosti koeficijenata asimetričnosti (skewness) i spljoštenosti (kurtosis), i Shapiro–Wilk normality testom. Za utvrđivanje značajnosti razlika između srednjih vrednosti dve ispitivane grupe korišćen je t-test, a za ispitivanje signifikantnih razlika između tri i više posmatranih grupa, univarijatna analiza varijanse (ANOVA), uz Tukey *post-hoc* test. Dvofaktorijalnom analizom varijanse (two-way ANOVA) utvrđen je efekat tretmana fitogenim aditivom (T) i biosigurnosnog nivoa (BS), i njihove interakcije (T×BS) na proizvodne rezultate prasadi (ukupni prirast, dnevni prirast, ukupna konzumacija, dnevna konzumacija,

konverzija). Zavisnost broja fecesom izlučenih bakterija *L. intracellularis*, biosigurnosnih nivoa farme, tretmana fitogenim aditivom i dužine tretmana izražena je *Spearman*-ovim koeficijentom korelacije (r), gde se smatra da kod vrednosti $r=0,0$ - nema linearne zavisnosti; $r=0,1-0,3$ - slaba linearna zavisnost; $r=0,4-0,6$ - umerena linearna zavisnost; $r=0,7-0,90$ - jaka linearna zavisnost i $r=1$ - perfektna linearna zavisnost (Akoglu, 2018). Rezultati imunohistohemijskih analiza izraženi su procentualno, a značajnost razlika ispitivana je Fisher's exact testom. Signifikantnost razlika utvrđena je na nivoima značajnosti od 5%. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata izvršena je u statističkim paketima PrismaPad 6.00 i IBM SPSS 20 (IBM, Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 1

Eksterne biosigurnosne mere na farmi BS 1. Rezultati procene eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 po potkategorijama prikazani su na dva grafikona (Grafikon 5.1, Grafikon 5.2.) i jednoj tabeli (Tabela 5.1.). Iz prikazanih rezultata na grafikonima i tabeli se vidi da najveću ocenu u okviru eksternih biosigurnosnih mera farma BS 1 imala je u potkategoriji koja se odnosila na zaposlene i posetioce (94%), što je bilo više u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (66%) i svetu (69%). Sve ostale potkategorije (kupovina životinja i semena; transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja; hrana, voda i oprema; kontrola štetočina i ptica; lokacija farme) bile su lošije ocenjene u odnosu na prosečne vrednosti u Srbiji i svetu, izuzev potkategorije vezane za snabdevanje hrane, vode i opreme (40%), koja je imala najnižu ocenu u ovoj kategoriji. Međutim to je bila veća vrednost od prosečne vrednosti u Srbiji (33%), a niža u poređenju sa prosečnim vrednostima u svetu (50%). Ukupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 bila je 64%, što je bilo niže u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (69%) i svetu (70%).



Grafikon 5.1.

Originalan prikaz rezultata obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 1. Brojevi predstavljaju skalu bodovanja biosigurnosnih mera; plava boja označava biosigurnosne vrednosti na farmi BS 1, dok ljubičasta boja označava prosečne biosigurnosne vrednosti u Srbiji; oznake A, B, C, D, E i F predstavljaju potkategorije eksternih i internih biosigurnosnih mera prikazane na grafikonima (Grafikon 5.2. i Grafikon 5.3.).

Tabela 5.1. Originalan prikaz rezultata obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 1

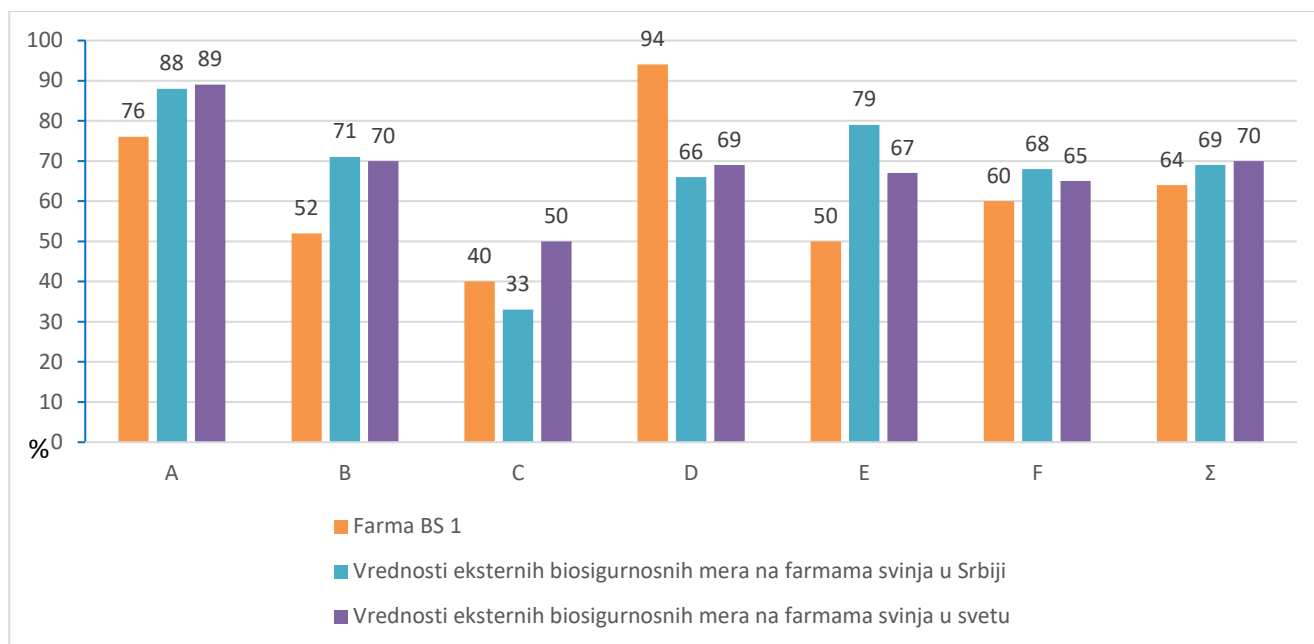


BIOCHECK.UGENT

ID: 21868/691653/w2_1/F

PIG

Nr	Description	Score	Country average	Global average
<i>External biosecurity</i>				
A	<u>Purchase of animals and semen</u>	76 %	88 %	89 %
B	<u>Transport of animals, removal of manure and dead animals</u>	52 %	71 %	70 %
C	<u>Feed, water and equipment supply</u>	40 %	33 %	50 %
D	<u>Personnel and visitors</u>	94 %	66 %	69 %
E	<u>Vermin and bird control</u>	50 %	79 %	67 %
F	<u>Environment and region</u>	60 %	68 %	65 %
	Subtotal External biosecurity:	64 %	69 %	70 %
<i>Internal biosecurity</i>				
A	<u>Disease management</u>	60 %	41 %	66 %
B	<u>Farrowing and suckling period</u>	71 %	45 %	55 %
C	<u>Nursery unit</u>	57 %	44 %	65 %
D	<u>Fattening unit</u>	57 %	33 %	67 %
E	<u>Measures between compartments and the use of equipment</u>	64 %	50 %	48 %
F	<u>Cleaning and disinfection</u>	30 %	52 %	59 %
	Subtotal Internal biosecurity:	56 %	46 %	58 %
<i>N/A = Not applicable</i>		Total:	60 %	58 %
			58 %	64 %

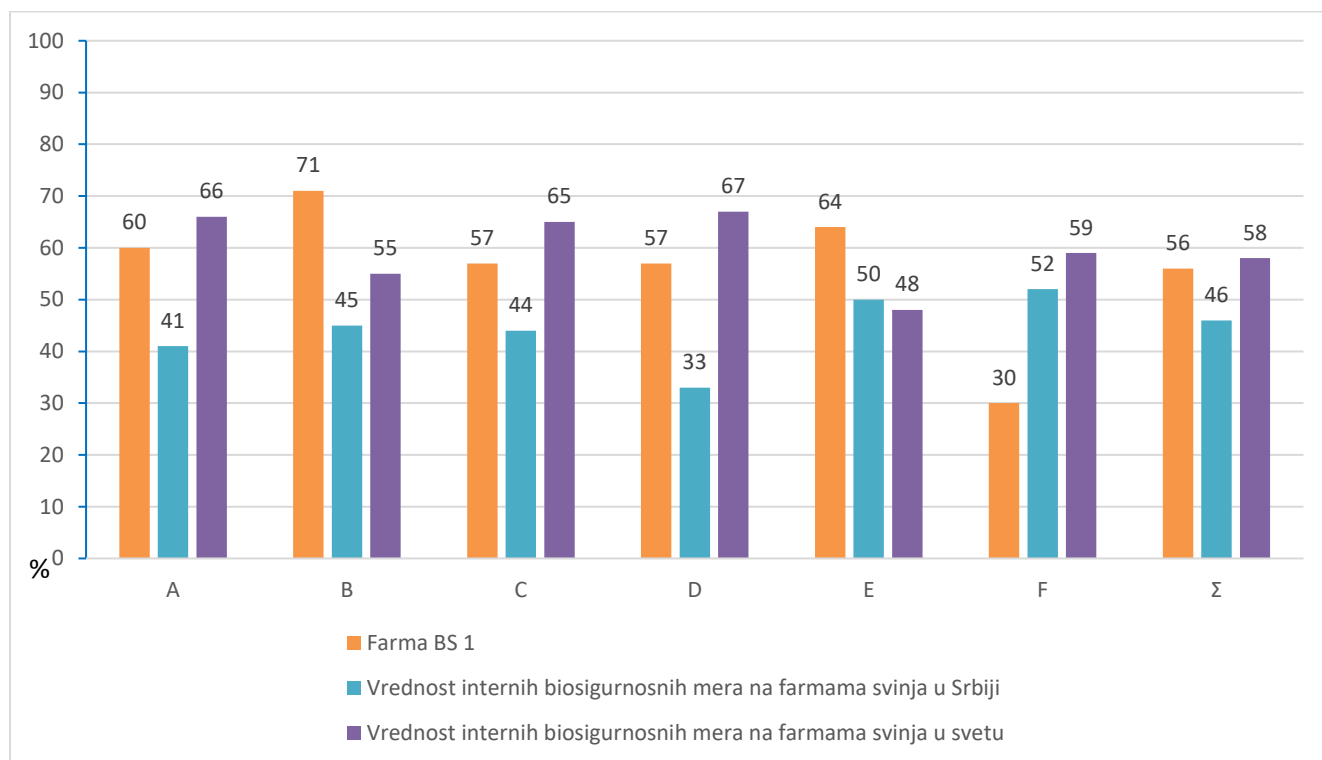


Grafikon 5.2.

Komparativni prikaz vrednosti eksterinih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 u odnosu na prosečne vrednosti eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji i svetu: A - Kupovina životinja i semena; B - Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja; C - Hrana, voda i oprema; D - Zaposleni i posetioци; E - Kontrola štetočina i ptica; F - Lokacija farme; Σ -kupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera.

Interne biosigurnosne mere na farmi BS 1. Rezultati internih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 po potkategorijama prikazani su na dva grafikona (Grafikon 5.1, Grafikon 5.3.) i jednoj tabeli (Tabela 5.1.). U okviru internih biosigurnosnih mera najveću ocenu dobila je potkategorija koja se odnosila na mere sprovedene u prasilištu i tokom perioda dojenja (71%), što je bolje ocenjeno od prosečnih vrednosti u Srbiji (45%) i svetu (55%). Bolje od prosečnih vrednosti u Srbiji i svetu na farmi BS 1 bila je ocenjena i potkategorija vezana za mere između odeljaka i korišćenje opreme (64%). Potkategorije koje se odnose na kontrolu bolesti (60%), mere u odgajivalištu (57%) i tovilištu imale su bolje ocene (57%) u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji, a lošije u odnosu na svet. Potkategorija sa najnižom ocenom odnosila se na čišćenje i dezinfekciju (30%), što je bilo niže od prosečnih vrednosti kako u Srbiji (52%), tako i u svetu (59%). Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera za farmu BS1 iznosila je 56%, i prema ovom parametru bila je bolje ocenjena u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (46%), a lošije u odnosu na svet (58%).

Ukupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 iznosila je 64% (Grafikon 5.2, Tabela 5.1.), i ova kategorija je bila bolje ocenjena od kategorije internih biosigurnosnih mera na datoj farmi 56% (Grafikon 5.3, Tabela 5.1.)



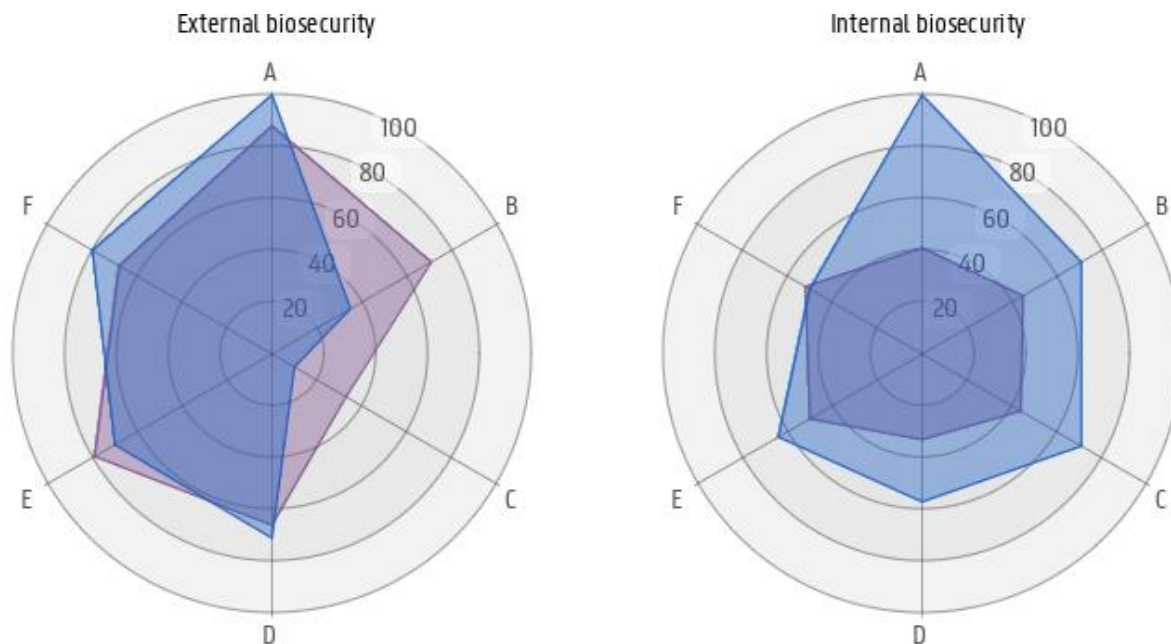
Grafikon 5.3.

Komparativni prikaz vrednosti internih biosigurnosnih mera na farmi BS 1 u odnosu na prosečne vrednosti internih biosigurnosnih mera farmi u Srbiji i svetu: A - Kontrola bolesti ; B - Prasilište i period dojenja; C - Odgajivalište; D - Tovilište; E - Mere između odeljaka i korišćenje opreme; F - Čišćenje i dezinfekcija; Σ - Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera.

5.2. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 2

Eksterne biosigurnosne mere na farmi BS 2. Rezultati ocena potkategorija eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 pokazali su izraženiju varijabilnost u odnosu na ocene internih biosigurnosnih mera (Grafikon 5.4, Grafikon 5.5. i Tabela 5.2.). Maksimalnu ocenu eksternih biosigurnosnih mera imala je potkategorija koja se odnosila na kupovinu životinja i semena (100%), što je bilo više u odnosu na prosečne vrednosti u Srbiji (88%) i svetu (89%). Ocene za potkategorije zaposleni i posetoci, kontrola štetočina i ptica i lokacija farme bile su bliske srednjim vrednostima ocena za ove potkategorije eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji i svetu. Najnižu vrednost imala je potkategorija vezana za snabdevanje hrane, vode i opreme (10%), i bila je lošije ocenjena u odnosu na prosečne

vrednosti u Srbiji (33%) i svetu (50%). Dodatno, potkategorija vezana za transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja sa ocenom od 35% takođe je bila ispod prosečne vrednosti u Srbiji (71%) i svetu (70%) za ovaj parametar. Ukupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 iznosila je 62%, i prema ovom rezultatu nalazila se ispod proseka za farme u Srbiji (69%) i svetu (70%).



Grafikon 5.4.

Originalan prikaz rezultata obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 2. Brojevi predstavljaju skalu bodovanja biosigurnosnih mera; plava boja označava biosigurnosne vrednosti na farmi BS 2, dok ljubičasta boja označava prosečne biosigurnosne vrednosti u Srbiji; oznake A, B, C, D, E i F predstavljaju potkategorije eksternih i internih biosigurnosnih mera prikazane na grafikonima (Grafikon 5.5. i Grafikon 5.6.).

Tabela 5.2. Originalan prikaz rezulta obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 2

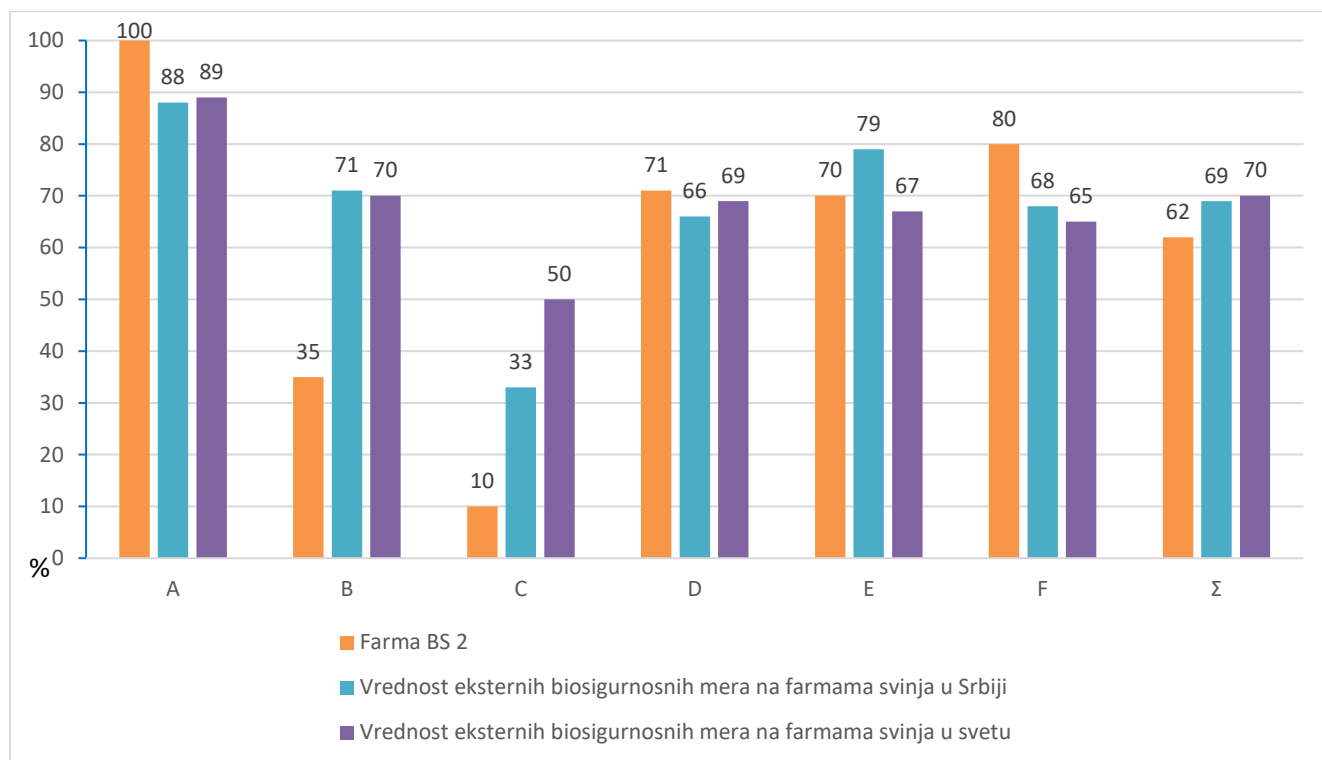


BIOCHECK.UGENT

ID: 21870/691653w/2_1/F

PIG

Nr	Description	Score	Country average	Global average
<i>External biosecurity</i>				
A	<u>Purchase of animals and semen</u>	100 %	88 %	89 %
B	<u>Transport of animals, removal of manure and dead animals</u>	35 %	71 %	70 %
C	<u>Feed, water and equipment supply</u>	10 %	33 %	50 %
D	<u>Personnel and visitors</u>	71 %	66 %	69 %
E	<u>Vermin and bird control</u>	70 %	79 %	67 %
F	<u>Environment and region</u>	80 %	68 %	65 %
	Subtotal External biosecurity:	62 %	69 %	70 %
<i>Internal biosecurity</i>				
A	<u>Disease management</u>	100 %	41 %	66 %
B	<u>Farrowing and suckling period</u>	71 %	45 %	55 %
C	<u>Nursery unit</u>	71 %	44 %	65 %
D	<u>Fattening unit</u>	57 %	33 %	67 %
E	<u>Measures between compartments and the use of equipment</u>	64 %	50 %	48 %
F	<u>Cleaning and disinfection</u>	50 %	52 %	59 %
	Subtotal Internal biosecurity:	66 %	46 %	58 %
<i>N/A = Not applicable</i>		Total:	64 %	58 %
				64 %

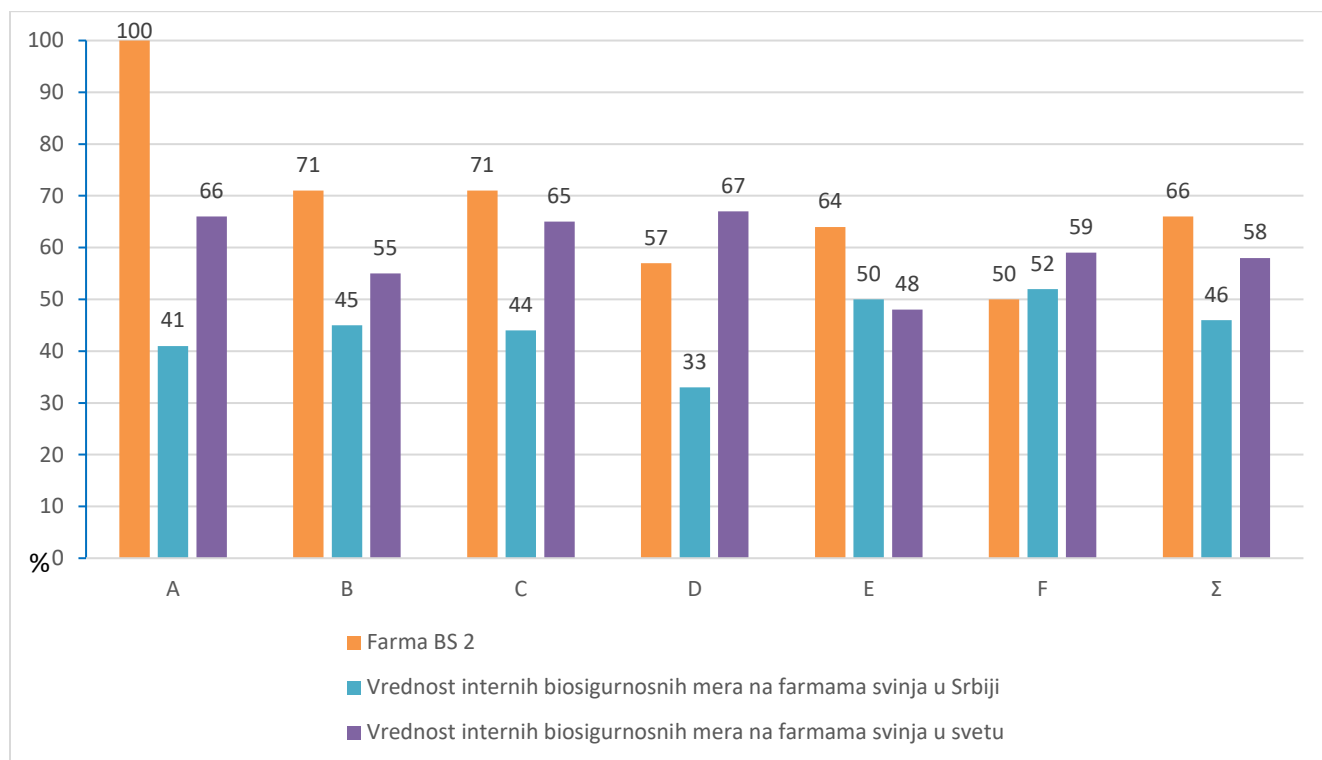


Grafikon 5.5.

Komparativni prikaz vrednosti eksterinih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 u odnosu na prosečne vrednosti eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji i svetu: A - Kupovina životinja i semena; B - Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja; C - Hrana, voda i oprema; D - Zaposleni i posetioci; E - Kontrola štetočina i ptica; F - Lokacija farme; Σ -kupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera.

Interne biosigurnosne mere na farmi BS 2. Rezultati internih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 prikazani su na dva grafikona (Grafikon 5.4, Grafikon 5.6.) i jednoj tabeli (Tabela 5.2.). Najveću vrednost u okviru internih biosigurnosnih mera imala je potkategorija kontrola bolesti (100%), koja je bila za 59% više ocenjena u poređenju sa prosekom u Srbiji, i za 34% u poređenju sa prosekom u svetu. Ostale potkategorije internih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 imale su više vrednosti od prosečnih vrednosti za farme u Srbiji, izuzev čišćenja i dezinfekcije sa ocenom od 50%, koja je bila niža od prosečnih vrednosti za ovaj parametar u Srbiji (52%) i svetu (59%), pa je ova potkategorija ujedno bila i najlošije ocenjena interna biosigurnosna mera na farmi BS 2. Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera bila je 66%, što je bilo bolje ocenjeno u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (46%) i svetu (58%).

Naime, na farmi BS 2 ukupne interne biosigurnosne mere su bile bolje sprovedene (66%, Grafikon 5.6. i Tabela 5.2.) u odnosu na ukupne eksterne biosigurnosne mere (62%, Grafikon 5.5. i Tabela 5.2.).

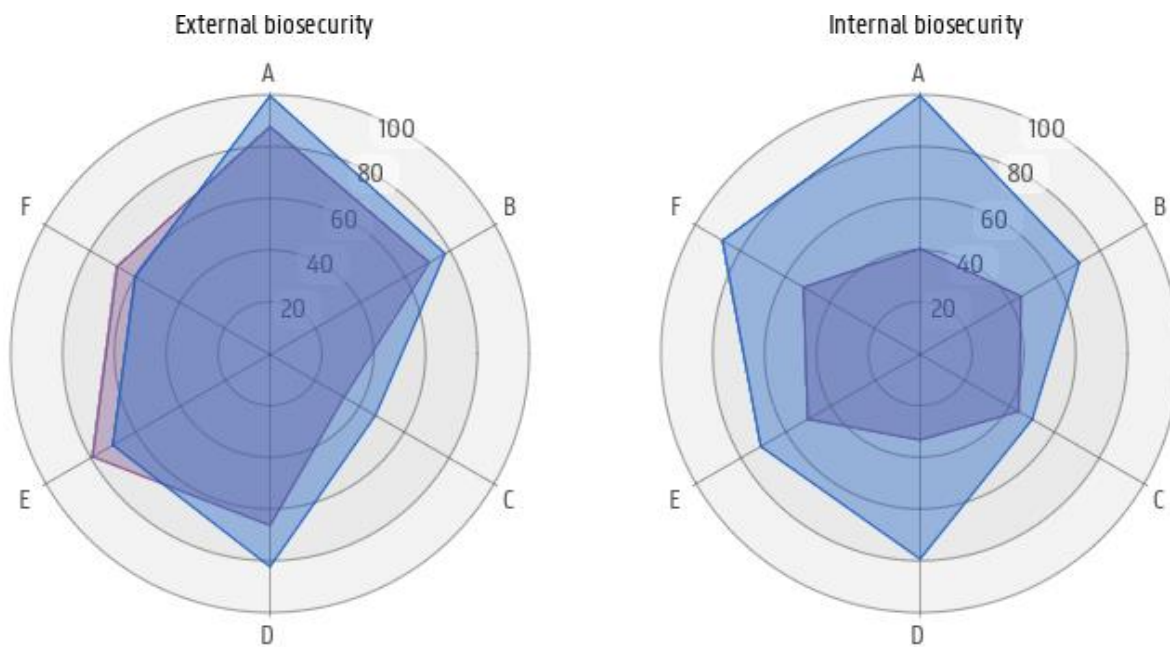


Grafikon 5.6.

Komparativni prikaz vrednosti internih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 u odnosu na prosečne vrednosti internih biosigurnosnih mera farmi u Srbiji i svetu: A - Kontrola bolesti ; B - Prasilište i period dojenja; C - Odgajivalište; D - Tovilište; E - Mere između odeljaka i korišćenje opreme; F - Čišćenje i dezinfekcija; Σ - Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera.

5.3. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 3

Eksterne biosigurnosne mere na farmi BS 3. Na grafikonima (Grafikon 5.7, Grafikon 5.8.) i tabeli (Tabela 5.3.) prikazani su rezultati eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 3. Na farmi BS 3 najveću, a ujedno i maksimalnu vrednost (100%) u okviru eksternih biosigurnosnih mera imala je potkategorija kupovina životinja i semena, i ocena ove potkategorije bila je viša od prosečne vrednosti u Srbiji (88%) i svetu (89%). Bolje ocene u odnosu na prosečne vrednosti u Srbiji i svetu dobile su i potkategorije transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja (78%) i zaposleni i posetioci (82%). Najnižu vrednost imala je potkategorija koja se odnosila na snadbavanje hrane, vode i opreme (47%), koja je bila iznad prosečne vrednosti u Srbiji (33%), ali lošije ocenjena u poređenju sa prosečnom vrednošću za ovaj parametar na farmama u svetu (50%). Na farmi BS 3 ukupne eksterne biosigurnosne mere su bile bolje ocenjene (77%) u odnosu na prosečne vrednosti ukupnih eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji (69%) i svetu (70%).



Grafikon 5.7.

Originalan prikaz rezultata obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 3. Brojevi predstavljaju skalu bodovanja biosigurnosnih mera; plava boja označava biosigurnosne vrednosti na farmi BS 2, dok ljubičasta boja označava prosečne biosigurnosne vrednosti u Srbiji; oznake A, B, C, D, E i F predstavljaju potkategorije eksternih i internih biosigurnosnih mera prikazane na grafikonima (Grafikon 5.8. i Grafikon 5.9.).

Tabela 5.3. Originalan prikaz rezulta obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 3



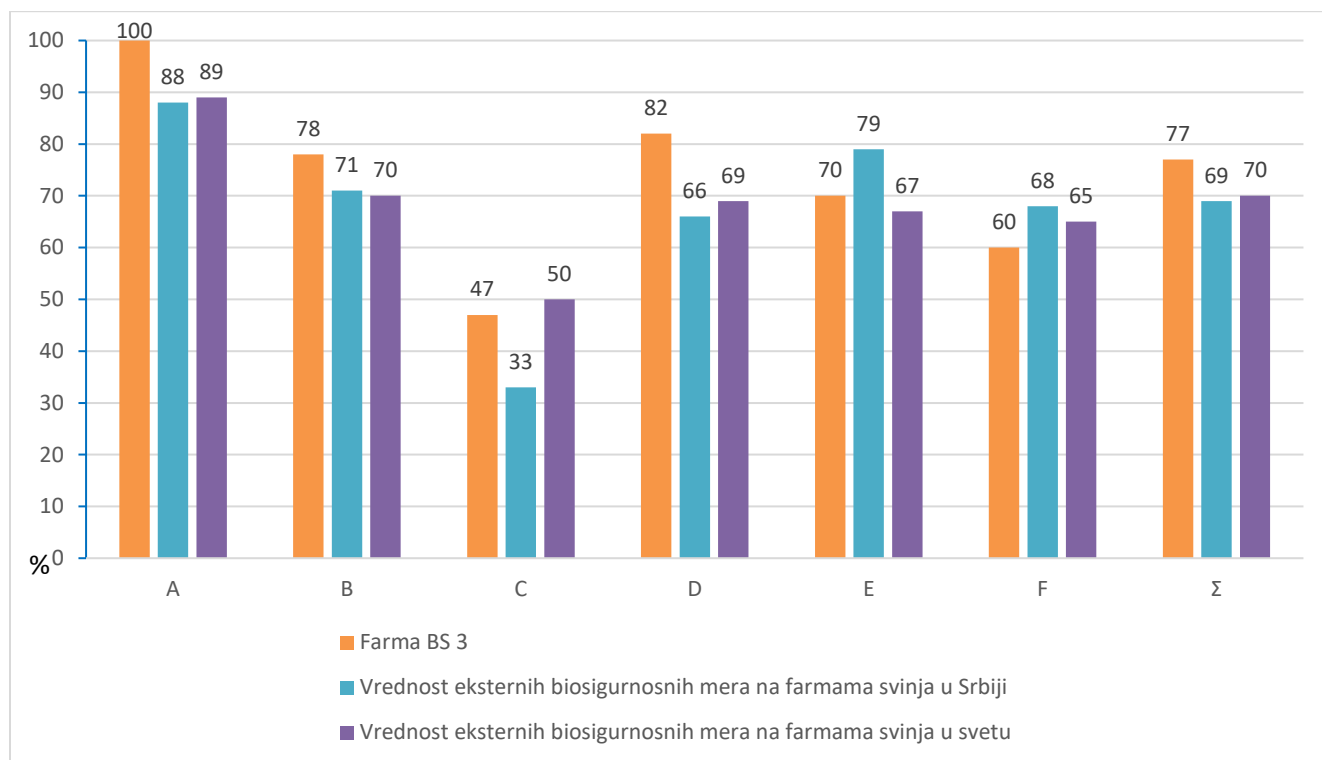
BIOCHECK.UGENT

ID: 21867/691653N/2_1/R

PIG

Nr	Description	Score	Country average	Global average
<i>External biosecurity</i>				
A	<u>Purchase of animals and semen</u>	100 %	88 %	89 %
B	<u>Transport of animals, removal of manure and dead animals</u>	78 %	71 %	70 %
C	<u>Feed, water and equipment supply</u>	47 %	33 %	50 %
D	<u>Personnel and visitors</u>	82 %	66 %	69 %
E	<u>Vermin and bird control</u>	70 %	79 %	67 %
F	<u>Environment and region</u>	60 %	68 %	65 %
Subtotal External biosecurity:		77 %	69 %	70 %
<i>Internal biosecurity</i>				
A	<u>Disease management</u>	100 %	41 %	66 %
B	<u>Farrowing and suckling period</u>	71 %	45 %	55 %
C	<u>Nursery unit</u>	50 %	44 %	65 %
D	<u>Fattening unit</u>	79 %	33 %	67 %
E	<u>Measures between compartments and the use of equipment</u>	71 %	50 %	48 %
F	<u>Cleaning and disinfection</u>	88 %	52 %	59 %
Subtotal Internal biosecurity:		76 %	46 %	58 %
Total:		77 %	58 %	64 %

N/A = Not applicable

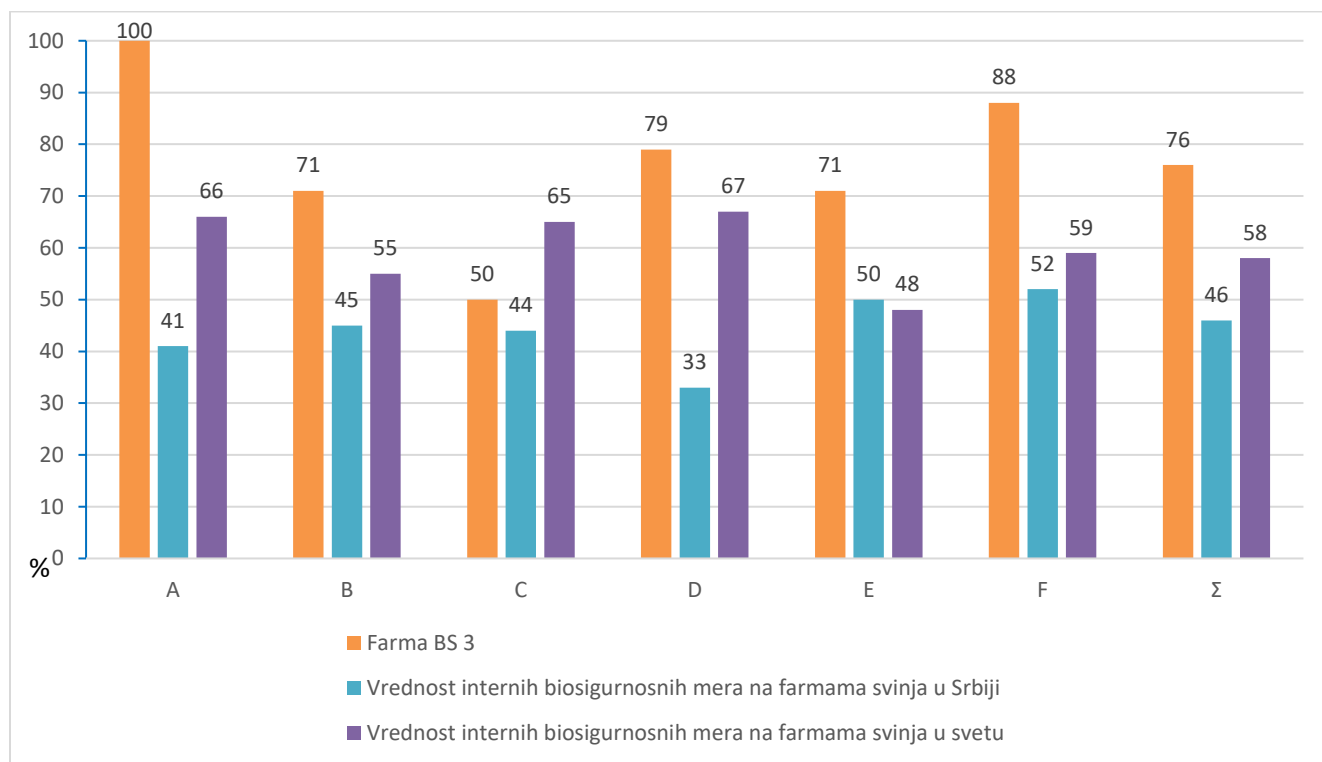


Grafikon 5.8.

Komparativni prikaz vrednosti eksterinih biosigurnosnih mera na farmi BS 3 u odnosu na prosečne vrednosti eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji i svetu: A - Kupovina životinja i semena; B - Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja; C - Hrana, voda i oprema; D - Zaposleni i posetioci; E - Kontrola štetočina i ptica; F - Lokacija farme; Σ -kupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera.

Interne biosigurnosne mere na farmi BS 3. Na grafikonima (Grafikon 5.7, Grafikon 5.9.) i tabeli (Tabela 5.3.) prikazani su rezultati internih biosigurnosnih mera na farmi BS 3 može se uočiti da su pet od šest potkategorija internih biosigurnosnih mera bile bolje ocenjene u odnosu na prosečne vrednosti farmi u Srbiji i svetu. Najveću vrednost je imala potkategorija koja se odnosila na kontrolu bolesti (100%), a za njom slede čišćenje i dezinfekcija (88%), mere koje se primenjuju u tovilištu (79%), pa zatim prasilište i period dojenja (71%) i mere između odeljaka i korišćenje opreme (71%). Potkategorija vezana za mere koje se primenjuju u odgajivalištu prasadi je bila najlošije ocenjena na farmi BS 3 (50%), i prema ovoj vrednosti farma BS 3 je bila ispod proseka farmi u svetu (65%), ali i iznad proseka u odnosu na farme u Srbiji (44%). Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera iznosila je 76%, što je bilo bolje ocenjeno u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (46%) i svetu (58%).

Poređenjem rezultata, ukupne eksterne biosigurnosne mere (77%, Grafikon 5.8. i Tabela 5.3.) bile su bolje ocenjene za 1% u odnosu na interne biosigurnosne mere na farmi BS 3 (76%, Grafikon 5.9. i Tabela 5.3.).



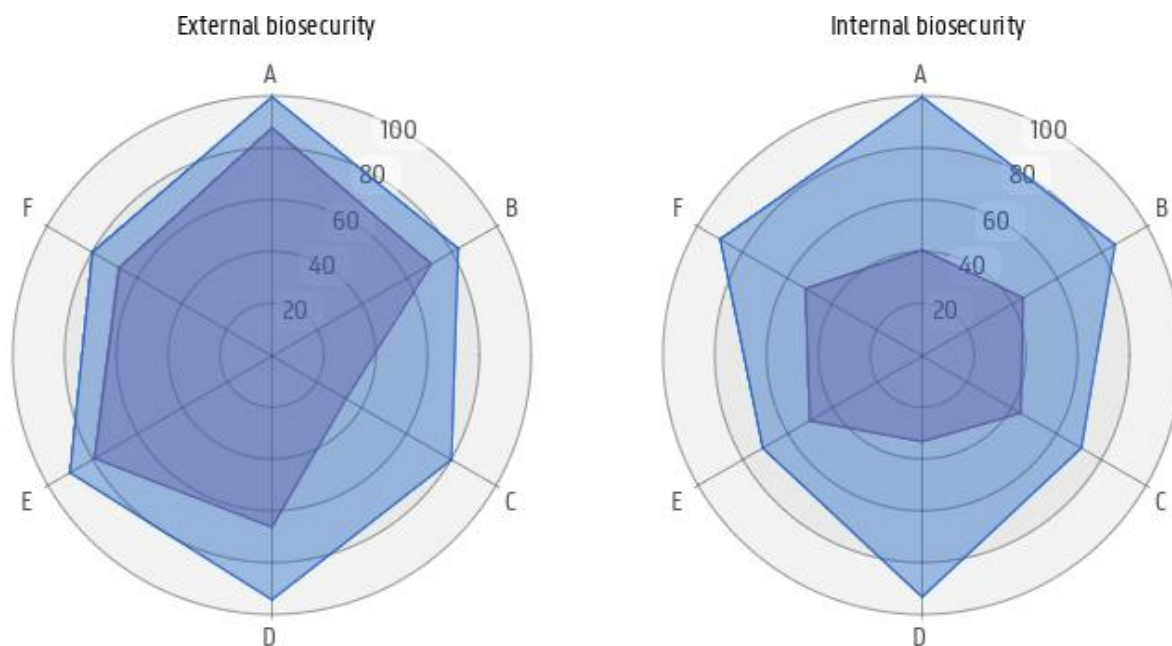
Grafikon 5.9.

Komparativni prikaz vrednosti internih biosigurnosnih mera na farmi BS 3 u odnosu na prosečne vrednosti internih biosigurnosnih mera farmi u Srbiji i svetu: A - Kontrola bolesti ; B – Prasilište i period dojenja; C - Odgajivalište; D - Tovilište; E - Mere između odeljaka i korišćenje opreme; F - Čišćenje i dezinfekcija; Σ - Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera.

5.4. Procena biosigurnosnih mera na farmi BS 4

Eksterne biosigurnosne mere na farmi BS 4. Rezultati procene eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 4 po potkategorijama prikazani su na grafikonima (Grafikon 5.10. i Grafikon 5.11.) i tabeli (Tabela 5.4.). Na farmi BS 4 svih šest potkategorija eksternih biosigurnosnih mera imale su ocene $\geq 80\%$, što su ujedno bile i više vrednosti od prosečnih vrednosti svih navedenih parametara na farmama u Srbiji i svetu. Najbolje je bila ocenjena potkategorija kupovina životinja i semena (100%), dok potkategorija zaposleni i posetioci sa vrednošću od 94% bila je za 28%, odnosno za 25%, viša u odnosu na prosečne vrednosti u Srbiji i svetu. Najniže ocene u ovoj kategoriji na farmi BS 4 dobile su mere vezane za hranu, vodu i opremu (80%) i lokaciju farme (80%), s tim da ocena za potkategoriju

hrana, voda i oprema se najviše razlikovala od prosečnih vrednosti za ovaj parametar u Srbiji (33%) i svetu (50%). Ukupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera bila je 89%, što je bilo znatno više u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (69%) i svetu (70%).



Grafikon 5.10.

Originalan prikaz rezultata obrađene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 4. Brojevi predstavljaju skalu bodovanja biosigurnosnih mera; plava boja označava biosigurnosne vrednosti na farmi BS 2, dok ljubičasta boja označava prosečne biosigurnosne vrednosti u Srbiji; oznake A, B, C, D, E i F predstavljaju potkategorije eksternih i internih biosigurnosnih mera prikazane na grafikonima (Grafikon 5.11. i Grafikon 5.12.).

Tabela 5.4. Originalan prikaz rezulta obradene ankete prema BioCheck.UGent™ na farmi BS 4

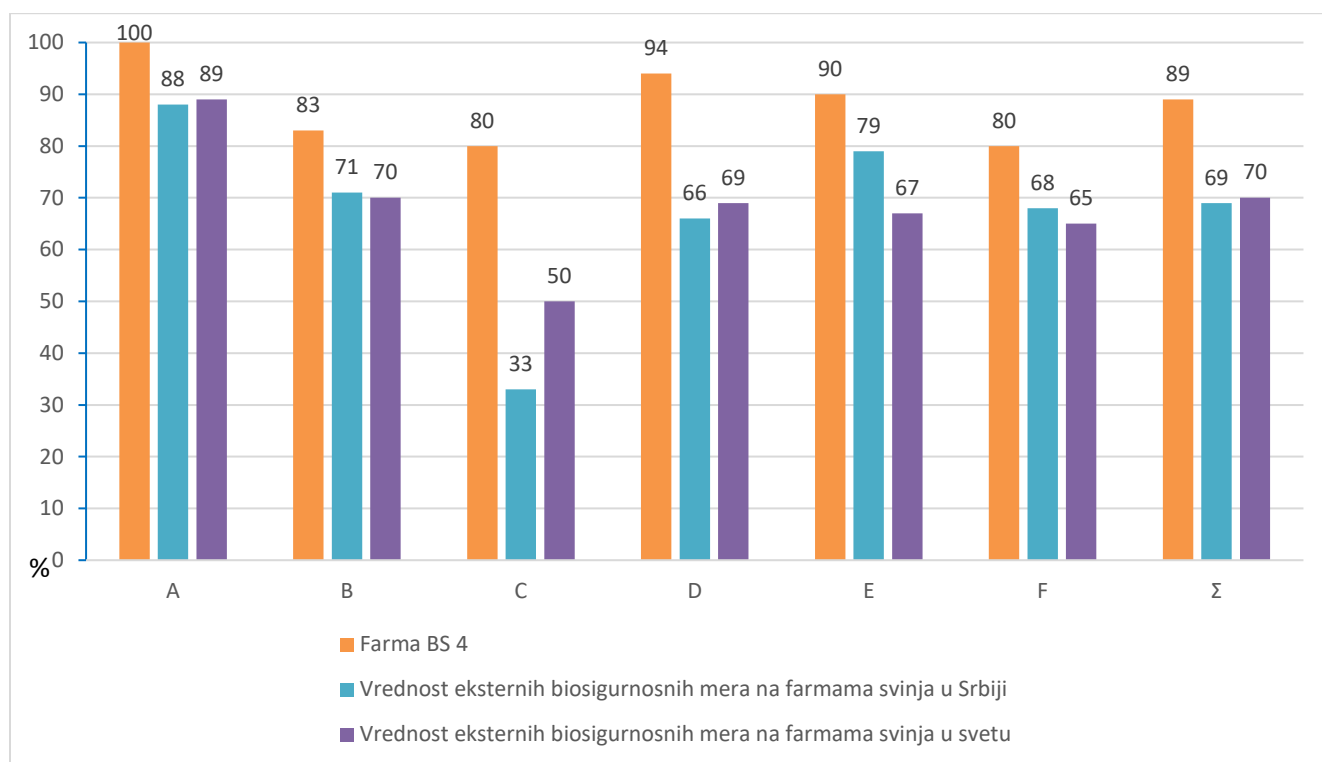


BIOCHECK.UGENT

ID: 21869/691653/w2_1/F

PIG

Nr	Description	Score	Country average	Global average
<i>External biosecurity</i>				
A	<u>Purchase of animals and semen</u>	100 %	88 %	89 %
B	<u>Transport of animals, removal of manure and dead animals</u>	83 %	71 %	70 %
C	<u>Feed, water and equipment supply</u>	80 %	33 %	50 %
D	<u>Personnel and visitors</u>	94 %	66 %	69 %
E	<u>Vermin and bird control</u>	90 %	79 %	67 %
F	<u>Environment and region</u>	80 %	68 %	65 %
	Subtotal External biosecurity:	89 %	69 %	70 %
<i>Internal biosecurity</i>				
A	<u>Disease management</u>	100 %	41 %	66 %
B	<u>Farrowing and suckling period</u>	86 %	45 %	55 %
C	<u>Nursery unit</u>	71 %	44 %	65 %
D	<u>Fattening unit</u>	93 %	33 %	67 %
E	<u>Measures between compartments and the use of equipment</u>	71 %	50 %	48 %
F	<u>Cleaning and disinfection</u>	90 %	52 %	59 %
	Subtotal Internal biosecurity:	83 %	46 %	58 %
<i>N/A = Not applicable</i>		Total:	86 %	58 %
			58 %	64 %

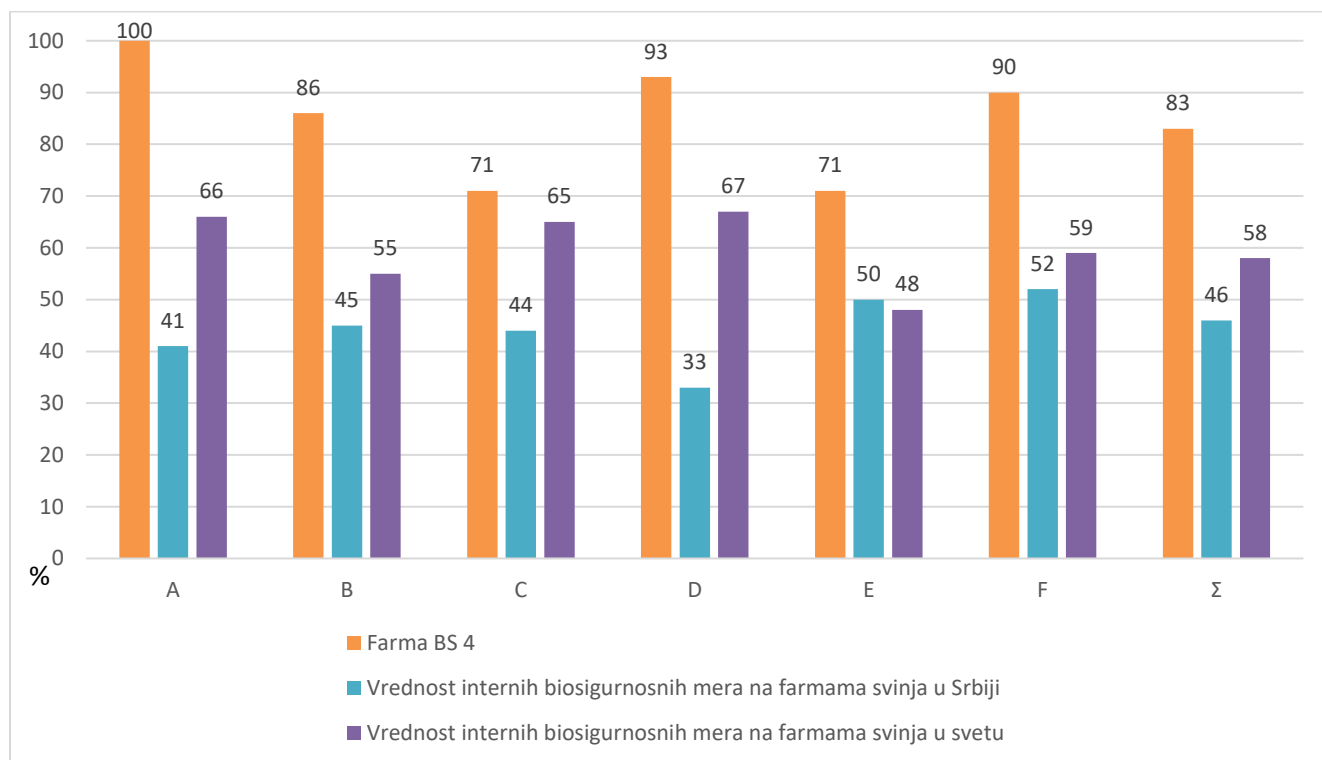


Grafikon 5.11.

Komparativni prikaz vrednosti eksterinih biosigurnosnih mera na farmi BS 4 u odnosu na prosečne vrednosti eksternih biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji i svetu: A - Kupovina životinja i semena; B - Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja; C - Hrana, voda i oprema; D - Zaposleni i posetioci; E - Kontrola štetočina i ptica; F - Lokacija farme; Σ -kupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera.

Interne biosigurnosne mere na farmi BS 4. Visoke ocene, sa još izraženijim razlikama u odnosu na prosečne vrednosti na farmama u Srbiji i svetu, farma BS 4 je dobila za potkategorije internih biosigurnosnih mera (Grafikon 5.10, Grafikon 5.12. Tabela 5.4.). U okviru kategorije internih mera najveću ocenu dobila je potkategorija koja se odnosila na mere sprovedene u kontroli bolesti (100%), što je bilo bolje ocenjeno od prosečnih vrednosti u Srbiji (41%) i svetu (66%). Najizraženija razlika uočena je za mere koje se primenjuju u tovilistu između ocena BS 4 farme (93%) i prosečnih vrednosti farmi u Srbiji (33%), dok se ocena za potkategoriju čišćenje i dezinfekcija (90%) najviše razlikovala od prosečnih vrednosti farmi u svetu (59%). Potkategorije sa najnižim ocenama bile su vezane za odgajivalište (71%) i mere sprovedene između odeljaka farme i korišćenje opreme (71%), a ovaj rezultat je bio viši od prosečnih vrednosti na farmama u Srbiji za potkategoriju odgajivalište (44%) i mere sprovedene između odeljaka farme i korišćenje opreme (50%) i svetu (65% i 48%, pojedinačno). Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera farme BS 4 bila je 83%, što je bilo bolje ocenjeno u poređenju sa prosečnim vrednostima u Srbiji (46%) i svetu (58%).

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su eksterne biosigurnosne mere na farmi BS 4 (89%, Grafikon 5.11. i Tabela 5.4.) bile bolje sprovedene u odnosu na interne biosigurnosne mere (83%, Grafikon 5.12. i Tabela 5.4.).



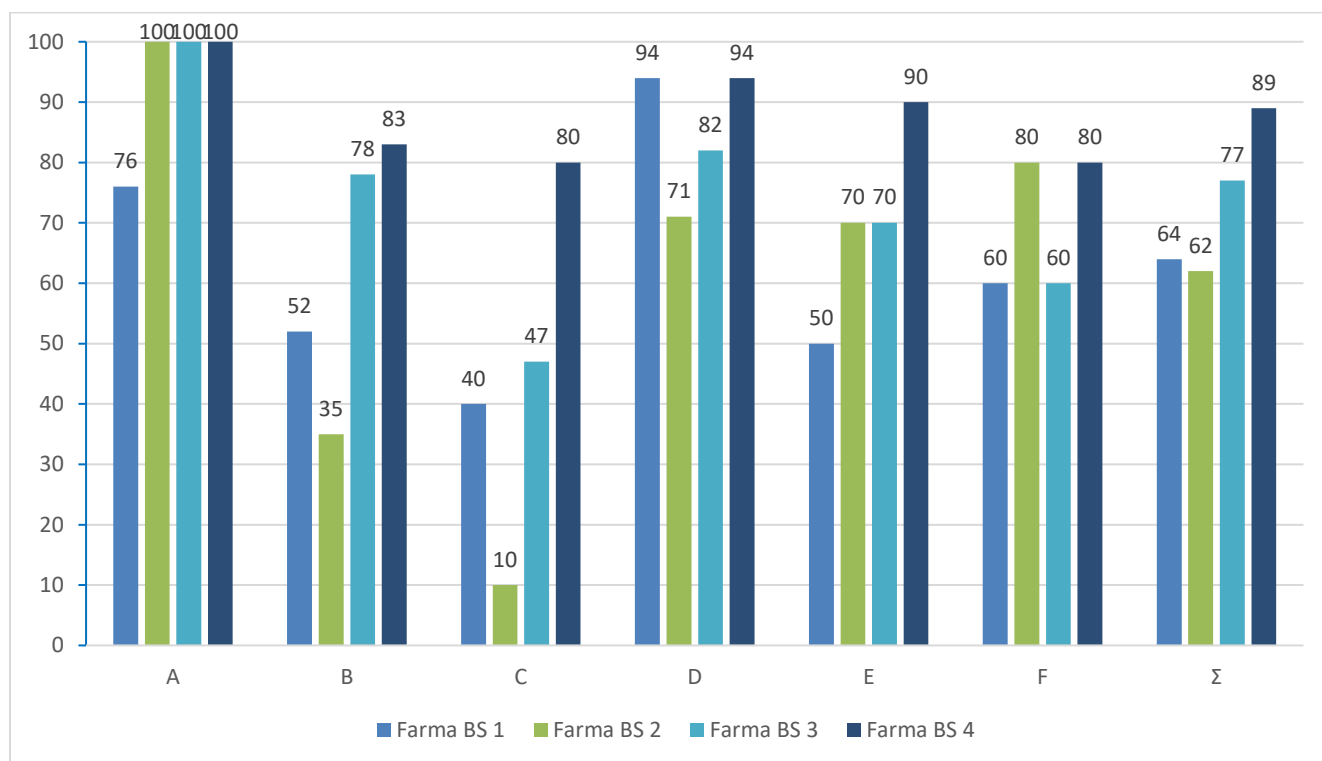
Grafikon 5.12.

Komparativni prikaz vrednosti internih biosigurnosnih mera na farmi BS 4 u odnosu na prosečne vrednosti internih biosigurnosnih mera farmi u Srbiji i svetu: A - Kontrola bolesti ; B – Prasilište i period dojenja; C - Odgajivalište; D - Tovilište; E - Mere između odeljaka i korišćenje opreme; F - Čišćenje i dezinfekcija; Σ - Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera.

5.5. Uporedni prikaz eksternih biosigurnosnih nivoa na četiri farme

Vrednosti eksternih biosigurnosnih mera analiziranih farmi prikazane su na grafikonu (Grafikon 5.13.). Na sve četiri farme najbolje su bile ocenjene potkategorije kupovina životinja i semena i zaposleni i posetioci, a najniže ocene posmatrane četiri farme su dobile za biosigurnosne mere koje se odnose na hranu, vodu i opremu. U okviru potkategorije kupovina životinja i semena farme BS 2, BS 3 i BS 4 imale su maksimalne vrednosti (100%), dok je farma BS 1 imala znatno nižu vrednost (76%). Potkategorija koja se odnosila na zaposlene i posetioce ocenjena je sa 92% na farmi BS 1 i BS 4, dok je na farmi BS 3 ocenjena sa 82%, a na farmi BS 2 sa 71%. Potkategorija snadbevanje hrane, vode i opreme ocenjena je najvećom ocenom na farmi BS 4 (80%), dok su znatno niže vrednosti zabeležene

na farmama BS 3 (47%), BS 1 (40%) i BS 2 (10%). Najveću varijabilnost u rezultatima primenjenih biosigurnosnih mera imala je farma BS 2. Na ovoj farmi uočene su znatno niže ocene za potkategorije hrana, voda i oprema (10%) i transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja (35%) u odnosu na ostale ispitivane farme. Ocene svih šest različitih potkategorija eksternih biosigurnosnih mera na farmi BS 4 bile su najviše, i date vrednosti su bile ili više (tri potkategorije) ili jednake (tri potkategorije) ocenama za iste parametre na farmama BS 1, BS 2 i BS 3. Posledično, farma BS 4 imala je i najveću vrednost eksternih biosigurnosnih mera (89%), dok je najnižu vrednost eksternih biosigurnosnih mera imala farma BS 2 (62%).



Grafikon 5.13.

Komparativni prikaz eksternih biosigurnosnih mera na ispitivanim farmama (BS 1, BS 2, BS 3, BS 4)

A - Kupovina životinja i semena; B - Transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja;

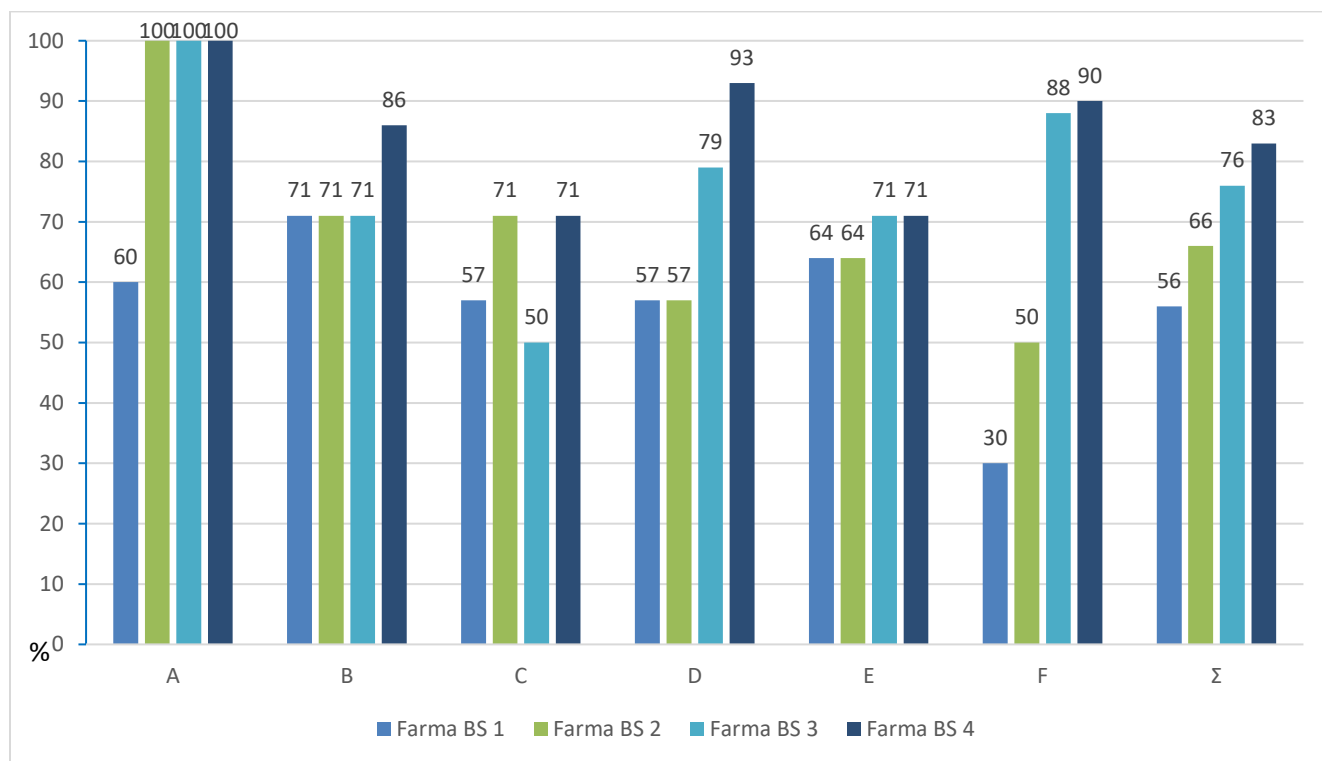
C - Hrana, voda i oprema; D - Zaposleni i posetioci; E - Kontrola štetočina i ptica;

F - Lokacija farme; Σ - Ukupna vrednost eksternih biosigurnosnih mera.

5.6. Uporedni prikaz internih biosigurnosnih nivoa na četiri farme

Vrednosti internih biosigurnosnih mera četiri različite farme prikazane su na Grafikon 5.14. Može se uočiti da su ispitivane farme bile više ujednačene u ocenama internih biosigurnosnih mera u odnosu na eksterne. Potkategorije kontrola bolesti i prasilište i period dojenja su bile najbolje ocenjene na

farmama, gde su za prvu potkategoriju farme BS 2, BS 3 i BS 4 imale maksimalne vrednosti (100%), a farma BS 1 ocenu 60%, dok za drugu potkategoriju farme BS 1, BS 2 i BS 3 ocenjene su sa 71%, a farma BS 4 sa 86%. Najveće razlike između farmi uočene su u ocenama za potkategoriju čišćenje i dezinfekcija. Ova interna biosigurnosna mera je dobro primenjivana na farmama BS 3 i BS 4, sa ocenama 88% i 90%, dok je farma BS 2 bila znatno lošije ocenjena za ovaj parametar (50%). Farma BS 1 je za ovu potkategoriju bila najlošije ocenjena sa 30%, što je ujedno bila i najniža ocena za sve interne biosigurnosne mere na posmatranim farmama. Kao i kod ocena eksternih biosigurnosnih mera, farma BS 4 je za tri potkategorije: prasilište i period dojenja, tovilište i čišćenje i dezinfekcija imala najbolje ocene (86%, 93% i 90%, pojedinačno), dok je u ostale tri potkategorije: kontrola bolesti, odgajivalište i mere između odeljaka i korišćenje opreme imala ocene koje se nisu razlikovale od farme BS 2 i BS 3 (100%), farme BS 2 (71%) i farme BS 3 (71%), pojedinačno. Takođe, i ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera na farmi BS 4 (83%) bila je viša u odnosu na ostale ispitivane farme, dok je najnižu vrednost internih biosigurnosnih mera imala farma BS 1 (56%).



Grafikon 5.14.

Komparativni prikaz internih biosigurnosnih mera na ispitivanim farmama (BS 1, BS 2, BS 3, BS 4)

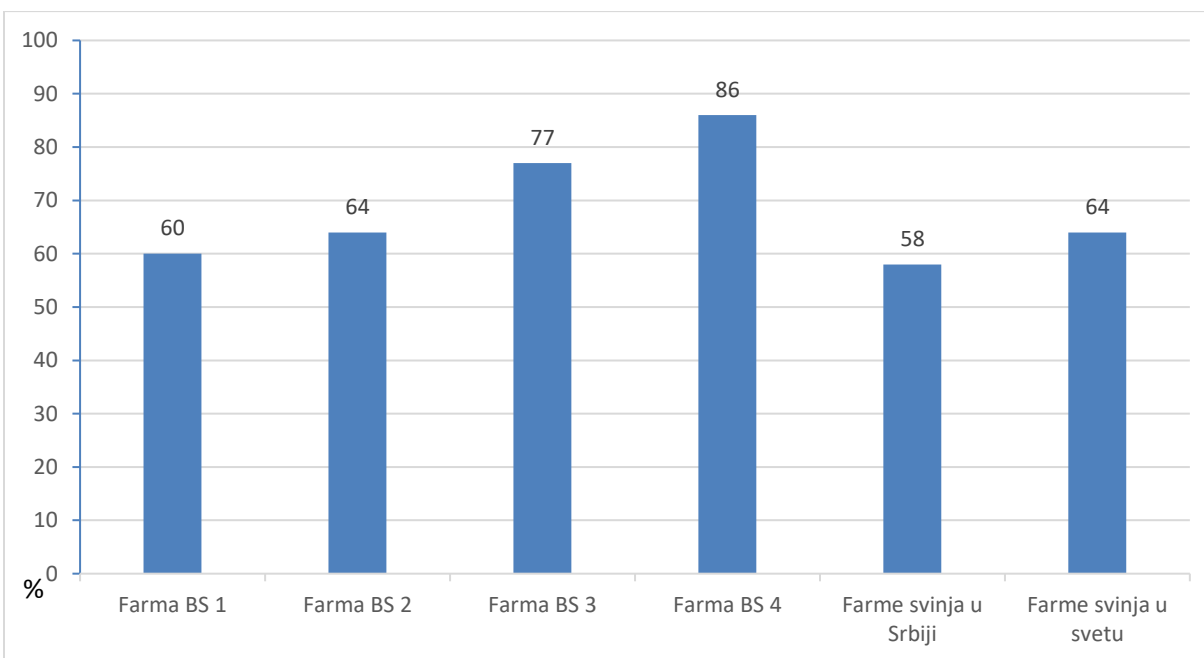
A - Kontrola bolesti ; B - Prasilište i period dojenja; C - Odgajivalište; D - Tovilište;

E - Mere između odeljaka i korišćenje opreme; F - Čišćenje i dezinfekcija;

Σ - Ukupna vrednost internih biosigurnosnih mera.

5.7. Ukupne vrednosti biosigurnosnih mera

Ukupne vrednosti biosigurnosnih mera na sve četiri farme koje su analizirane u ovoj doktorskoj disertaciji bile su više od prosečnih vrednosti biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji (58%) i svetu (64%), izuzev farme BS 1 čija ocena ukupnih biosigurnosnih mera je bila niža u poređenju sa prosečnim vrednostima u svetu (Grafikon 5.15.). Najveću vrednost biosigurnosnih mera imala je farma BS 4 (86%), a najnižu vrednost biosigurnosnih mera imala je farma BS 1 (60%). Ocena ukupnih biosigurnosnih mera na farmi BS 2 iznosila je 64% i bila je jednaka prosečnoj vrednosti na farmama svinja u svetu, dok vrednost ukupnih biosigurnosnih mera na farmi BS 3 je iznosila 77%.



Grafikon 5.15.

Komparativni prikaz ukupnih vrednosti biosigurnosnih mera na ispitivanim farmam (BS 1, BS 2, BS 3 i BS 4) međusobno i u odnosu na ukupne biosigurnosne vrednosti na farmama svinja u Srbiji i svetu.

5.8. Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE

Rezultati statističke analize broja *L. intracellularis* log₁₀ bakterija/g fecesa primenom t-testa i ANOVA uz Tukey *post-hoc* testa prikazani su u tabelama (Tabela 5.5, Tabela 5.6, Tabela 5.7. i Tabela 5.8.). Na osnovu vrednosti koeficijenta varijacije, prikazanih u prethodno navedenim tabelama, za tri posmatrana perioda na svakoj od farmi dobijeni rezultati svih grupa prasadi imali su normalnu distribuciju.

Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmi BS 1.

Poređenjem kontrolne i tretman grupe prasadi t-testom nakon uzorkovanja tokom četiri nedelje ogleđa

na farmi BS 1 uočen je značajno manji broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tretman grupe 14. dana 5,17 log₁₀ bakterija/g u odnosu na kontrolnu grupu 6,41 log₁₀ bakterija/g ($P=0,0080$) i 28. dana gde je kod grupe prasadi T-BS1 koja je u hrani dobijala ispitivani preparat Patente Herba® Plus broj bakterija bio 5,23 log₁₀ bakterija/g u poređenju sa kontrolnom grupom (K-BS1), gde je broj bakterija bio 6,72 log₁₀ bakterija/g ($P=0,0015$), dok značajnih razlika nije bilo 0. dana eksperimenta između poređenih grupa ($P=0,0995$).

Praćenjem broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi kontrolne i tretman grupe tokom vremena primenom ANOVA uz Tukey *post-hoc* testa utvrđeno je da je dodavanje preparata u hrani imalo pozitivni efekat, odnosno značajno je smanjilo broj bakterija u fecesu prasadi T-BS1 grupe tokom 14. dana (5,17 log₁₀ bakterija/g) i 28 dana (5,23 log₁₀ bakterija/g) u odnosu na 0. dan eksperimenta, gde je broj bakterija bio 7,03 log₁₀ bakterija/g ($P<0,0001$). U kontrolnoj grupi prasadi broj bakterija u fecesu bio je ujednačen tokom eksperimenta ($P=0,7605$) u opsegu od 6,41 (14. dan) do 6,72 (28. dan) log₁₀ bakterija/g.

Tabela 5.5. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (log₁₀ bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 1.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
0. dan					
K-BS1	6,49 ^A	0,59	5,67	7,33	9,04
T-BS1	7,03 ^A	0,73	6,03	8,19	10,37
14. dan					
K-BS1	6,41 ^{aA}	1,09	4,22	7,83	16,93
T-BS1	5,17 ^{bB}	0,58	4,08	5,98	11,28
28. dan					
K-BS1	6,72 ^{aA}	1,01	4,61	8,09	14,94
T-BS1	5,23 ^{bB}	0,60	4,12	6,09	11,49

Za isti period ispitivanja, u istoj koloni različita slova (^{a, b}) ukazuju na stepen značajnosti $P<0,05$ (t-test); U istoj koloni različita slova (^{A, B}) ukazuju na stepen značajnosti $P<0,05$ (ANOVA uz Tukey *post-hoc* test).

Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmi BS 2. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tokom 28 dana eksperimenta na farmi BS 2 prikazan je u Tabeli 5.6. Rezultati t-testa pokazali su da je na farmi sa biosigurnosnim nivoom 2 broj bakterija *L. intracellularis* 14. dana (5,50 log₁₀ bakterija/g fecesa) i 28. dana (5,51 log₁₀ bakterija/g fecesa) ogleda kod tretman grupe prasadi koja je putem hrane dobijala ispitivani preparat bio značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu prasadi koja nije dobijala preparat u hrani tokom 14. dana sa 6,60 log₁₀ bakterija/g fecesa ($P=0,0470$) i 28. dana ogleda gde je broj bakterija bio 6,86 log₁₀ bakterija/g fecesa ($P=0,0176$).

Korišćenjem ANOVA uz Tukey *post-hoc* test nije uočen efekat dužine trajanja tretmana na broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu tretman grupe prasadi ($P=0,6174$) i kontrolne grupe prasadi ($P=0,2117$).

Tabela 5.6. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 2.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>0. dan</i>					
K-BS2	6,14	0,81	4,83	7,20	13,19
T-BS2	5,98	0,83	4,67	7,05	13,91
<i>14. dan</i>					
K-BS2	6,60 ^a	0,61	5,63	7,30	9,31
T-BS2	5,50 ^b	1,03	4,00	6,71	18,69
<i>28. dan</i>					
K-BS2	6,86 ^a	0,58	5,87	7,60	8,45
T-BS2	5,51 ^b	1,01	4,43	7,22	18,25

Za isti period ispitivanja, u istoj koloni različita slova (^{a, b}) ukazuju na stepen značajnosti $P < 0,05$ (t-test).

Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmi BS 3. Broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tokom vremena na farmi BS 3 prikazan je u Tabeli 5.7. Tokom trajanja oglada za svaki period uzorkovanja fecesa nije bilo značajnih razlika u broju bakterija između kontrolne i tretman grupe prasadi, odnosno 0., ($P=0,6184$), 14. ($P=0,7225$) i 28. dana eksperimenta ($P=0,2489$). Takođe, poređenjem tokom tri faze uzrokovanja nije uočena razlika u broju bakterija *L. intracellularis* u fecesu tretman grupe ($P=0,3029$) i kontrolne grupe prasadi ($P=0,4187$).

Tabela 5.7. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 3.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>0. dan</i>					
K-BS3	5,22	1,17	3,22	6,61	22,36
T-BS3	5,50	0,90	3,78	6,48	16,30
<i>14. dan</i>					
K-BS3	4,71	0,41	4,24	5,39	8,65
T-BS3	4,81	0,56	4,24	5,82	11,66
<i>28. dan</i>					
K-BS3	4,63	0,74	3,44	5,49	16,08
T-BS3	5,18	0,81	4,27	6,35	15,56

Utvrđivanje efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmi BS 4.

Poređenjem grupe prasadi koja je dobijala preparat Patente Herba® Plus i kontrolne grupe prasadi farme BS 4 utvrđeno je odsustvo značajnih razlika u broju bakterija *L. intracellularis* u fecesu 0., 14. i 28. dana ogleđa ($P=0,5845$; $P=0,5142$ i $P=0,9506$, pojedinačno). Korišćenjem ANOVA uz Tukey *post-hoc* testa, tokom ogleđa takođe nije uočena razlika u broju *L. intracellularis* u fecesu prasadi kod kontrolne grupe ($P=0,7811$), kao ni kod tretman grupe ($P=0,0942$), prikazano u Tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 4.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>0. dan</i>					
K-BS4	4,14	0,92	3,08	5,48	22,26
T-BS4	4,38	0,49	3,73	4,97	11,08
<i>14. dan</i>					
K-BS4	3,92	0,35	3,44	4,34	9,01
T-BS4	3,77	0,43	3,17	4,29	11,37
<i>28. dan</i>					
K-BS4	3,91	0,41	3,48	4,35	10,49
T-BS4	3,90	0,50	3,36	4,71	12,71

5.9. Korelaciona zavisnost broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana

U Tabeli 5.9. prikazani su rezultati dobijeni primenom *Spearman*-ovog testa korelacije. Ispitivanjem korelacione zavisnosti između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana utvrđeno je da je *Spearman*-ov koeficijent korelacije između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu i biosigurnosnog nivoa farme bio ($r=-0,664$), odnosno da je između ova dva parametra postojala značajna umerena negativna linearna korelacija ($P<0,01$), odnosno da je sa većom vrednošću biosigurnosnog nivoa farme broj bakterija u fecesu prasadi bio manji. Nije uočena značajna korelaciona zavisnost između ostalih ispitivanih parametara (broj bakterija i tretman $P=0,065$; broj bakterija i dužina tretmana $P=0,061$; biosigurnosni nivo i tretman $P=1,000$; biosigurnosni nivo i dužina tretmana $P=0,991$ i, na kraju, tretman i dužina tretmana $P=1,000$).

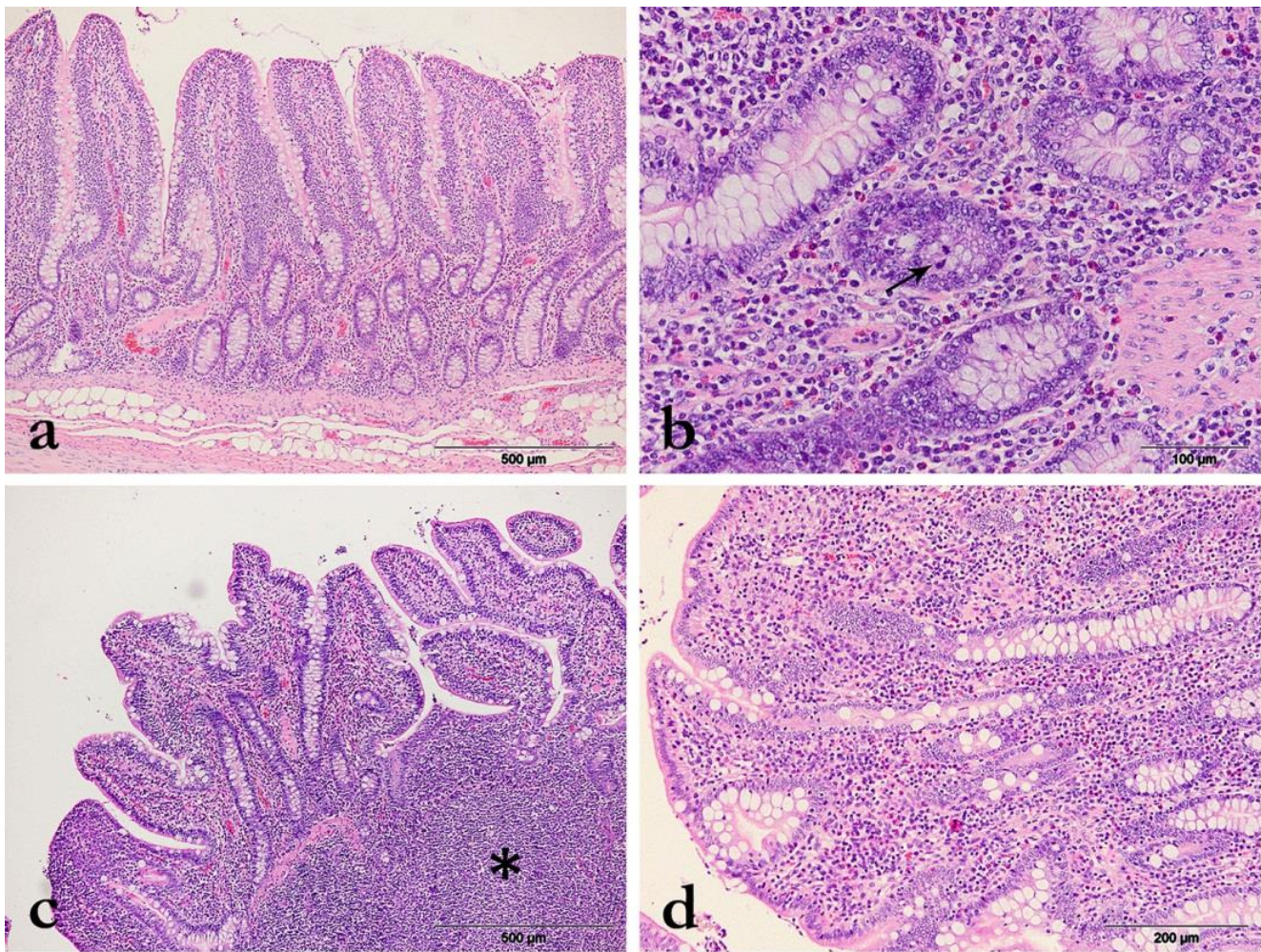
Tabela 5.9. Spearman-ov koeficijent korelacije između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen putem (qPCR) metode, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana

	\log_{10} bakterija/g fecesa	Biosigurnosni nivo	Tretman	Dužina tretmana
\log_{10} bakterija/g fecesa	1	-0,664**	-0,144	-0,147
Biosigurnosni nivo	-	1	0,001	-0,009
Tretman	-	-	1	0,001
Dužina tretmana	-	-	-	1

** $P < 0,01$; $r = 0,0$ - nema linearne zavisnosti; $r = 0,1-0,3$ - slaba linearna zavisnost; $r = 0,4-0,6$ - umerena linearna zavisnost; $r = 0,7-0,90$ - jaka linearna zavisnost i $r = 1$ - perfektna linearna zavisnost.

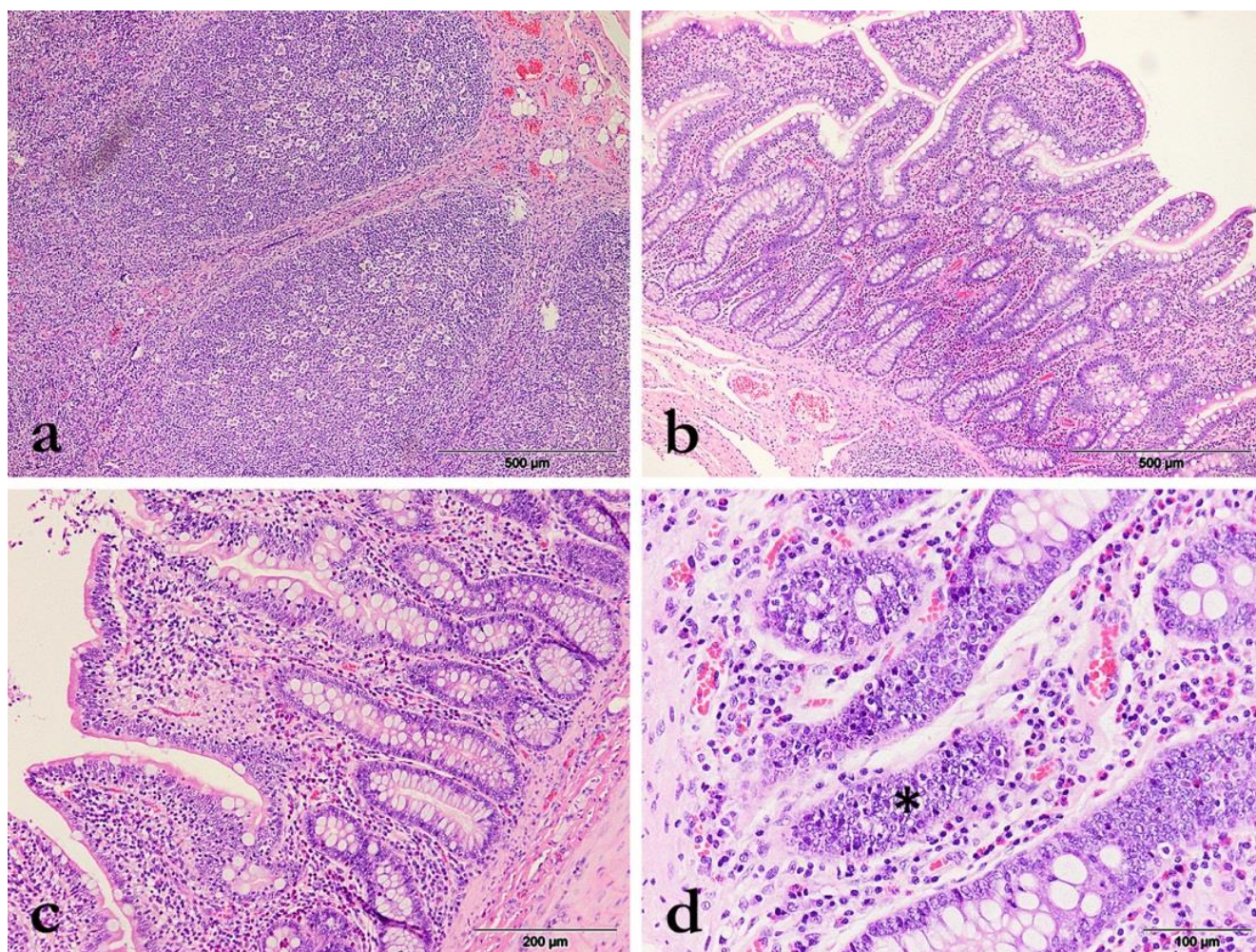
5.10. Mikroskopske promene, histomorfometrijska i imunohistohemijska analiza ileuma prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus

Mikroskopske promene. Na Slici 5.1. prikazane su mikroskopske promene na ileumu prasadi iz kontrolne grupe. U uzorcima ileuma kontrolne grupe zapaža se da je sluznica creva pravilno organizovana u crevne kripte i vile. Na površini je prisutan eksudat sa manjom količinom sluzi i deskvamisanim ćelijama (Slika 5.1. a). U sluznici se primećuje umnožavanje peharastih ćelija umerenog intenziteta, kao i proliferacija epitelnih ćelija Liberkinijevih kripti uz izražene mitoze (Slika 5.1. b). Prisutna je hiperplazija limfatičnog tkiva Pajerovih ploča umerenog intenziteta (Slika 5.1. c). *Lamina propria* je mestimično edematozna, a njeni krvni sudovi hiperemični. Kod dva praseta *lamina propria* je bila blago infiltrirana limfocitima i eozionofilnim granulocitima (Slika 5.1. d).



Slika 5.1. Mikroskopske promene na ileumu svinja iz kontrolne grupe, HE. a) Izgled crevnih resica i kriпти, na površini suznice eksudat bogat sluzi i deskvamisanim ćelijama; b) Proliferacija ćelija Liberkinijevih kriпти sa vidljivim mitozama (strelica); c) Hiperplazija limfatičnog tkiva Pajerovih ploča (zvezdica); d) *Lamina propria* infiltrirana limfocitima i eozionofilnim granulocitima.

Na Slici 5.2. prikazane su mikroskopske promene na ileumu tretman grupe prasadi. Na histološkim preparatima iz uzoraka poreklom od prasadi koja je tretirana fitogenim aditivom uočava se blaga hiperplazija limfatičnog tkiva Pajerovih ploča, pri čemu su pojedini limfociti zahvaćeni apoptotičnim procesima (Slika 5.2. a). *Lamina propria* je obilno infiltrirana limfocitima i manjim brojem eozinofilnih granulocita (Slika 5.2. b). Umnožavanje peharastih ćelija (Slika 5.2. c) i proliferacija epitelnih ćelija Liberkinijevih kriпти (Slika 5.2. d) su blažeg intenziteta u poređenju sa kontrolnom grupom prasadi.



Slika 5.2. Mikroskopske promene na ileumu svinja tretiranih fitogenim aditivom, HE. a) Hiperplazija limfatičnog tkiva Pajerovih ploča sa izraženim halo-om oko pojedinih apoptotičnih limfocita; b) Infiltracija *lamina propria* limfocitima i eozinofilnim granulocitima; c) Umnožavanje peharastih ćelija u sluznici creva; d) Proliferacija epitelnih ćelija Liberkinijevih kripti (zvezdica).

Histomorfometrijska analiza. Rezultati histomorfometrijskih parametara ileuma prasadi kontrolne i tretman grupe prikazani su u Tabeli 5.10. Histomorfometrijska analiza pokazala je da u tretiranoj grupi prasadi su kripte bile značajno pliće $192,10 \mu\text{m}$ ($P=0,0284$), a odnos visina resica/dubina kripti značajno veći $3,16$ ($P=0,0040$) nego u kontrolnoj grupi $216,20 \mu\text{m}$ i $2,72$. Nije uočen efekat dodavanja fitogenog aditiva u hrani prasadi tokom 28 dana eksperimenta na ostale histomorfometrijske parametre: visina resice ($P=0,0607$), širina resice ($P=0,0728$), površina resica ($P=0,7676$) i broj peharastih ćelija/100 enterocita ($P=0,0575$).

Tabela 5.10. Rezultati ispitivanja uticaja fitogenog aditiva Patente Herba® Plus na morfometrijske parametre crevne eksperimentalnih životinja.

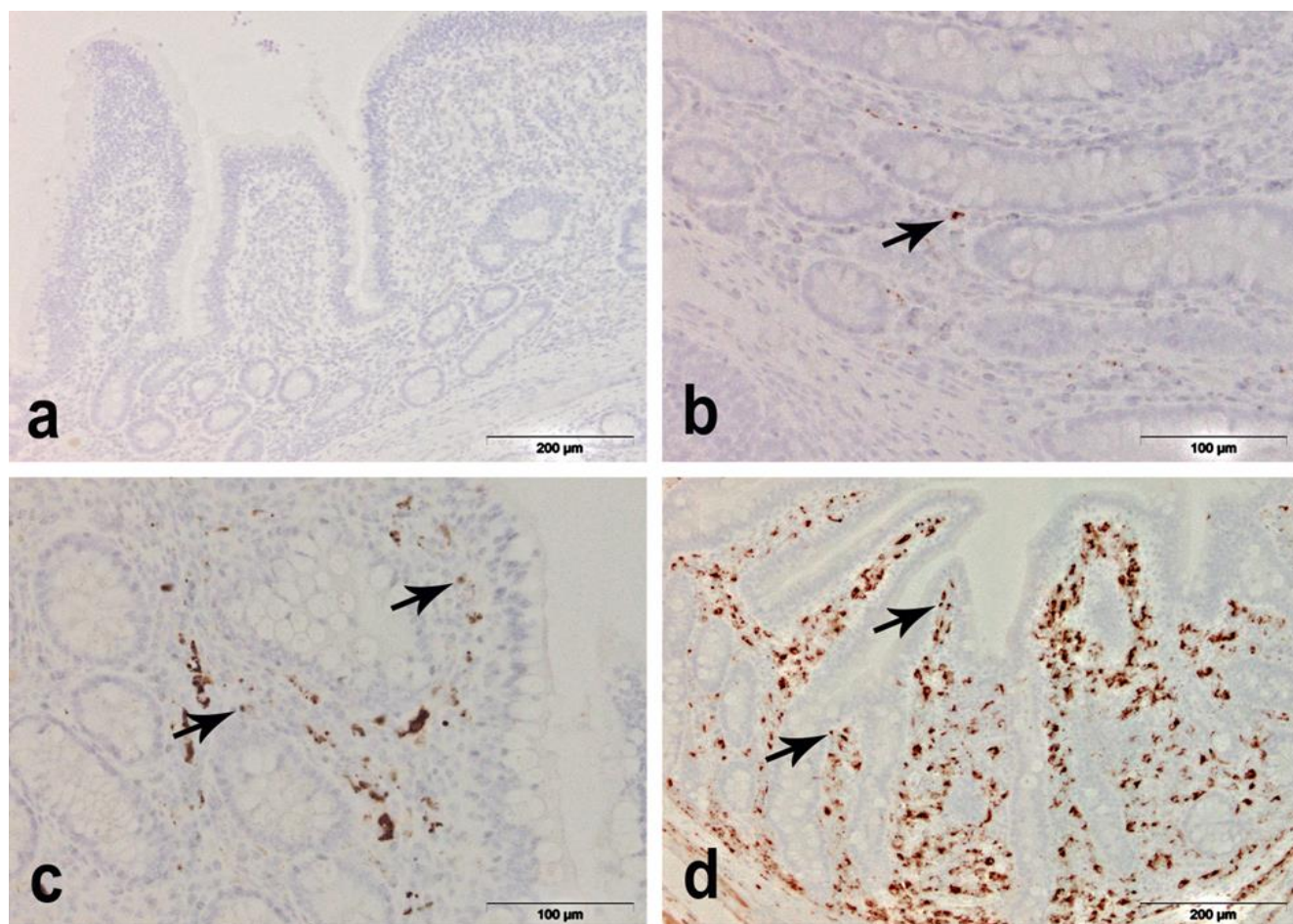
Parametari	Eksperimentalne grupe		P vrednost
	Kontrolna grupa	Tretman grupa	
	$(\bar{X} \pm Sd)$		
Visina resice (μm)	529,30±115,20	571,20±127,20	0,0607
Širina resice (μm)	187,80±48,69	172,60±42,56	0,0728
Dubina kripti (μm)	216,20±68,95 ^a	192,10±47,80 ^b	0,0284
Odnos visina resica/dubina kripti	2,72±0,84 ^a	3,16±0,79 ^b	0,0040
Površina resica (mm^2)	0,099±0,034	0,098±0,030	0,7676
Peharaste ćelije/100 enterocita	19,17±3,19	23,60±3,93	0,0575

Različita slova (^a, ^b) u istom redu ukazuju na stepen značajnosti ($P < 0,05$) praćenih parametara među eksperimentalnim grupama.

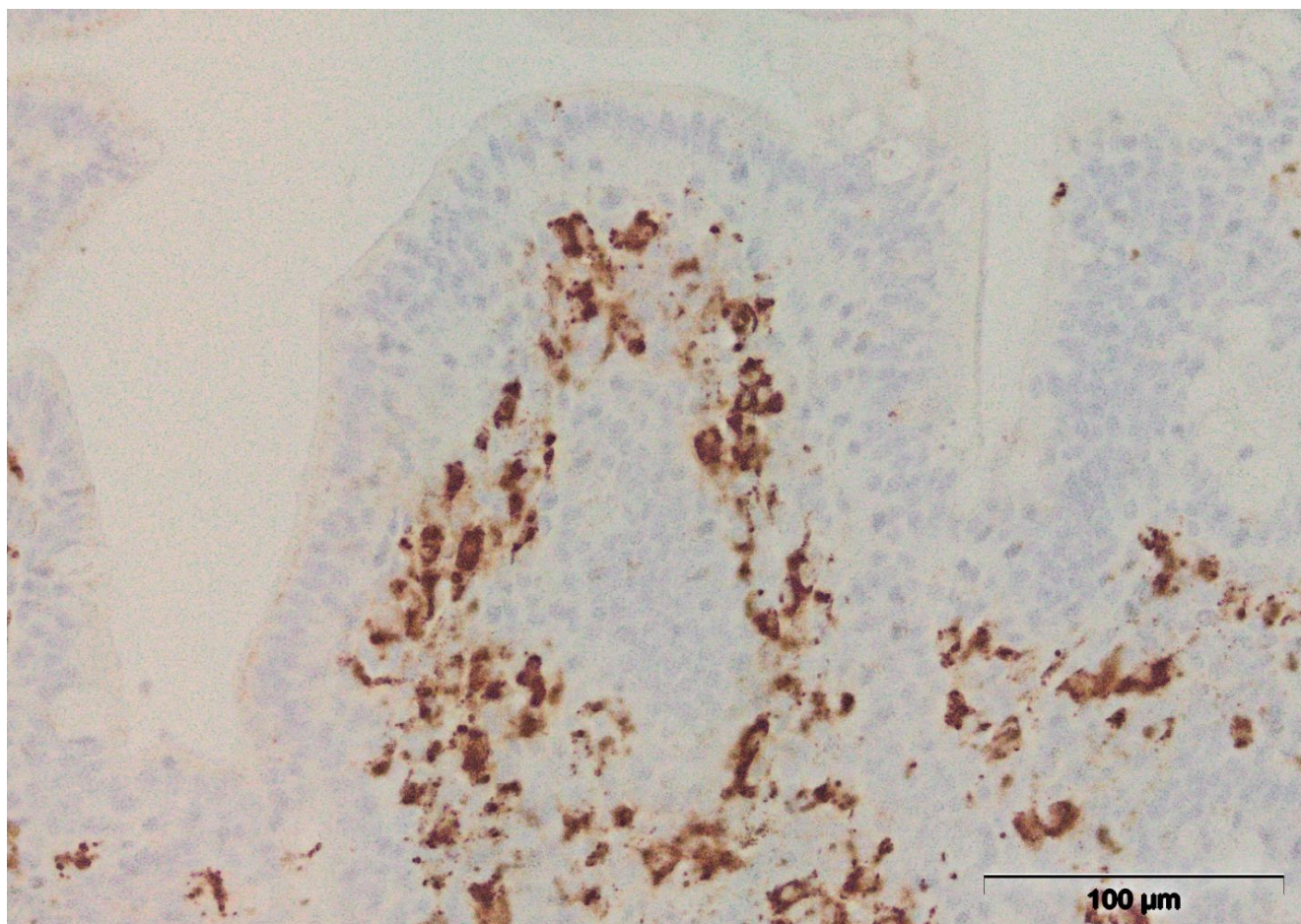
Semikvantitativna i imunohistohemijska analiza. Rezultati semikvantitativne analize imunohistohemijskih preparata dati su u Tabeli 5.11. U tretman grupi 2/6 (2 od 6) uzoraka (33,33%) ocenjeno je ocenom 0, a preostalih 4/6 uzoraka (66,67%) ocenom 1, dok je u kontrolnoj grupi 3/6 uzoraka (50%) ocenjeno ocenom 1, a 2/6 uzoraka (33,33%) ocenjeno sa ocenom 2 i 1/6 uzoraka (16,67%) ocenjeno 3. Ekspresija antigena *L. intracellularis* u ileumu svinje prikazana je na slikama (Slika 5.3. i Slika 5.4.). najintenzivnija ekspresija antigena primećena je u makrofazima u obliku citoplazmatskih reakcija (Slika 5.4.).

Tabela 5.11. Rezultati semikvantitativne analiza tkiva ileuma nakon primene fitogenog aditiva Patente Herba® Plus ispitivanih životinjama.

Stepen ekspresije antigena <i>L. intracellularis</i>	Eksperimentalne grupe	
	Tretman grupa (n=6)	Kontrolna grupa (n=6)
0	2/6 (33.33%)	0/6 (0%)
1	4/6 (66.67%)	3/6 (50%)
2	0/6 (0%)	2/6 (33.33%)
3	0/6 (0%)	1/6 (16.67%)



Slika 5.3. Stepen ekspresije antigena *L. intracellularis* u ileumu prasadi: a) Gradus 0, b) Gradus 1, c) Gradus 2, d) Gradus 3. Strelice označavaju depozite smeđih, imunopozitivnih makrofaga u lamini propriji; LSAB2.



Slika 5.4. Ekspresija antigena *L. intracellularis* u ileumu prasadi; LSAB2.

5.11. Uticaj fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima tokom 28 dana eksperimenta

Efekat fitogenog aditiva na telesnu masu prasadi. Telesna masa prasadi na početku (sedam nedelja stara prasad) i na kraju eksperimenta (jedanaest nedelja stara prasad) prikazana je u Tabeli 5.12. Može se videti da su grupe bile homogene sa koeficijentom varijacije od 10,49% (T-BS4) do 16,26% (T-BS2), čime je pokazano da su grupe na početku ogleđa bile dobro formirane. Telesne mase prasadi 0. dana eksperimenta bile su u opsegu od 10,49 kg (T-BS1) do 15,31 kg (K-BS4), a Student t-testom nije uočena značajna razlika između kontrolne i tretman grupe na svakoj farmi BS 1 ($P=0,2570$); BS2 ($P=0,7676$); BS 3 ($P=0,5765$) i BS 4 ($P=0,5130$). Istim statističkim testom utvrđeno je da dodavanje preparata Patente Herba® Plus u hrani tokom 28 dana eksperimenta nije dovelo do razlika u telesnoj masi prasadi kontrolne i tretman grupe na svakoj od četiri ispitivanih farmi BS 1 ($P=0,4582$); BS 2 ($P=0,3221$); BS 3 ($P=0,4057$) i BS 4 ($P=0,5063$).

Tabela 5.12. Telesne mase prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus 0. dana i 28. dana ogleda na ispitivanim farmam različitih biosigurnosnih nivoa.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>0. dan (kg)</i>					
Farma BS 1					
K-BS1	11,32	1,59	9,38	14,00	14,04
T-BS1	10,49	1,41	8,63	13,13	13,39
Farma BS 2					
K-BS2	12,93	1,99	10,63	16,10	15,36
T-BS2	13,23	2,15	10,02	16,78	16,26
Farma BS 3					
K-BS3	14,30	1,89	11,56	16,65	13,14
T-BS3	14,86	2,31	11,45	18,02	15,53
Farma BS 4					
K-BS4	15,31	1,89	12,76	17,75	12,33
T-BS4	14,76	1,55	12,74	16,73	10,49
<i>28. dan (kg)</i>					
Farma BS 1					
K-BS1	19,35	3,35	14,88	24,88	17,30
T-BS1	20,79	4,61	15,50	31,00	22,19
Farma BS 2					
K-BS2	20,48	1,86	18,38	24,13	9,09
T-BS2	21,46	2,22	18,43	24,70	10,33
Farma BS 3					
K-BS3	24,16	3,48	18,44	29,16	14,42
T-BS3	25,57	3,53	20,45	31,25	13,81
Farma BS 4					
K-BS4	26,07	4,09	19,56	32,74	15,67
T-BS4	27,29	3,52	20,17	31,28	12,90

Efekat fitogenog aditiva na prirast prasadi. Prosečan ukupan i dnevni prirast prasadi tokom celog perioda ogleda prikazan je u Tabela 5.13. Poređenjem kontrolne i tretman grupe t-testom u okviru iste farme uočen je značajno bolji ukupni prirast 8,23 kg ($P=0,0349$) i dnevni prirast 0,294 kg ($P=0,0345$) u grupi T-BS2 u odnosu na grupu K-BS2 gde je ukupni prirast bio 7,54 kg, a dnevni prirast 0,269 kg, dok na drugim farmama različitih biosigurnosnih nivoa nisu utvrđene razlike u ukupnom i dnevnom prirastu kontrolne i tretman grupe prasadi za farme BS 1 ($P=0,099$); BS 3 ($P=0,259$); i BS 4 ($P=0,193$).

Analizom varijanse (One-way ANOVA uz Tukey *post-hoc* test) parametra prirasta kontrolnih i tretman grupa prasadi na svim farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima nakon četiri nedelje eksperimenta utvrđeno je da je najmanji ukupni prirast (7,54 kg) i dnevni prirast (0,269 kg) imala kontrolna grupa prasadi farme sa biosigurnosnim nivoom 2 (K-BS2), koja se značajno razlikovala od obe grupe prasadi

na farmi BS4 i tretman grupe prasadi na farmi BS 3 ($P<0,0001$). Grupa koja je u hrani dobijala preparat Patente Herba® Plus na farmi BS 4 postigla je najbolji ukupni (12,53 kg) i dnevni prirast (0,447 kg), koji je bio značajno viši u poređenju sa K-BS1, K-BS2 i T-BS2 grupom prasadi ($P<0,0001$).

Tabela 5.13. Rezultati ukupnog i dnevnog prirasta prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom ogleada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
Ukupni prirast (kg)					
Farma BS 1					
K-BS1	8,03 ^{AC}	1,92	5,50	10,88	23,94
T-BS1	10,31 ^{ABC}	3,40	6,25	17,88	32,93
Farma BS 2					
K-BS2	7,54 ^{aA}	0,55	6,59	8,130	7,28
T-BS2	8,23 ^{bAC}	0,71	7,40	9,830	8,65
Farma BS 3					
K-BS3	9,86 ^{ABC}	1,71	6,88	12,51	17,37
T-BS3	10,71 ^{BC}	1,34	9,00	13,23	12,47
Farma BS 4					
K-BS4	10,76 ^{BC}	2,88	6,13	16,90	26,72
T-BS4	12,53 ^B	2,64	6,41	15,39	21,06
Dnevni prirast (kg)					
Farma BS 1					
K-BS1	0,287 ^{AC}	0,368	0,196	0,388	23,97
T-BS1	0,368 ^{ABC}	0,121	0,223	0,638	32,91
Farma BS 2					
K-BS2	0,269 ^{aA}	0,020	0,235	0,290	7,33
T-BS2	0,294 ^{bAC}	0,025	0,264	0,351	8,65
Farma BS 3					
K-BS3	0,352 ^{ABC}	0,061	0,246	0,447	17,37
T-BS3	0,382 ^{CB}	0,048	0,321	0,473	12,47
Farma BS 4					
K-BS4	0,384 ^{CB}	0,103	0,219	0,604	26,72
T-BS4	0,447 ^B	0,094	0,229	0,550	21,06

U okviru iste farme u istoj koloni različita slova (^{a, b}) ukazuju na stepen značajnosti $P<0,05$ (t-test); U istoj koloni različita slova (^{A, B, C}) ukazuju na stepen značajnosti $P<0,05$ (ANOVA uz Tukey *post-hoc* test).

Efekat fitogenog aditiva na konzumaciju i konverziju hrane. Ukupna i dnevna konzumacija hrane prikazana je u Tabeli 5.14. Nakon 28 dana eksperimenta nije uočena razlika u ukupnoj i dnevnoj konzumaciji hrane između kontrolne i tretman grupe prasadi u okviru svake farme BS 1 ($P=0,5214$); BS 2 ($P=0,4577$); BS3 ($P=0,7882$) i BS 4 ($P=0,1177$). Međutim, analizirajući sve grupe na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima pokazano je da je najmanju ukupnu (16,71 kg) i dnevnu konzumaciju (0,597 kg) imala grupa K-BS1, koja se značajno razlikovala samo od T-BS4 grupe prasadi koja je imala najvišu ukupnu konzumaciju hrane 21,05 kg ($P=0,1133$) i dnevnu konzumaciju hrane 0,752 kg ($P=0,1128$) tokom ogleada.

Tabela 5.14. Rezultati ukupne i dnevne konzumacije hrane prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom oglada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>Ukupna konzumacija (kg)</i>					
Farma BS 1					
K-BS1	16,71 ^A	3,59	13,18	23,25	21,48
T-BS1	17,77 ^{AB}	3,27	13,29	22,91	18,40
Farma BS 2					
K-BS2	17,56 ^{AB}	2,75	14,44	22,35	15,67
T-BS2	18,48 ^{AB}	2,36	15,65	22,55	12,74
Farma BS 3					
K-BS3	18,51 ^{AB}	3,08	15,27	23,33	16,66
T-BS3	18,86 ^{AB}	2,29	15,29	22,11	12,16
Farma BS 4					
K-BS4	18,88 ^{AB}	2,58	15,29	22,78	13,65
T-BS4	21,05 ^B	2,98	16,13	24,84	14,13
<i>Dnevna konzumacija (kg)</i>					
Farma BS 1					
K-BS1	0,597 ^A	0,128	0,471	0,830	21,46
T-BS1	0,635 ^{AB}	0,117	0,475	0,818	18,36
Farma BS 2					
K-BS2	0,627 ^{AB}	0,098	0,516	0,798	15,65
T-BS2	0,660 ^{AB}	0,084	0,559	0,805	12,74
Farma BS 3					
K-BS3	0,661 ^{AB}	0,110	0,545	0,833	16,66
T-BS3	0,673 ^{AB}	0,082	0,546	0,790	12,16
Farma BS 4					
K-BS4	0,674 ^{AB}	0,092	0,546	0,814	13,65
T-BS4	0,752 ^B	0,106	0,576	0,887	14,13

U istoj koloni različita slova (^A^B) ukazuju na stepen značajnosti $P < 0,05$ (ANOVA uz Tukey *post-hoc* test).

Konverzija hrane prasadi tokom oglada prikazana je u Tabeli 5.15. Poređenjem grupa prasadi pomoću t-testa u okviru iste farme utvrđena je značajno bolja konverzija tretman grupe prasadi na farmi BS 1 1,791 kg/kg u odnosu na kontrolnu grupu 2,108 kg/kg ($P=0,0121$), dok na drugim farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima nije uočena razlika u konverziji hrane prasadi BS2 ($P=0,1997$); BS 3 ($P=0,0730$) i BS 4 ($P=0,5659$).

Posmatrajući sve kontrolne grupe i grupe prasadi koje su putem hrane dobijale preparat Patente Herba® Plus tokom četiri nedelje eksperimenta, uočeno je da su tretman grupe na farmama BS 3 i BS 4 postigle najbolju konverziju (1,764 kg/kg i 1,732 kg/kg) koja se značajno razlikovala od kontrolne grupe prasadi na farmi BS 1 gde je zabeležena konverzija 2,108 kg/kg ($P=0,0169$). Razlike nisu utvrđene u konverziji hrane ostalih ispitivanih grupa prasadi ($P > 0,05$).

Tabela 5.15. Rezultati konverzije hrane prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom oglada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Minimum	Maksimum	Koeficijent varijacije c_v (%)
<i>Konverzija (kg/kg)</i>					
Farma BS 1					
K-BS1	2,108 ^{a A}	0,219	1,840	2,500	10,38
T-BS1	1,791 ^{b AB}	0,255	1,270	2,130	14,22
Farma BS 2					
K-BS2	1,949 ^{AB}	0,079	1,863	2,124	4,04
T-BS2	1,865 ^{AB}	0,171	1,580	2,077	9,15
Farma BS 3					
K-BS3	1,887 ^{AB}	0,165	1,642	2,219	8,73
T-BS3	1,764 ^B	0,099	1,621	1,921	5,61
Farma BS 4					
K-BS4	1,821 ^{AB}	0,320	1,348	2,494	17,60
T-BS4	1,732 ^B	0,321	1,437	2,516	18,54

U okviru iste farme u istoj koloni različita slova (^{a, b}) ukazuju na stepen značajnosti $P < 0,05$ (t-test); U istoj koloni različita slova (^{A, B}) $P < 0,05$ (ANOVA uz Tukey *post-hoc* test).

5.12. Uticaj tretmana i biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate prasadi

Uticaj tretmana i biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate prasadi nakon 28 dana oglada prikazani su u Tabeli 5.16. Two-way ANOVA analizom utvđen je značajan efekat primene preparata Patente Herba® Plus na ukupan i dnevni prirast prasadi ($P=0,0068$), a isti efekat je uočen i sa primenjenim biosigurnosnim nivoima na ukupan ($P=0,0075$) i dnevni prirast prasadi ($P=0,0074$). Nije uočen efekat tretmana na ukupnu ($P=0,1039$) i dnevnu konzumaciju ($P=0,1036$), dok su primenjeni biosigurnosni nivoi na farmama imali značajan uticaj na ukupnu ($P=0,0435$) i dnevnu konzumaciju hrane ($P=0,0434$). Uočen je i značajan efekat preparata na konverziju hrane ($P=0,0046$), dok biosigurnosni nivoi nisu imali značajan uticaj na ovaj parametar ($P=0,0906$). Interakcijom biosigurnosnih nivoa i tretmana nisu značajno promenjeni praćeni parametri za ukupni prirast ($P=0,7498$), dnevni prirast ($P=0,7488$), ukupnu konzumaciju ($P=0,8169$), dnevnu konzumaciju ($P=0,8166$) i konverziju hrane ($P=0,3457$).

Tabela 5.16. Rezultati uticaja tretmana (Patente Herba® Plus), biosigurnosnih nivoa i njihovih interakcije na proizvodne rezultate prasadi tokom 28 dana oglada.

Parametar	Tretman (T)	Biosigurnosni nivo (BS)	Interakcija (T×BS)
Ukupni prirast	**	**	ns
Dnevni prirast	**	**	ns
Ukupna konzumacija	ns	*	ns
Dnevna konzumacija	ns	*	ns
Konverzija	**	ns	ns

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns-nije značajno (Two-way ANOVA)

6. DISKUSIJA

6.1. Biosigurnosne mere na farmama

Prevenција nastanka bolesti kod životinja je izuzetno značajna imajući u vidu sve veće potrebe za efikasnom i održivom proizvodnjom i globalnog porasta zabrinutosti potrošača zbog velike i učestale upotrebe antibiotika u stočarskoj proizvodnji. Kada je prevenција u pitanju, biosigurnosne mere su veoma važne preventivne mere, jer sprečavaju ulazak patogena na farmu i njegovo širenje unutar farme (Amass i Clark, 1999; Laanen i sar., 2014). Nivo biološke sigurnosti na farmama svinja u eksperimentu ove doktorske disertacije procenjen je prethodno validovanim sistemom bodovanja biosigurnosnih mera BioCheck.UGent™. BioCheck.UGent™ upitnik obuhvatao je šest potkategorija za eksternu i šest potkategorija za internu biološku sigurnost (Laanen i sar., 2010). Ovim sistemom bodovanja vrši se kvantifikacija eksternih, internih i ukupnih biosigurnosnih mera na farmama svinja, pa se na taj način omogućava poređenje statusa biosigurnosnih nivoa. U sistemu bodovanja svaki odgovor ima određenu važnost, tako da je broj poena svakog odgovora u vezi sa njegovom značajnošću u preveniji bolesti u zapatu. Sprečavanje unošenja patogenih uzročnika na farme svinja predstavlja veliki izazov, kako za uzgajivače svinja, tako i za veterinare. Biosigurnosne mere predstavljaju važne mere koje doprinose održavanju zdravstvenog stanja zapata svinja (Amass i Clark, 1999).

U ovoj doktorskoj disertaciji utvrđene su vrednosti različitih kategorija internih, eksternih i ukupnih biosigurnosnih mera u okviru četiri različite farme na teritoriji Srbije. Dobijene vrednosti su posmatrane u odnosu na prosečne vrednosti za date parametre u Srbiji i svetu, i najzad, komentarisane su i razlike u dobijenim rezultatima između datih farmi. Vrednost ukupnih biosigurnosnih mera je zatim korišćena za utvrđivanje linearne korelacione zavisnosti sa brojem bakterija *L. intracellularis* u facesu prasadi. Dodatno, ispitivan je i uticaj kvantitativno izražene vrednosti ukupnih biosigurnosnih mera na farmi na proizvodne rezultate prasadi nakon 28 dana ogleđa.

Odnos između eksternih i internih biosigurnosnih mera na ispitivanim farmama. Poređenjem vrednosti eksternih biosigurnosnih mera (mere koje se odnose na sprečavanje unošenja patogena na farmu) i vrednosti internih biosigurnosnih mera (mere koje se odnose na sprečavanje širenja patogena unutar farme), u ovoj doktorskoj disertaciji je utvrđeno da su na svim farmama, izuzev farme BS 2, vrednosti eksternih biosigurnosnih mera bile više od vrednosti internih biosigurnosnih mera, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživača (Laanen i sar., 2013; Backhans i sar., 2015; Rodrigues da Costa i sar., 2019). Jedan od razloga kojim se može objasniti ovaj rezultat je taj da je uzgajivačima

lakše postaviti pravila posetiocima farme, nego menjati sopstvene nevikle. Drugi razlog može biti da su uzgajivači svesniji rizika unošenja patogena sa drugih farmi i samim tim obraćaju više pažnje na eksterne biosigurnosne mere (Postma i sar., 2016).

Odstupanje od navedenih rezultata na farmi BS 2, gde su vrednosti internih biosigurnosnih mera bile više od eksternih, može se objasniti činjenicom da je farma BS 2 bila najmanjeg kapaciteta (250 krmača), što je u skladu sa istraživanjem Laanen i sar. (2013) gde je uočeno da veći zapati svinja imaju veće vrednosti eksternih biosigurnosnih mera. Takođe, u istraživanju Backhans i sar. (2015) pokazano je da je viši nivo obrazovanja osobe odgovorne za životinje povezan sa znatno višom ocenom internih biosigurnosnih mera, što je u saglasnosti sa našim istraživanjem gde je utvrđen najviši stepen obrazovanja upravnika i radnika na farmi BS 2 (rezultati nisu prikazani).

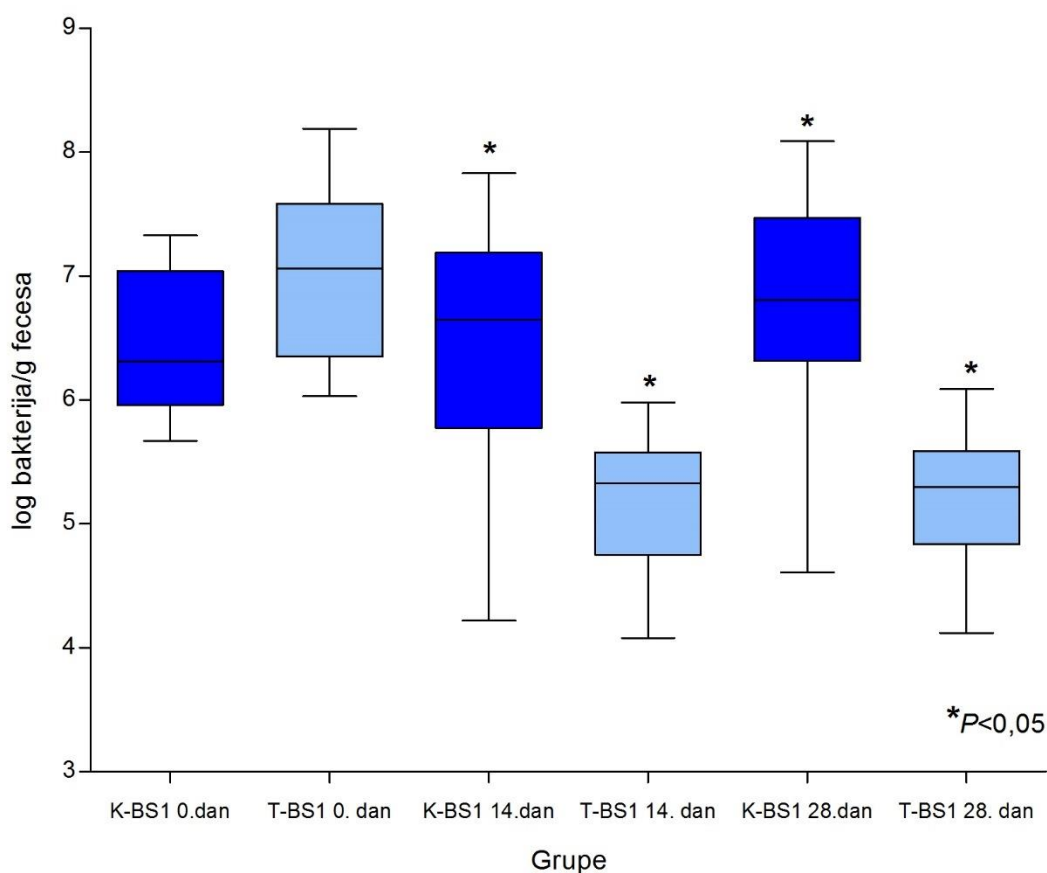
Ukupne vrednosti biosigurnosnih mera na ispitivanim farmama. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je najvišu vrednost biosigurnosnih mera imala farma BS 4 (86%), koja je ujedno bila i najveća farma (kapacitet 1600 krmača), dok je nešto nižu vrednost imala farma BS 3 (77%), koja je bila malo manjeg kapaciteta (1400 krmača), što je u skladu sa rezultatima drugih autora kod kojih je, kao što je prethodno pomenuto, uočeno da postoji direktna proporcionalnost između biosigurnosnih nivoa i veličine zapata, ukazujući da se više pažnje posvećuje biosigurnosnim merama na većim farmama (Boklund i sar., 2004; Laanen i sar., 2013). Prema Laanen i sar. (2013) na većim farmama je lakše primeniti veći stepen eksternih i internih biosigurnosnih mera.

6.2. Efikasnosti fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) u kontroli PE na farmama različitih biosigurnosnih nivoa

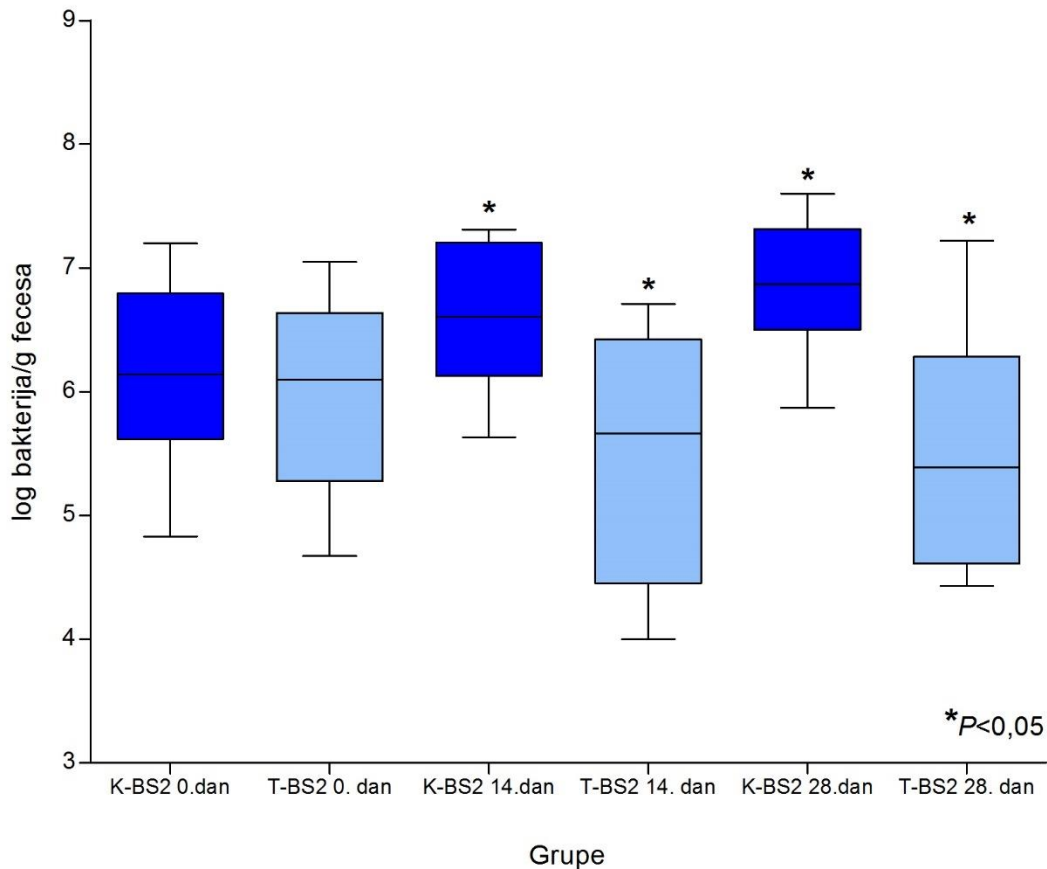
Proliferativna enteropatija (PE) prouzrokovana bakterijom *L. intracellularis* smatra se jednom od važnih bolesti svinja na farmama širom sveta, koje dovode do značajnih finansijskih gubitaka u svinjarskoj proizvodnji. Pogrešno postavljena dijagnoza može dovesti do prekomerne upotrebe antibiotika što se dalje odražava neefikasnom i skupom terapijom, kao i antimikrobnom rezistencijom mikroorganizama na farmama (Szcotka i sar., 2011). Subklinička forma bolesti je česta, ali relativno je teško potvrditi mikrobiološkim testovima (McOrist, 2005). IHC analiza se smatra najboljim dijagnostičkim testom za potvrdu PE u crevima svinja (Guedes i sar., 2002b), dok se real-time PCR uspešno primenjuje u rutinskoj dijagnostici, kao i u otkrivanju subkliničkih infekcija *L. intracellularis* (Lindecrona i sar., 2002; Wattanaphansa i sar., 2010b). Razvojem kvantitativne PCR (qPCR) metode poslednjih godina omogućeno je rutinski utvrđivanje broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu, a

dotatno ova metoda se može koristiti i za određivanje težine kliničke slike inficiranih svinja (Pedersen i sar., 2012; Collins i Barchia, 2014).

Primenom qPCR metode tokom 28 dana ogleda na farmama BS 1 i BS 2, koje su ujedno imale i najmanju ukupnu vrednost biosigurnosnih mera (60% i 64%, pojedinačno), uočen je značajno manji broj *L. intracellularis* u fecesu prasadi 14. i 28. dana ogleda kod grupa T-BS 1 i T-BS 2, koje su putem hrane dobijale preparat Patente Herba® Plus, u poređenju sa kontrolnim grupama (K-BS1 i K-BS2), koje su dobijale potpunu krmnu smešu bez dodataka. Takođe, praćenjem broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi kontrolne i tretman grupe tokom vremena na farmi BS 1 utvrđeno je da je dodavanje preparata u hrani imalo pozitivan efekat 14. i 28. dana, odnosno da je kod tretman grupe prasadi broj bakterija u fecesu bio značajno niži nakon dve i četiri nedelje suplementacije u odnosu na 0. dan eksperimenta (Grafikon 6.1. i Grafikon 6.2.).



Grafikon 6.1. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (log₁₀ bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 1.



Grafikon 6.2. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 2.

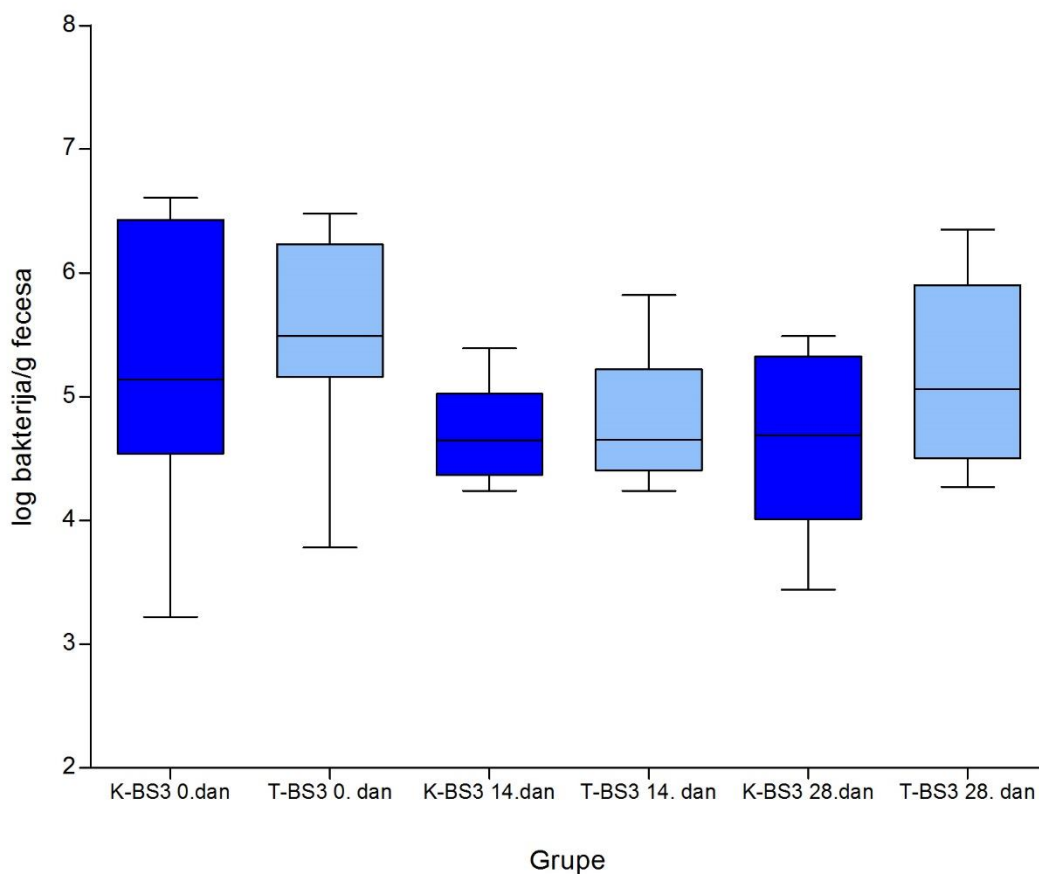
Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je fitogeni aditiv Patente Herba® Plus, kao mešavina etarskih ulja (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* i *Coriandrum sp.*), biljnog ekstrakta *Castanea sativa*, lizozima i nikotinamida uticao na redukciju broja bakterija u fecesu, što je u saglasnosti sa ranije publikovanim rezultatima Draskovic i sar. (2018). Ove rezultate potvrđuje i studija Papatsiros i sar. (2009) u kojoj je utvrđeno da suplementacija fitogenog aditiva na bazi biljnih ekstrakata *O. vulgare* i *Alium sativum* smanjuje učestalost pojave dijareje i procenat pozitivnih uzoraka fecesa na *L. intracelularis* kod prasadi.

Mehanizam dejstva većine fitogenih aditiva još uvek nije u potpunosti razjašnjen, ali je široko poznat i potvrđen njihov antimikrobni i antioksidativni efekat, i njihova uloga kao promotora rasta, s obzirom da ostvaruju pozitivni efekat na proizvodne rezultate svinja (Windisch i sar., 2008). Etarska ulja su kompleksne mešavine različitih fenolnih jedinjenja, od kojih su najviše zastupljeni karvakrol i timol. Imajući to u vidu, njihova antimikrobna aktivnost koja se ogleda u inhibiranju rasta gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, ne zasniva na jednom, specifičnom mehanizmu, već oni interferiraju sa više ćelijskih puteva (Palaniappan i Holley, 2010). Hidrofobna priroda etarskih ulja omogućava im da se integrišu u lipide ćelijske membrane čime povećavaju njenu permeabilnost. Promena u permeabilnosti membrane nastaje kao posledica gubitka jona i smanjenja membranskog potencijala, kolapsa protonske pumpe i gubitka ATP-a, koji dalje dovodi do curenja intracelularnih konstituenata, koagulacije intracelularnog sadržaja, lize i ćelijske smrti (Burt, 2004).

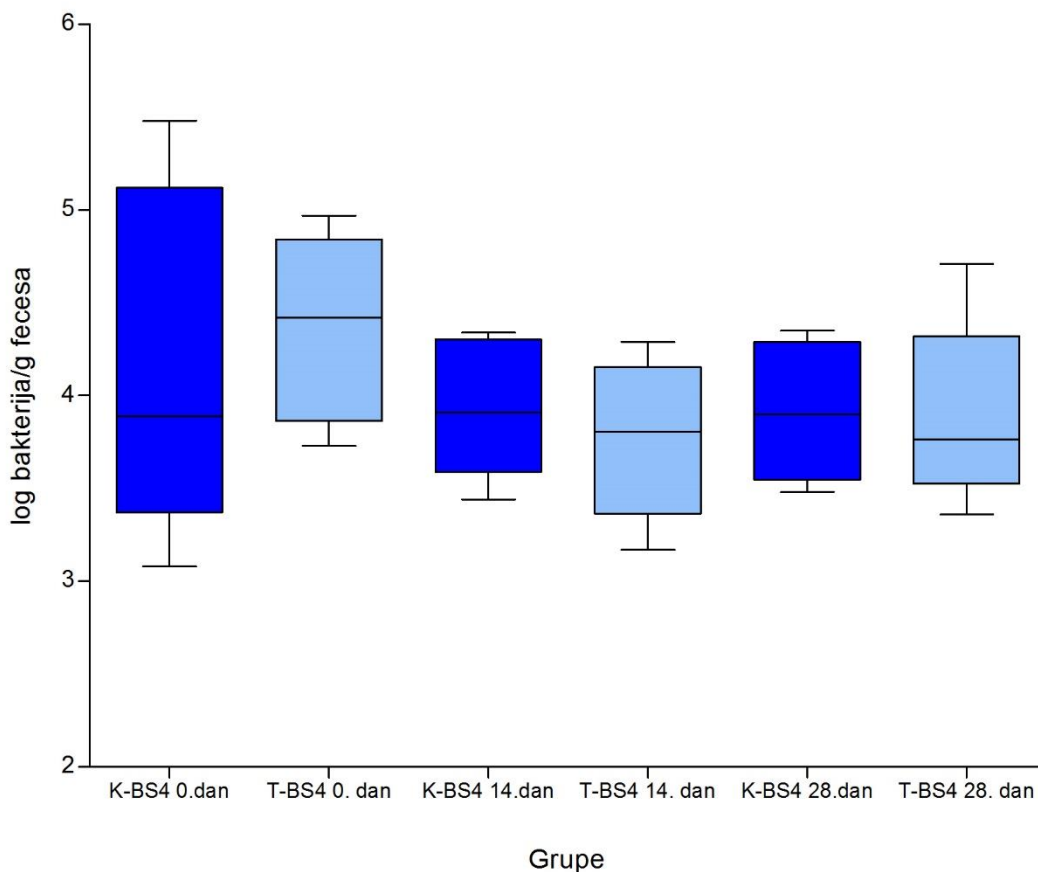
Malo je podataka u literaturi koji se odnose na *L. intracellularis* kod svinja i mogućnosti njenog suzbijanja u zapatu. Jedan od pokušaja bio je da se razvije živa atenuirana vakcina, pa su tako Nogueira i sar., (2013) pokazali da svinje koje su primile Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim) vakcinu su izlučivale značajno manji broj bakterija *L. intracellularis* u poređenju sa nevakcinisanim svinjama. Zatim, u novijoj studiji Opriessnig i sar., (2019) praćen je efekat probiotoka na prisustvo *L. intracellularis* u fecesu svinja. Oni su utvrdili da je kod veštački inficiranih svinja koje su putem hrane dobijale probiotske bakterije *Bacillus licheniformis* i *B. pumilus* došlo do kasnijeg izlučivanja *L. intracellularis*, kao i da su bakterije *B. pumilus* davane putem hrane značajno smanjile broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu u poređenju sa vakcinisanim svinjama i svinjama koje su bile pozitivna kontrola. Autori su ovaj nalaz objasnili činjenicom da probiotici koji sadrže *Bacillus* spp. proizvode materije koje mogu imati direktno dejstvo na *L. intracellularis*, tako što inhibiraju adheziju ili ulazak patogena u ćelije domaćina.

Prema našim saznanjima, malo je istraživanja koja su se bavila mogućnošću kontrole prirodne infekcije *L. intracellularis* prasadi korišćenjem fitogenog aditiva na bazi etarskih ulja. Dodatno, u eksperimentu ove doktorske disertacije praćen je i uticaj različitih biosigurnosnih nivoa na farmi na efikasnost ispitivanog preparata. Na farmama BS 3 i BS 4, koje su imale i najveće vrednosti biosigurnosnih mera (77% i 86%, pojedinačno), za svaki period uzorkovanja fecesa (0., 14. i 28. dan) nije bilo značajnih razlika u broju izlučenih bakterija *L. intracellularis* između kontrolne i tretman grupe prasadi (Grafikon 6.3. i Grafikon 6.4.). Uzimajući prethodno navedeno u obzir može se zaključiti da je preventivna mera koja podrazumeva primenu fitogenih aditiva u ishrani svinja efikasnija na farmama koje imaju nizak

nivo biosigurnosnih mera, odnosno da se na taj način može efikasno smanjiti broj izlučenih bakterija *L. intracellularis* u fecesu svinja.



Grafikon 6.3. Broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 3.

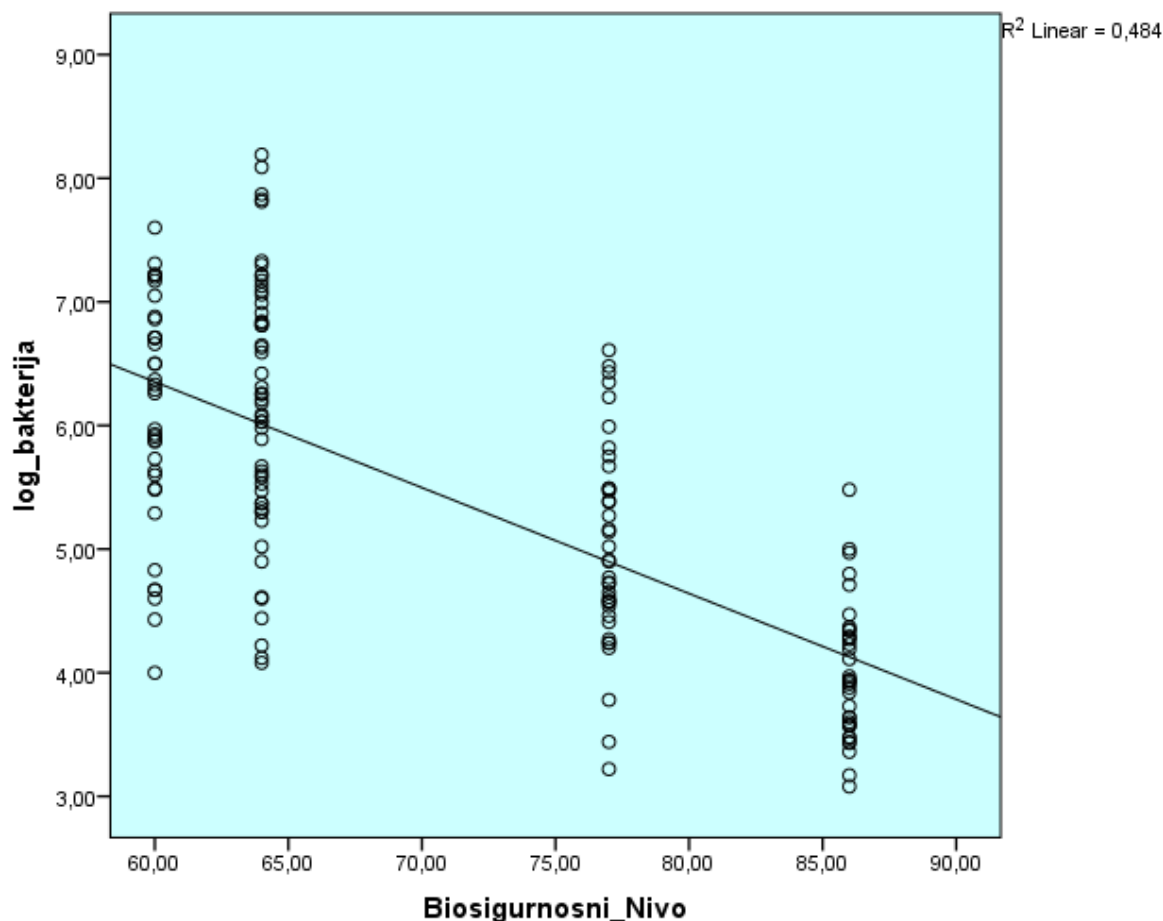


Grafik 6.4. Broj baterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) dobijen qPCR kvantifikacijom 0., 14. i 28. dana uzorkovanja fecesa nakon tretmana prasadi ispitivanim aditiva na farmi BS 4.

6.3. Korelaciona zavisnost broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu, biosigurnosnog nivoa farme, tretmana i dužine tretmana

Naši rezultati ispitivanja korelacione zavisnosti između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi i biosigurnosnih novoa na farmama pokazali su da je sa većom vrednošću biosigurnosnih mera broj bakterija u fecesu prasadi bio manji (Grafikon 6.5.). Ovaj nalaz implicira značaj primene biosigurnosnih mera na prevalencu infekcije bakterijom *L. intracellularis* kod svinja. U prilog ovome govore i rezultati Laanen i sar. (2013) koji su ukazali da poboljšanje biosigurnosnih mera dovodi do boljeg zdravstvenog statusa zapata, a time i do smanjene potrebe za antibioticima. Dodatno, Postma i sar. (2015) su takođe pokazali da se poboljšanje internih biosigurnosnih mera na farmama, kao što su npr. strožiji higijenski protokoli i poštovanje principa mera „sve unutra - sve napolje“ (all in/all out),

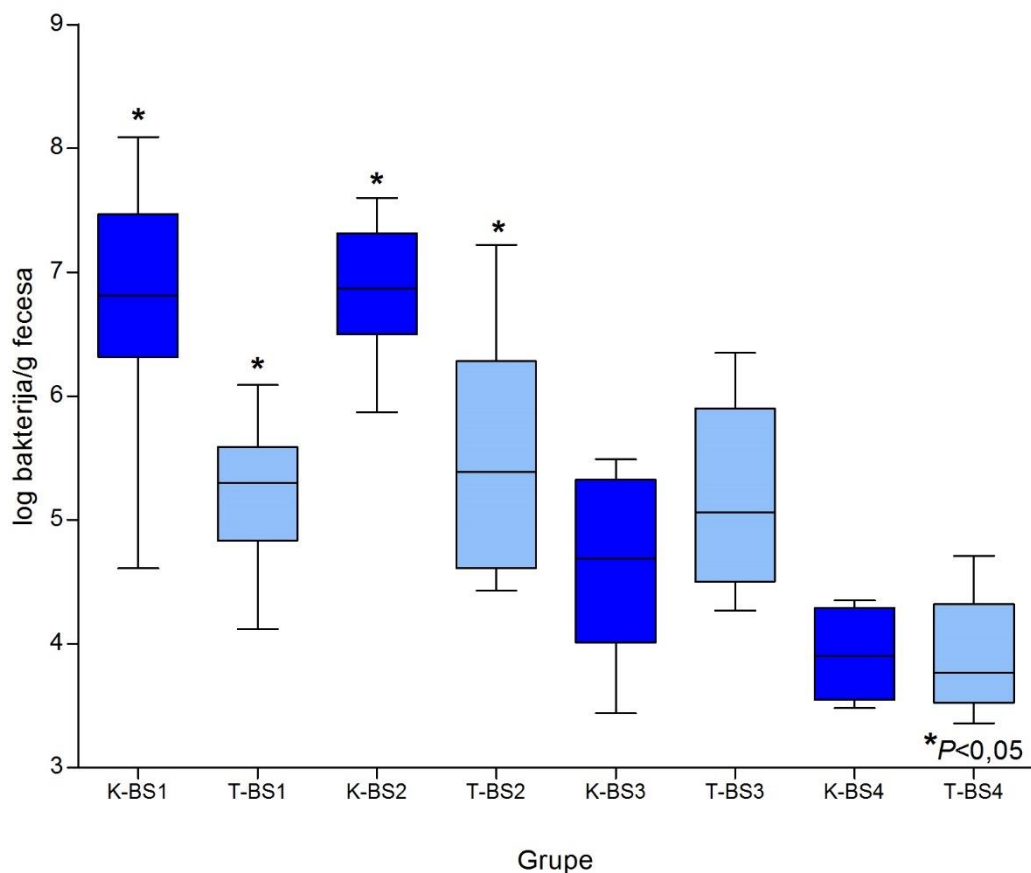
može smatrati prilično jednostavnim rešenjem kojim se smanjuje potreba za korišćenjem antibiotika u terapiji svinja. Obrnuta proporcionalnost između zdravstvenog statusa zapata i nivoa biosigurnosti, ranije potvrđena od strane više autora (Amass i Clark, 1999; Postma i sar., 2015; Postma i sar., 2017; Collineau i sar., 2017), sugerise da je manja prevalenca bolesti u zapatima sa boljim biosigurnosnim merama, odnosno da bi se na biosigurnosne indikatore moglo gledati kao na mere za prevenciju bolesti.



Grafikon 6.5. Korelaciona zavisnost biosigurnosnih nivoa i broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu (\log_{10} bakterija/g fecesa) na ispitivanim farmama

Slično pokazuju i rezultati ove doktorske disertacije, gde je ustanovljeno da primena fitogenog aditiva nije imala značajni uticaj na broj izlučenih bakterija *L. intracellularis* na farmama sa višim biosigurnosnim nivoima (farma BS 3 i farma BS 4). Naime, broj izlučenih bakterija po gramu fecesa kod prasadi gajenih na ovim farmama tokom četiri nedelje eksperimenta bio je manji u poređenju sa ostalim farmama (farma BS 1 i farma BS 2). Ovakav nalaz se može objasniti time da su farme sa većim biosigurnosnim merama imale bolji zdravstveni statusa zapata, pa je izostao efekat primene

supplementa, koji je takođe preventivna mera za određena patološka stanja digestivnog trakta (Grafikon 6.6.). Ovaj naš stav je u saglasnosti sa ranijim rezultatima Laanen i sar. (2013) i Postma i sar. (2015), koji ističu da sa povećanjem nivoa biosigurnosnih mera dolazi do smanjene potrebe za upotrebom antibiotika u održavanju dobrog zdravstvenog statusa svinja.



Grafik 6.6. Uporedni prikaz broja bakterija *L. intracellularis* fecesu (log₁₀ bakterija/g fecesa) prasadi kontrolne i tretman grupe na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima 28. dana ispitivanja.

6.4. Mikroskopske promene, histomorfometrijska i imunohistohemijska analiza ileuma prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus

Odlučenje se smatra izuzetno stresnim periodom za prasad koji podrazumeva odbijenost od krmače, promenu ishrane i promenu ambijentalnih uslova (Pluske i sar., 1997). Tokom ovog perioda prasad je više izložena različitim patogenima, bakterijama izazivačima crevnih infekcija, među kojima je *L. intracellularis* koja dovodi do pojave PE (Kroll i sar., 2004).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazali su da suplementacija fitogenim aditivom Patente Herba® Plus utiče na morfologiju ileuma odlučene prasadi prirodno inficirane bakterijom *L. intracellularis*. Naime, uočeno je da je prosečna dubina crevnih kripti u ileumu bila značajno manja, a odnos visina resica/dubina kripti značajno veći kod prasadi koja je putem hrane dobijala ispitivani preparat. Proces varenja i apsorpcije hranljivih materija u velikoj meri zavisi od histomorfoloških karakteristika creva (Pluske i sar., 1997), odnosno pokazano je da povoljan odnos visine resica/dubina kripti povećava svarljivost hranljivih sastojaka (Shen i sar., 2009). Kako su plitke crevne kripte i visoke resice pokazatelji zdravlja creva (Qaisrani i sar., 2014; Peng i sar., 2016), ovaj pozitivni efekat fitogenog aditiva u hrani prasadi u saglasnosti je sa ranije objavljenim studijama (Manzanilla i sar., 2006; Oetting i sar., 2006; Nofrarias i sar., 2006). Pokazano je da antibiotici, kao i drugi dodaci hrani (prebiotici i probiotici) povećavaju visinu resica uz istovremeno smanjenje dubine kripte. Pored mnogih značajnih funkcija koje kripte imaju, one su i izvor multipotentnih matičnih ćelija koje učestvuju u izgradnji ćelija crevnih resica. Ubrzana zamena enterocita zahteva energiju i proteine, koji mogu usporiti rast i razvoj drugih tkiva i sistema organa, tako da smanjena dubina kripti se može dovesti u korelaciju sa boljim prirastom životinja (Marković i sar., 2009). U našem eksperimentu, visina crevnih resica nije se razlikovala između kontrolne i tretman grupe prasadi. U saglasnosti sa ovim rezultatima, Namkung i sar. (2004) takođe nisu uočili efekat mešavine kiselina i biljnog ekstrakta koji sadrži cimet, timijan i origano na visinu resica u digestivnom traktu prasadi. Slične nalaze su dobili i Nofrarias i sar. (2006) dodavanjem kombinacije biljnih ekstrakata koji sadrže 5% karvakrola (*Origanum* spp.), 3% cinamaldehyda (*Cinnamomum* spp.) i 2% uljanog ekstrakta paprike (*Capsicum annuum*). S druge strane, Kroismayr i sar. (2008) su pokazali da dodavanje etarskih ulja u hrani prasadi može da dovede čak do tendencije skraćivanja crevnih resica u jejunumu i ileumu. Površina vilusa takođe je bila nepromenjena nakon suplementacije preparata Patente Herba® Plus tokom četiri nedelje eksperimenta. Slično prethodno navedenom, Bilić-Šobot i sar. (2016) nisu uočili efekat dodavanja različitih količina

hidrosolubilnog ekstrakta bogatog taninima na površinu resica tankog i debelog creva veprova nakon 70 dana eksperimenta.

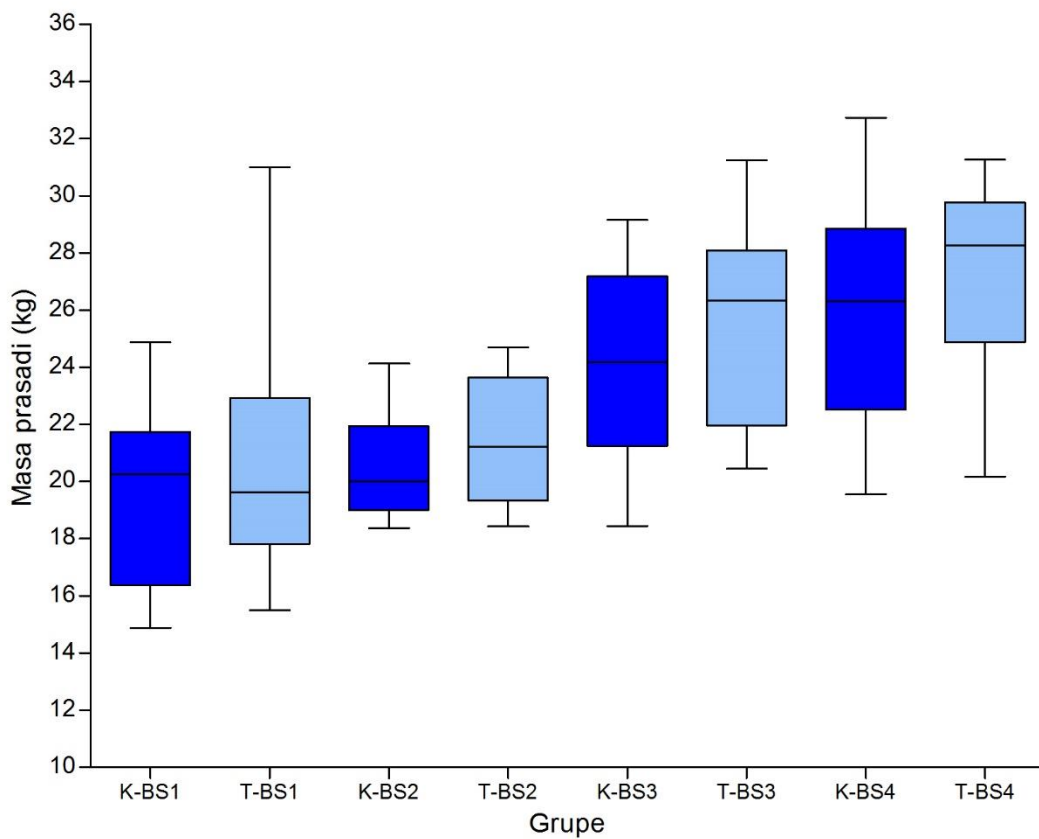
Broj peharastih ćelija procenjen u odnosu na 100 epitelnih ćelija nije se značajno razlikovao između tretman i kontrolne grupe prasadi, i bio je sličan onome koji su prijavili Nofrarias i sar. (2006). Za razliku od ovih nalaza, kod uznapredovalih stadijuma proliferativne enteropatije karakteristično je da postoji smanjenje broja, pa čak i potpuno odsustvo peharastih ćelija (McOrist i sar., 2006).

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da fitogeni aditivi mogu biti dobro alternativno sredstvo za kontrolu bakterijske infekcije svinja izazvane *L. intracellularis*, što je u saglasnosti sa rezultatima Papatsiros i sar. (2009) i Draskovic i sar., (2018). Imajući u vidu sve opasnosti koje izaziva antimikrobna rezistencija, blagotvorni efekti ispitivanog fitogenog aditiva u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuje nam da preparat Patente Herba® Plus ima potencijal kao zamena za antibiotike kod terapije subkliničkih formi PE. Pored toga, rezultati ove doktorske disertacije, sugerišu da bi dodaci ishrani koji sadrže mešavinu različitih biljnih ekstrakata i etarskih ulja mogli poboljšati histomorfometrijske parametre ileuma i posledično povećati apsorpciju i rast prasadi što, takođe ističu Drašković i sar. (2020) u svom prethodnom radu.

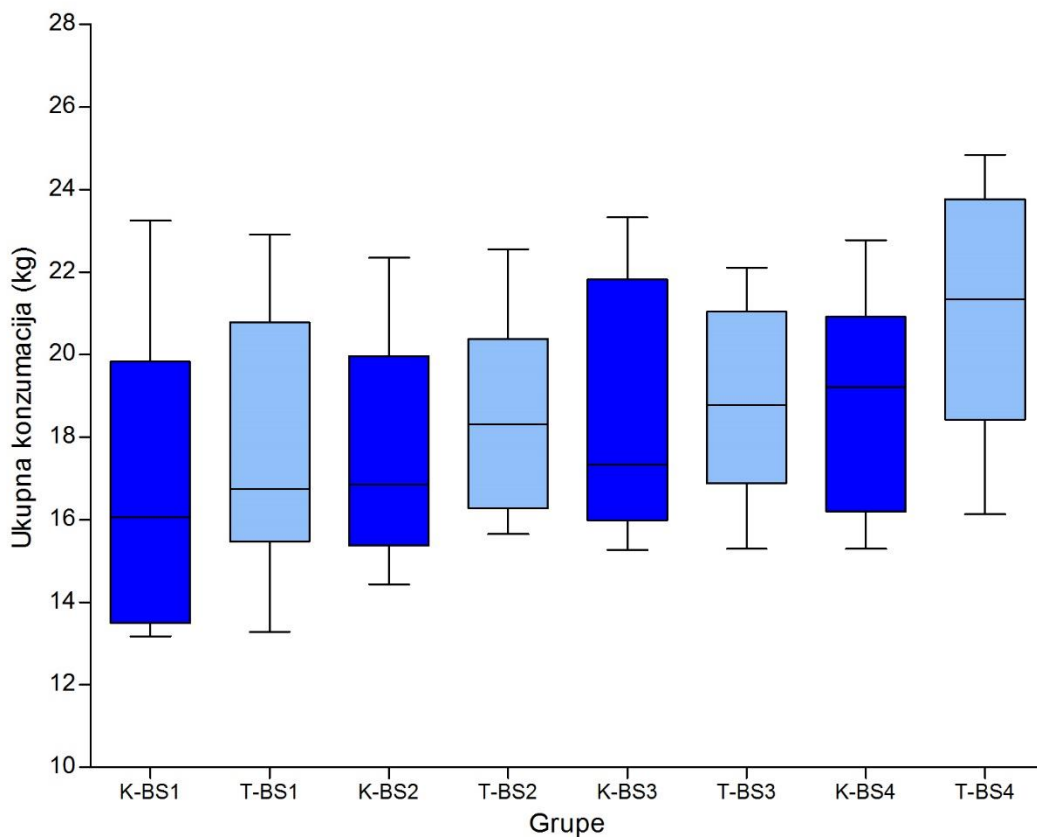
U ovoj doktorskoj disertaciji IHC semikvantitativno bodovanje (semikvantitativna analiza) pokazalo je da je ekspresija antigena *L. intracellularis* bila niža u uzorcima ileuma prasadi tretiranih fitogenim aditivom u odnosu na kontrolnu grupu, što vodi zaključku da primenjeni Patente Herba® Plus uslovljava smanjenje količine patogena u ileumu prasadi. Do sličnih rezultata, odnosno manju antigensku ekspresiju *L. intracellularis*, prethodno su u nezavisnim eksperimentima utvrdili Guedes i sar. (2009) i França i sar. (2010), primenom medicirane hrane sa 50 ppm tilvalozina (tylvalosin) i sa 180 ppm leukomicina (Leucomag 30% PR) u ishrani prasadi.

6.5. Uticaj fitogenog aditiva (Patente Herba® Plus) na proizvodne rezultate prirodno inficirane odlučene prasadi na farmama sa različitim biosigurnosnim nivoima tokom 28 dana ekpserimenta

Ispitivanjem proizvodnih rezultata u okviru eksperimenta ove doktorske disertacije može se uočiti da dodavanje fitogenog aditiva Patente Herba® Plus u hranu tretman grupe odlučene pasadi tokom četiri nedelje nije dovelo do razlika u telesnoj masi i konzumaciji hrane u odnosu na kontrolnu grupu na svakoj od četiri farme sa različitim biosigurnosnim nivoima (Grafikon 6.7. i Grafikon 6.8.).

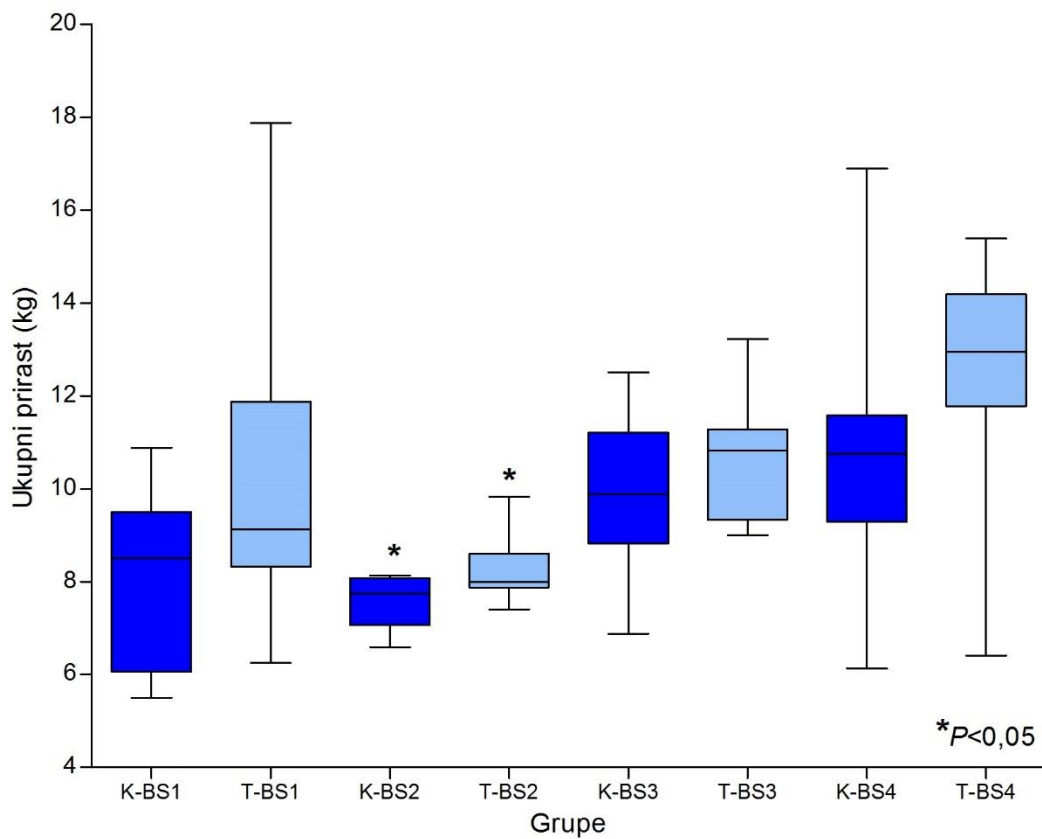


Grafikon 6.7. Uticaj fitogenog aditiva Patente Herba® Plus na telesnu mase prasadi tretiranih 28 dana na farmam sa razlicitim nivoima biosigurnosti.

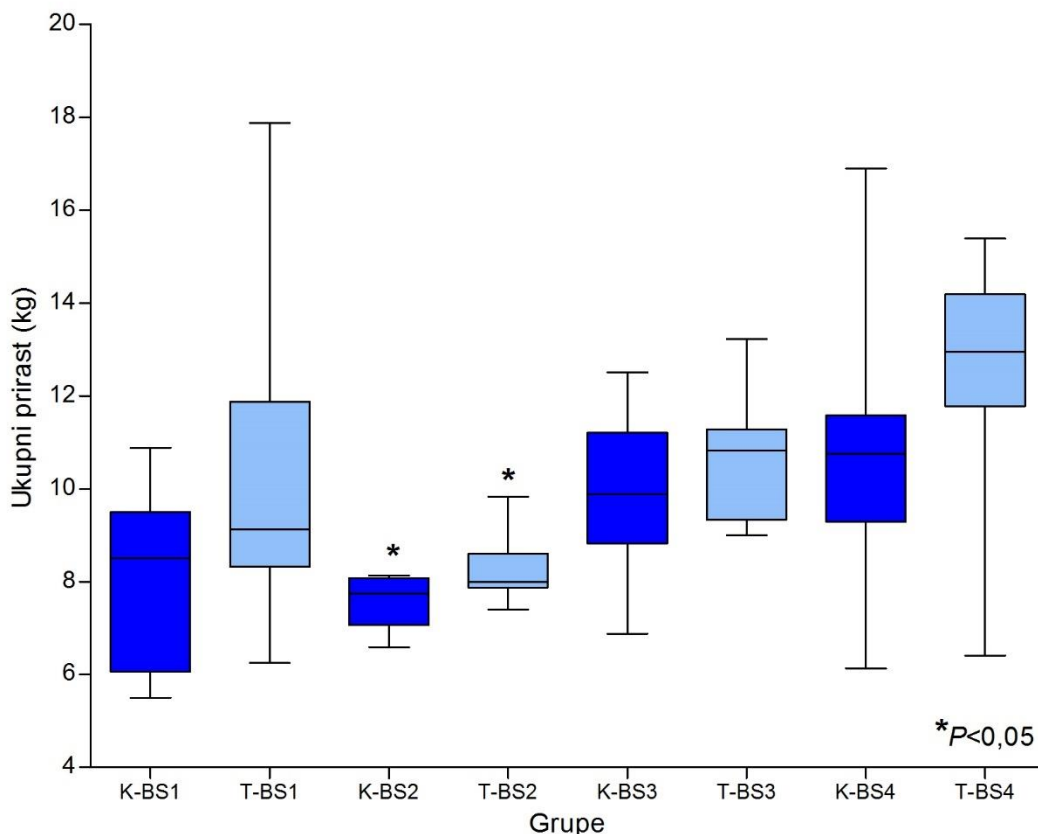


Grafikon 6.8. Rezultati ukupne konzumacije hrane prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom oglada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

S druge strane, pozitivni efekat fitogenog preparata utvrđen je na ukupni i dnevni prirast prasadi (Grafikon 6.9. i Grafikon 6.10.), kao i na konverziju (Grafikon 6.11.). Naime, uočene su veće vrednosti dnevnog i ukupnog prirasta u svim tretman grupama u poređenju sa kontrolnim grupama prasadi, međutim, statistički značajna razlika je zabeležena samo na farmi BS 2. Sličan trend kod tretman grupa uočen je i kod konverzije, s tim da je značajno niža vrednost u poređenju sa kontrolnom grupom utvrđena samo na farmi BS1.

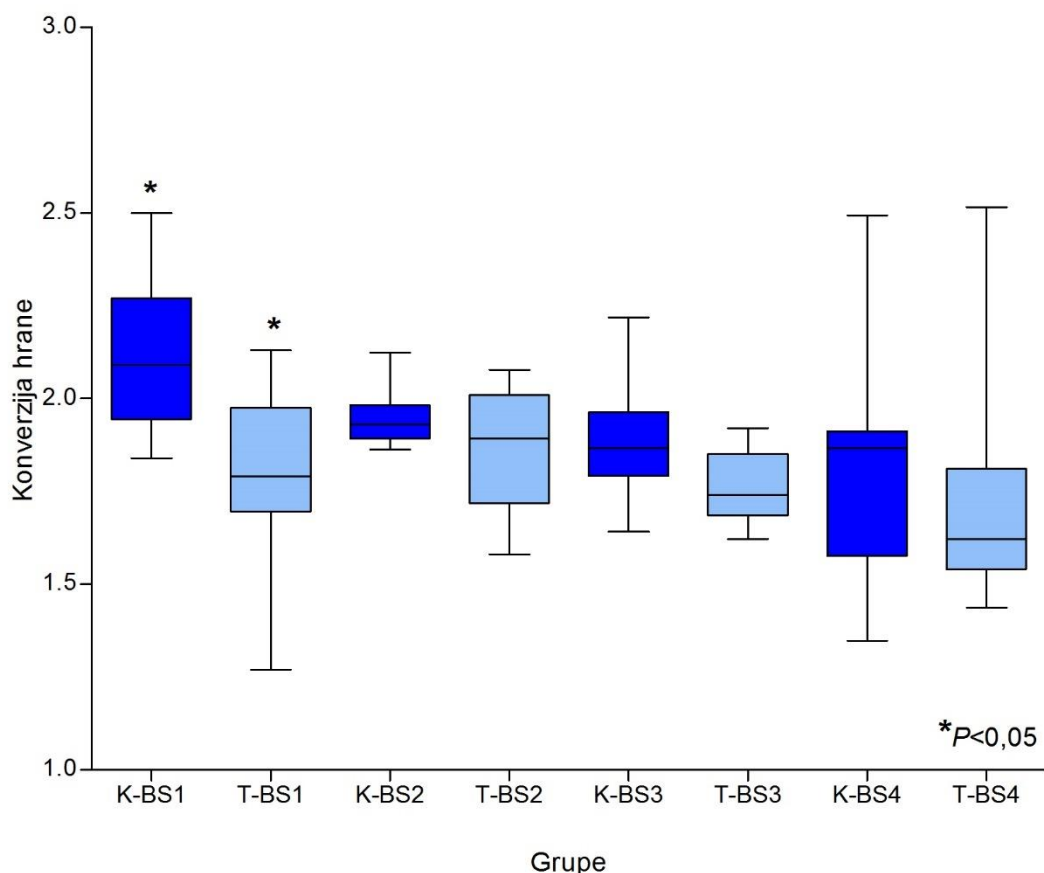


Grafik 6.9. Uticaj fitogenog aditiva Patente Herba® Plus na ukupni prirast tretiranih prasadi na farmama razlicitih biosigurnosnih nivoa.



Grafikon 6.10. Rezultati dnevnog prirasta prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom oglada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

Dodatno, primećeno je da je prasad na farmama sa bolje ocenjenim biosigurnosnim nivoima (farme BS 3 i BS 4) imala bolji prirast (Grafikon 6.9. i Grafikon 6.10.), konzumaciju (Grafikon 6.8.) i konverziju (Grafikon 6.11.) u odnosu na prasad koja je gajena na farmama sa nižim biosigurnosnim nivoima (farme BS 1 i BS 2). Takođe je uočeno postojanje značajne statističke razlike za sva tri posmatrana parametra (prirast, konzumacija i konverzija) između kontrolne grupe (farma sa najnižim biosigurnosnim nivoom; K-BS1) i tretman grupe prasadi (farma sa najvišim biosigurnosnim nivoom; T-BS4).



Grafikon 6.11. Rezultati konverzije hrane prasadi tretiranih fitogenim aditivom Patente Herba® Plus tokom oglada na farmama različitih biosigurnosnih nivoa.

Za razliku od naših rezultata, Papatsiros i sar. (2009) su pokazali da je primena fitogenog aditiva na bazi biljnih ekstrakata *O. vulgaris* i *A. sativum* u hrani odlučene prasadi prirodno inficirane *L. intracellularis* značajno povećala telesnu masu prasadi. Međutim, u studiji istih autora uočen je značajno viši dnevni prirast, bez razlika u konzumaciji, kod prasadi koji su putem hrane dobijali prethodno navedeni preparat, što je u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije. Fitogeni aditivi, a pre svega etarska ulja, deluju kao pojačivači ukusa i mirisa i generalno pospešuju rast životinja povećanim unosom hrane (Kroismayr i sar., 2008; Frankič i sar., 2009). Međutim, nepromenjeni unos hrane nakon suplementacije Patente Herba® Plus u našem esperimentu može se delimično objasniti i time da su u ogled bila uključena prirodno inficirana prasadi, koja nisu ispoljavala simptome, ili su bila sa blagim nespecifičnim simptomima bolesti, odnosno kod kojih je klinička forma bolesti izostala. Bolja telesna masa prasadi hranjenih fitogenim aditivom u istraživanju Papatsiros i sar. (2009) može se objasniti time da je procenat inficiranih prasadi bakterijom *L. intracellularis* od početka

do kraja ogleđa u kontrolnoj grupi bio od 18,8% do 50%, a grupi koja je dobijala fitogeni aditiv od 18,8% do 12,5%, dok u našem eksperimentu *L. intracelularis* je detektovana kod svih prasadi tokom svih dana trajanja eksperimenta. Suplementacijom fitogenih aditiva Patente Herba® i Patente Herba® Plus na veći dnevni prirast prasadi prirodno inficiranih bakterijom *B. hyodysenteriae* utvrdili su i Delić i sar. (2019).

Postoji nekoliko studija koje su se bavile ispitivanjem proizvodnih rezultata kod prasadi veštački inficiranih *L. intracelularis*. U jednoj od njih se pratio uticaj različitih tipova ishrane gde je pokazano da ni jedna od pet različitih smeša (fino mlevena i peletirana standardna smeša na bazi pšenice, ječma i soje; standardna smeša u obliku fermentisane tečne hrane; standardna smeša sa dodatkom 1,8% mravlje kiseline; standardna smeša sa dodatkom 2,4% mlečne kiseline i grubo usitnjena standardna smeša) nije uticala na telesnu masu prasadi eksperimentalno inficiranih bakterijom *L. intracelularis*, koja je ujedno bila niža od mase prasadi u negativnoj kontrolnoj grupi (Boesen i sar., 2004). Leite i sar. (2018b) su pokazali da suplementacija preparata, koji je kompleks cinka i aminokiselina, nije uticala na prosečni dnevni prirast *L. intracelularis* veštački inficiranih prasadi. Takođe, razlike u dnevnom prirastu nisu uočene ni kod prasadi koja je nakon veštačke infekcije *L. intracelularis* putem hrane dobijala probiotske bakterije *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* i *B. pumilus* (Opriessnig i sar., 2019). S druge strane, Guedes i sar. (2009) i França i sar. (2010) su utvrdili pozitivni efekat antibiotika tilvalozina (tylvalosin) u hrani u dozi od 50 ppm i leukomicina (Leucomag 30% PR) u dozi od 180 ppm kod odlučene prasadi stare 35 dana veštački inficirane *L. intracelularis*. Naime, prasad koja je dobijala mediciranu hranu je imala značajno bolju konverziju. Poznato je da se tilozin primenjuje u kontroli PE, ali da, takođe, utiče i na proizvodne performanse svinja (Pommier i sar., 2008).

Upotreba antibiotika kao stimulatora rasta delimično je zabranjena u Evropskoj uniji 1999. godine, dok je potpuna zabrana sprovedena 2006. godine. Stoga su fitogeni aditivi dobili više pažnje kao moguća zamena za antibiotike, posebno u uzgoju preživara, živine, svinja, ali i u pčelarstvu (Jouany i Morgavi, 2007; Windisch i sar., 2008; Stanimirović i sar., 2017). Iako način delovanja fitogenih aditiva treba tek potpuno razjasniti, dokazana je njihova antimikrobna *in vitro* aktivnost protiv nekoliko patogena i gljivica (Adam i sar., 1998; Baratta i sar., 1998; Dorman i Deans, 2000; Jugl-Chizzola i sar., 2004; Burt, 2004), njihova antioksidativna aktivnost (Aeschbach i sar., 1994; Cuppett i Hall, 1998; Jimenez-Alvarez i sar., 2008), kao i efekat na proizvodne rezultate svinja (Kroismayr i sar., 2008; Frankič i sar., 2009).

6.6. Uticaj tretmana i biosigurnosnih nivoa na proizvodne rezultate prasadi

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su vrednosti biosigurnosnih nivoa na farmama imale značajan uticaj na sledeće proizvodne parametre: ukupni i dnevni prirast i ukupna i dnevna konzumacija hrane (Tabela 5.16.). U studiji Ribbens i sar. (2008) pokazano je da viši biosigurnosni nivoi, pored toga što mogu pomoći poboljšanju zdravlja svinja, mogu uticati i na proizvodne rezultate. Povezanost biosigurnosnih mera i proizvodnih rezultata potvrdili su i Laanen i sar. (2013), u čijoj studiji je zabeležen značajan efekat biosigurnosnih mera (internih i eksternih) na dnevni prirast svinja. Odnosno, pozitivna povezanost je utvrđena između biosigurnosnih mera koje se odnose na transport životinja, uklanjanje đubriva i uginulih životinja, kao i čišćenje i dezinfekciju i dnevnog prirasta svinja.

Prema rezultatima Rodrigues da Costa i sar. (2019), u istraživanju sprovedenom na 58 farmi u Irskoj, ustanovljeno je da na dnevni prirast značajan uticaj imaju biosigurnosne mere koje se odnose na veličinu farme (broj krmača), iskustvo upravnika farme i mere kontrole bolesti. Naime, utvrdili su da na farmama manjeg kapaciteta i sa manjim iskustvom upravnika dnevni prirast svinja je bio veći, kao i da što je veća kontrola bolesti utoliko je veći i dnevni prirast svinja. Međutim ove biosigurnosne mere nisu uticale na stepen konverzije hrane. U datom istraživanju, značajan uticaj biosigurnosnih mera na dnevni prirast svinja utvrđen je samo na farmama koje su imale visoke i srednje prosečne vrednosti internih (61,4% i 66,3%, pojedinačno) i eksternih (74,4% i 86,1%, pojedinačno) biosigurnosnih mera, dok na farmama sa niskim vrednostima internih (38,4%), a višim vrednostima eksternih (73,2%) biosigurnosnih mera ovakav efekat nije uočen. Rezultati našeg eksperimenta su u saglasnosti s ovom studijom, s obzirom da smo mi utvrdili značajan pozitivan efekat biosigurnosnih nivoa farmi na prirast i konzumaciju hrane, dok ove mere nisu imale uticaja na konverziju hrane. Dobijeni rezultati se mogu objasniti sa više aspekata. Pored toga što je smrtnost tovljenika veća na farmama većeg kapaciteta, dobro sprovođenje mera kontrole bolesti i vakcinacija su bliskoj vezi sa boljim proizvodnim performansama svinja, između ostalog i većim prirastom. S druge strane, stariji upravnici na farmama nisu motivisani, ne prate dovoljno novije trendove u ishrani i tehnologiji uzgoja svinja, odnosno imaju manju sposobnost i interesovanje da se bave proizvodnim izazovima, i manje vode računa o internim biosigurnosnim merama (Rodrigues da Costa i sar., 2019). Za razliku od naših rezultata gde smo ustanovili da biosigurnosne mere nisu imale uticaj na konverziju hrane, Laanen i sar. (2013) su pokazali da stepen konverzije hrane kod svinja je povezan sa ukupnim, tj. internim i eksternim biosigurnosnim merama. Pre svega su to bile dve potkategorije eksternih mera, kupovina životinja i

semena i suzbijanje štetočina i ptica i jedna interna potkategorija, period prašenja i dojenja. Razlog neusaglošenosti sa rezultatima naše studije može se naći u činjenici da je naš eksperiment obuhvatao samo četiri farme, sa manjim brojem životinja, gde su varijacije vrednosti konverzije hrane prasadi bile u opsegu od 4,04-18,54%, dok su Laanen i sar. (2013) u svom istraživanju obuhvatili 95 farmi u Belgiji sa najmanje 80 krmača i 400 tovljenika.

Uticaj eksternih biosigurnosnih mera na proizvodne rezultate prasadi. Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da je u okviru eksternih biosigurnosnih mera na sve četiri farme najnižu vrednost imala potkategorija koja se odnosila na hranu, vodu i opremu, što je u skladu sa rezultatima više prethodnih studija (Postma i sar., 2017; Filippitzi i sar., 2017; Chantziaras i sar., 2020). Na farmama svinja u Srbiji i svetu ova potkategorija je bila najlošije ocenjena (33% i 50%, pojedinačno). Putevi prenošenja patogena se najčešće dovode u vezu sa vozilima za isporuku hrane, vodom i ljudima koji ulaze na farmu. Sama hrana uglavnom ne predstavlja rizik po zdravlje životinja zbog strogih higijenskih uslova proizvodnje. Ranija praksa koja je podrazumevala hranjenje svinja pomijama dovedena je u vezu sa izbijanjem različitih zaraznih bolesti, između ostalog i klasične kuge svinja, tako da je ovaj način hranjenja zabranjen u Evropskoj uniji (Filippitzi i sar., 2017). U istraživanju koje su sprovedili Backhans i sar. (2015) na 60 farmi svinja u Švedskoj, ustanovljeno je da oko 50% farmi testira kvalitet vode samo jednom godišnje, dok na farmama koje imaju sopstvene bunare preporuka je da se češće obavlja kontrola kvaliteta vode. U istom istraživanju pokazano je da se na 95% farmi prilikom transporta hrane za životinje, koristi čisti put farme, što se može protumačiti kao opšti nedostatak. Bolji način obavljanja ovog transporta je da postoje silosi koji bi se punili van kruga farme i na taj način bi se smanjili rizici unosa patogena na farmu. U našem istraživanju uočeni su isti nedostaci gde su sve četiri farme imale slične poteškoće koje su se odnosile na eksterne biosigurnosne mere vezane za hranu, vodu i opremu.

S druge strane, u našem eksperimentu potkategorija koja se odnosila na kupovinu životinja i semena imala je najvišu vrednost u okviru eksternih biosigurnosnih mera na farmama BS 2, BS 3 i BS 4, što je u saglasnosti sa istraživanjima drugih autora (Backhans i sar., 2015; Postma i sar., 2017). Takođe, ova potkategorija se smatra najbolje primenjenom biosigurnosnom merom na farmama svinja u Srbiji (88%) i svetu (89%). Ove visoke vrednosti date potkategorije u našem eksperimentu mogu se objasniti time da se novonabavljene životinje i seme na sve četiri ispitivane farme kupuju od jednog dobavljača i da upravnik koji vrši nabavku je dobro upoznat sa zdravstvenim statusom farme sa koje potiču životinje i seme. Prema Filippitzi i sar. (2017) nabavka životinja ili genetskog materijala potencijalno

bi moglo dovesti do unošenja patogena na farmu protiv koga životinje nemaju razvijen imunološki odgovor. Prenos patogena u takvim uslovima se dešava vrlo brzo, direktnim kontaktom između zaraženih i prijemčivih životinja. Zbog toga je primena eksternih biosigurnosnih mera prilikom kupovine životinja od izuzetnog značaja.

Kako je na farmi BS 1 najviše pažnje posvećeno zaposlenima i posetiocima, gde je obavezno tuširanje i obezbeđeni su kombinezoni i čizme za posetioce i radnike, potkategorija eksternih biosigurnosnih mera koja se odnosila na zaposlene i posetioce je na ovoj farmi bila najbolje ocenjena (94%). U prethodnoj studiji Backhans i sar. (2015) sprovedenoj na 60 različitih farmi u Švedskoj ova potkategorija je imala srednje visoku ocenu (65%). U ovom istraživanju od svih ispitivanih farmi 90% je obezbedilo posetiocima čizme i odeću, a oko 85% je obavezalo posetioce da se prijave pre ulaska na farmu. Na farmama je korišćena dezobarijera uz obavezno pranje i dezinfekciju ruku, a za posetioce u više od polovine farmi primenjen je karantinski period duži od 12 sati nakon posete drugim farmama.

Uticaj internih biosigurnosnih mera na proizvodne rezultate prasadi. Naši rezultati ukazuju da je najniža vrednost internih biosigurnosnih mera na farmama BS 1 i BS 2 imala potkategorija koja se odnosila na čišćenje i dezinfekciju, što je u saglasnosti sa rezultatima koje su sproveli Backhans i sar. (2015), Raasch i sar. (2018) i Rodrigues da Costa i sar. (2019). Za razliku od ovih rezultata, podaci na farmama u Srbiji pokazuju da je ova potkategorija, sa vrednošću od 52%, najbolje ocenjena interna biosigurnosna mera. Backhans i sar. (2015) su niske vrednosti potkategorije vezane za čišćenje i dezinfekciju na farmama u Švedskoj objasnili time da je upotreba dezobarijera bila nedovoljna i neadekvatna (5%), a upravo ta mera je imala značajan udeo u formiranju ukupne ocene date potkategorije. Dodatno, mere kao što su čišćenje i dezinfekcija staja i bokseva primenjivale su se na 78% farmi, a period odmora objekata od 5,33 dana sproveden je na 92% farmi. Jedan od najvećih propusta zbog kojih su farme u ovoj doktorskoj disertaciji imale niske vrednosti potkategorije čišćenja i dezinfekcije uključivali su zaprljane dezobarijere sa nedovoljnom količinom i neproverenom koncentracijom dezinficijensa, koje su dodatno radnici zaobilazili. Značaj ove biosigurnosne mere naglasili su Collins i sar. (2000) i Fosse i sar. (2009), koji su pokazali da ispravan postupak čišćenja i dezinfekcije opreme i bokseva na farmi smanjuje rizik od prenosa patogena poput *Campylobacter* spp., *Listeria monocitogenes* i *L. intracellularis*.

Na farmama koje su imale više vrednosti ukupnih biosigurnosnih nivoa u ovoj doktorskoj disertaciji (farme BS 3 i BS 4) uočeno je da je najmanja pažnja bila posvećena internim biosigurnosnim merama u okviru potkategorije vezane za odgajivalište. U suprotnosti ovim rezultatima, Backhans i sar. (2015) su

utvrdili da je na 95% farmi koje je istraživanje obuhvatilo u odgajivalištu strogo poštovan princip mera „sve unutra - sve napolje” (all in/all out), a da je 77% zapata imalo tri ili manje prasadi po metru kvadratnom, što je bilo čak i bolje od minimalnih uslova za zaštitu svinja koje propisuje Evropska unija (Council Directive 2008/120/EC). Niže vrednosti ovih mera na farmama BS 3 i BS 4 posledica su upravo nepoštovanja u potpunosti principa mera „sve unutra - sve napolje“ (all in/all out).

Od internih biosigurnosnih mera na farmama BS 2, BS 3 i BS 4 najvišu vrednost imala je potkategorija vezana za kontrolu bolesti, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima Rodrigues da Costa i sar. (2019). Kontrola bolesti se odnosi na sve radnje povezane sa vakcinacijom osetljivih životinja, pravilnim ophođenjem i lečenjem obolelih životinja, uključujući odgovarajuću dijagnostiku, izolaciju i prijavu bolesti (Filippitzi i sar., 2017). Farme BS 2, BS 3 i BS 4 imale su plan vakcinacije i lečenja, i redovno su proveravale zdravstveni status svojih zapata. Pored toga, svaka od ovih farmi imala je zasebnu jedinicu (boks) za smeštaj bolesnih životinja, gde su sve svinje sa uočenim simptomima bile izolovane od ostalih svinja.

Na farmi BS 1 najviše ocene za interne biosigurnosne mere dobila je potkategorija koja se odnosila na prasilište i period dojenja. Pažnja je bila usmerena na dehelmintizaciju i pranje krmača pre prebacivanja u prasilište. Prema Filippitzi i sar. (2017) infektivni agensi se mogu preneti horizontalno sa krmače na prasad preko kože i mlečne žlezde, kao i vertikalno preko placentе i mleka. Pored ove mere nakon prašenja, bilo je minimalnog mešanja prasadi u leglu. Prema Zimmerman i sar., (2012) mešanje legla u prasilištu je nepoželjno, jer se infektivni agensi mogu preneti sa zaražene krmače na osetljivu prasad koja nemaju maternalna antitela.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

1. Na osnovu analize ankete BioCheck.UGent™ zaključeno je da su ukupne vrednosti biosigurnosnih mera na četiri ispitivane farme (BS 1 60%, BS 2 64%, BS 3 77% i BS 4 86%) bile veće od prosečnih vrednosti biosigurnosnih mera na farmama u Srbiji (58%) i svetu (64%), izuzev farme BS 1 čija je ocena ukupnih biosigurnosnih mera bila manja u poređenju sa prosečnim vrednostima u svetu.
2. Od eksternih biosigurnosnih mera na četiri ispitivane farme najviše ocene su imale potkategorije koje se odnose na kupovinu životinja i semena i zaposlene i posetioce, a najnižu ocenu je imala potkategorija koja se odnosi na hranu, vodu i opremu.
3. Od internih biosigurnosnih mera na četiri ispitivane farme najviše ocene su imale potkategorije koje se odnose na kontrolu bolesti i prasilište, a najnižu ocenu su imale potkategorije koje se odnose na čišćenje, dezinfekciju, odgajivalište, korišćenje opreme i mere sprovedene između odeljaka na farmi.
4. Primenom optimizovanog real-time (qPCR) protokola, zaključeno je da je dodavanje ispitivanog preparata u hrani smanjilo broj izlučenih bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi tretman grupe 14. i 28. dana u odnosu na kontrolnu grupu ($P < 0,05$) na farmama sa nižim nivoom biosigurnosnih mera, dok tretman ovim fitogenim aditivom nije uticao na broj bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi ($P > 0,05$) na farmama sa višim nivoima biosigurnosnih mera.
5. Primenom optimizovanog protokola za utvrđivanje efikasnosti suplementacije prasadi, zaključeno je da u funkciji vremena postoji pozitivan efekat ispitivanog fitogenog aditiva, odnosno, preparat je smanjio broj bakterija u fecesu prasadi nakon 14. i 28. dana u odnosu na 0. dan eksperimenta ($P < 0,0001$) na farmi sa najnižim biosigurnosnim nivoom BS 1, dok na ostalim farmama to nije uočeno ($P > 0,05$).
6. Utvrđena je negativna korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. intracellularis* u fecesu prasadi i nivoa biosigurnosnih mera ($P < 0,01$), odnosno, na farmama sa višim nivoima biosigurnosnih mera broj bakterija u fecesu prasadi bio je manji, dok nije utvrđena korelaciona zavisnost ($P > 0,05$) između broja bakterija u fecesu i tretmana, broja bakterija u fecesu i dužine tretmana, biosigurnosnih nivoa i tretmana, biosigurnosnih nivoa i dužine tretmana i, na kraju, tretmana i dužine tretmana.

7. Fitogeni aditiv u hrani prasadi dovodi do smanjenja dubine crevnih kripti ($P < 0,05$) i povećava odnos visina resica/dubina kripti ($P < 0,05$) u uzorcima ileuma tretman grupe, dok ovaj efekat nije utvrđen na visinu resica, širinu resica, površinu resica i broj peharastih ćelija/100 enterocita ($P > 0,05$).
8. Primenom optimizovanog protokola za IHC zaključeno je da ispitivani aditiv kod tretman grupe prasadi dovodi do smanjene ekspresije antigena *L. intracellularis* u ileumu u poređenju sa kontrolnom grupom.
9. Dodavanje fitogenog aditiva u hrani nije uticalo na telesnu masu, ukupni i dnevni prirast prasadi na ispitivanim farmama tokom eksperimenta ($P > 0,05$), izuzev na farmi BS 2 gde je uočen veći ukupni i dnevni prirast prasadi ($P < 0,05$).
10. Fitogeni aditiv u hrani prasadi nije doveo do razlika u ukupnoj i dnevnoj konzumaciji i konverziji hrane na svim ispitivanim farmama ($P > 0,05$), s tim da je samo kod tretman grupe prasadi na farmi BS 1 uočena bolja konverzija u odnosu na kontrolnu grupu prasadi ($P > 0,05$).
11. Primenom dvofaktorijalne analize zaključeno je da je ispitivani preparat imao značajan efekat na ukupni i dnevni prirast i konverziju hrane ($P < 0,01$), a da je biosigurnosni nivo farme imao značajan efekat na ukupni i dnevni prirast, ukupnu i dnevnu konzumaciju hrane ($P < 0,01$), dok interakcija ova dva faktora nije uticala na proizvodne rezultate prasadi ($P > 0,05$).

8. SPISAK LITERATURE:

1. Aarestrup, F. M., Kruse, H., Tast, E., Hammerum, A. M., & Jensen, L. B. (2000). Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microbial Drug Resistance*, 6(1), 63-70.
2. Adam, K., Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1739-1745.
3. Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32(1), 31-36.
4. Akoglu, H. (2018). User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 18(3), 91-93.
5. Alberdi, M. P., Watson, E., McAllister, G. E., Harris, J. D., Paxton, E. A., Thomson, J. R., & Smith, D. G. (2009). Expression by *Lawsonia intracellularis* of type III secretion system components during infection. *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 298-303.
6. Alexander, T. J. L., & Harris, D. L. (1992). Methods of disease control. In ed.: Leman, A. D., Straw, B. E., Mengeling, W. C., D'Allaire, S., & Taylor, D. J. *Diseases of Swine*. 1st ed. Ames, Iowa, Iowa State Univ. Press, 808–836.
7. Alexander, T. J., & Taylor, D. J. (1969). The clinical signs, diagnosis and control of swine dysentery. *Veterinary Record*, 85(3), 59-63.
8. Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050. The 2012 Revision. Global Perspective Studies Team. ESA Working Paper No. 12-03. Rome, Italy FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
9. Alexopoulos, C., Tassis, P. D., Kyriakis, C. S., Tzika, E. D., Papatsiros, V., & Kyriakis, S. C. (2006). First experience on the effect of in-feed lincomycin for the control of proliferative enteropathy in growing pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(3), 157-162.
10. Almond, P. K., & Bilkei, G. (2006). Effects of oral vaccination against *Lawsonia intracellularis* on growing-finishing pig's performance in a pig production unit with endemic porcine proliferative enteropathy (PPE). *DTW Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 113(6), 232-235.
11. Althouse, G. C., & Rossow, K. (2011). The potential risk of infectious disease dissemination via artificial insemination in swine. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 64-67.

12. Amad, A. A., Männer, K., Wendler, K. R., Neumann, K., & Zentek, J. (2011). Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poultry Science*, *90*(12), 2811-2816.
13. Amass, S. F. (2003). Key principles of biosecurity. In *London swine conference*, 17-21.
14. Amass, S. F. (2004a). Diagnosing disinfectant efficacy. *Journal of Swine Health and Production*, *12*(2), 82-83.
15. Amass, S. F. (2005a). Biosecurity: stopping the bugs from getting in. *Pig Journal*, *55*, 104-114.
16. Amass, S. F. (2005b). Biosecurity: reducing the spread. *Pig Journal*, *56*, 78-87.
17. Amass, S. F., & Baysinger, A. (2006). Swine disease transmission and prevention. *Diseases of Swine*, *9*, 1075-1098.
18. Amass, S. F., & Clark, L. K. (1999). Biosecurity considerations for pork production units. *Journal of Swine Health and Production*, *7*(5), 217-228.
19. Amass, S. F., Clark, L. K., Knox, K., Wu, C. C., & Hill, M. A. (1996). *Streptococcus suis* colonization of piglets during parturition. *Journal of Swine Health and Production*, *4*(6), 269-272.
20. Amass, S. F., Halbur, P. G., Byrne, B. A., Schneider, J. L., Koons, C. W., Cornick, N. A., & Ragland, D. (2003a). Mechanical transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* to weaned pigs by people, and biosecurity procedures that prevented such transmission. *Journal of Swine Health Production*, *11*(2), 61-68.
21. Amass, S. F., Mason, P. W., Pacheco, J. M., Miller, C. A., Ramirez, A., Clark, L. K., Ragland, D., Schneider, J. L., & Kenyon, S. J. (2004). Procedures for preventing transmission of foot-and-mouth disease virus (O/TAW/97) by people. *Veterinary Microbiology*, *103*(3-4), 143-149.
22. Amass, S. F., Pacheco, J. M., Mason, P. W., Schneider, J. L., Alvarez, R. M., Clark, L. K., & Ragland, D. (2003b). Procedures for preventing the transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs and sheep by personnel in contact with infected pigs. *Veterinary Record*, *153*(5), 137-140.
23. Amass, S. F., Schneider, J. L., Ragland, D., & Hill, M. A. (2003c). Pilot studies to evaluate the efficacy of a truck-mounted tire sanitizer system. *Journal of Swine Health and Production*, *11*(6), 277-283.
24. Amass, S. F., Vyverberg, B. D., Ragland, D., Dowell, C. A., Anderson, C. D., Stover, J. H., & Beaudry, D. J. (2000). Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. *Journal of Swine Health and Production*, *8*(4), 169-173.
25. Amass, S., (2004b). Review of biosecurity research on mechanical transmission of porcine pathogens by people. *Allen D. Leman Swine Conference*, 84-87

26. Andrés, S., Vico, J. P., Garrido, V., Grilló, M. J., Samper, S., Gavín, P., Herrera-León, S., & Mainar-Jaime, R. C. (2013). Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses and Public Health*, *60*(5), 355-365.
27. Andres, V. M., & Davies, R. H. (2015). Biosecurity measures to control *Salmonella* and other infectious agents in pig farms: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(4), 317-335.
28. Aptekmann, K. P., Artoni, S. B., Stefanini, M. A., & Orsi, M. A. (2001). Morphometric analysis of the intestine of domestic quails (*Coturnix coturnix japonica*) treated with different levels of dietary calcium. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *30*(5), 277-280.
29. Argenzio, R. A., Whipp, S. C., & Glock, R. D. (1980). Pathophysiology of swine dysentery: colonic transport and permeability studies. *Journal of Infectious Diseases*, *142*(5), 676-684.
30. Backhans, A., & Fellström, C. (2012). Rodents on pig and chicken farms—a potential threat to human and animal health. *Infection Ecology & Epidemiology*, *2*(1), 17093.
31. Backhans, A., Jacobson, M., Hansson, I., Lebbad, M., Lambertz, S. T., Gammelgård, E., Saager, M., Akande, O., & Fellström, C. (2013). Occurrence of pathogens in wild rodents caught on Swedish pig and chicken farms. *Epidemiology & Infection*, *141*(9), 1885-1891.
32. Backhans, A., Sjölund, M., Lindberg, A., & Emanuelson, U. (2015). Biosecurity level and health management practices in 60 Swedish farrow-to-finish herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *57*(1), 14.
33. Bak, H., & Rathkjen, P. H. (2009). Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *51*(1), 1.
34. Baratta, M. T., Dorman, H. D., Deans, S. G., Biondi, D. M., & Ruberto, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, *10*(6), 618-627.
35. Barba-Vidal, E., Martín-Orúe, S. M., & Castillejos, L. (2018). Are we using probiotics correctly in post-weaning piglets?. *Animal*, *12*(12), 2489-2498.
36. Barceló, B., & Marco, E. (1998). On farm biosecurity. *Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress*, 129-133.
37. Batista, L., & Pijoan, C. (2002). Production and economic advantages of high health production. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, 336.

38. Bellini, S., Rutili, D., & Guberti, V. (2016). Preventive measures aimed at minimizing the risk of African swine fever virus spread in pig farming systems. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1), 82.
39. Belœil, P. A., Fravallo, P., Fablet, C., Jolly, J. P., Eveno, E., Hascoet, Y., Chauvin, C., Salvat, G., & Madec, F. (2004). Risk factors for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* shedding by market-age pigs in French farrow-to-finish herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 63(1-2), 103-120.
40. Biester, H. E., & Schwarte, L. H. (1931). Intestinal adenoma in swine. *The American Journal of Pathology*, 7(2), 175-185.
41. Bilić-Šobot, D., Kubale, V., Škrlep, M., Čandek-Potokar, M., Prevolnik Povše, M., Fazarinc, G., & Škorjanc, D. (2016). Effect of hydrolysable tannins on intestinal morphology, proliferation and apoptosis in entire male pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 70(5), 378-388.
42. Boesen, H. T., Jensen, T. K., Jungersen, G., Riber, U., Boye, M., & Møller, K. (2005). Development, characterization and diagnostic application of a monoclonal antibody specific for a proteinase K resistant *Lawsonia intracellularis* antigen. *Veterinary Microbiology*, 105(3-4), 199-206.
43. Boesen, H. T., Jensen, T. K., Schmidt, A. S., Jensen, B. B., Jensen, S. M., & Møller, K. (2004). The influence of diet on *Lawsonia intracellularis* colonization in pigs upon experimental challenge. *Veterinary Microbiology*, 103(1-2), 35-45.
44. Boklund, A., Alban, L., Mortensen, S., & Houe, H. (2004). Biosecurity in 116 Danish fattening swineherds: descriptive results and factor analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 66(1-4), 49-62.
45. Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. A. (2013). The effect of urea and ammonia treatments on the survival of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in pig slurry. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 134-140.
46. Boqvist, S., Hansson, I., Bjerselius, U. N., Hamilton, C., Wahlström, H., Noll, B., Tysen, E., & Engvall, A. (2003). *Salmonella* isolated from animals and feed production in Sweden between 1993 and 1997. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(4), 181-197.
47. Borewicz, K. A., Kim, H. B., Singer, R. S., Gebhart, C. J., Sreevatsan, S., Johnson, T., & Isaacson, R. E. (2015). Changes in the porcine intestinal microbiome in response to infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PloS One*, 10(10), e0139106.
48. Boss, R., Cosandey, A., Luini, M., Artursson, K., Bardiau, M., Breitenwieser, F., Hehenberger, E., Lam, T., Mansfeld, M., Michel, A., & Mösslacher, G. (2016). Bovine *Staphylococcus aureus*: Subtyping, evolution, and zoonotic transfer. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 515-528.

49. Boutrup, T. S., Boesen, H. T., Boye, M., Agerholm, J. S., & Jensen, T. K. (2010). Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Comparative Pathology*, *143*(2-3), 101-109.
50. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223-253.
51. Caly, D. L., D'Inca, R., Auclair, E., & Drider, D. (2015). Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 1336.
52. Casades-Martí, L., González-Barrio, D., Royo-Hernández, L., Díez-Delgado, I., & Ruiz-Fons, F. (2020). Dynamics of Aujeszky's disease virus infection in wild boar in enzootic scenarios. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(1), 388-405.
53. Casal, J., De Manuel, A., Mateu, E., & Martin, M. (2007). Biosecurity measures on swine farms in Spain: perceptions by farmers and their relationship to current on-farm measures. *Preventive Veterinary Medicine*, *82*(1-2), 138-150.
54. Chantziaras, I., Dewulf, J., Boyen, F., Callens, B., & Butaye, P. (2014). Antimicrobial resistance prevalence of pathogenic and commensal *Escherichia coli* in food-producing animals in Belgium. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, *83*(5), 225-233.
55. Chantziaras, I., Dewulf, J., Van Limbergen, T., Stadejek, T., Niemi, J., Kyriazakis, I., & Maes, D. (2020). Biosecurity levels of pig fattening farms from four EU countries and links with the farm characteristics. *Livestock Science*, *237*, 104037.
56. Cheplin, H. A., & Rettger, L. F. (1920). Studies on the transformation of the intestinal flora, with special reference to the implantation of *Bacillus acidophilus*: II. Feeding experiments on man. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *6*(12), 704-705.
57. Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M. E., Schaevebeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective microbiota: from localized to long-reaching co-immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1678.
58. Clark, L. K., Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Scheidt, A. B., Sands-Freeman, L., & Knox, K. (1991). Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *Veterinary Medicine*, *86*, 543-550.
59. Collineau, L., Backhans, A., Dewulf, J., Emanuelson, U., grosse Beilage, E., Lehébel, A., Loesken, S., Nielsen, E.O., Postma, M., Sjölund, M., & Stärk, K. D. (2017). Profile of pig farms

combining high performance and low antimicrobial usage within four European countries. *Veterinary Record*, 181(24), 657.

60. Collins, A. M., & Barchia, I. M. (2014). The critical threshold of *Lawsonia intracellularis* in pig faeces that causes reduced average daily weight gains in experimentally challenged pigs. *Veterinary Microbiology*, 168(2-4), 455-458.

61. Collins, A. M., & Love, R. J. (2007). Re-challenge of pigs following recovery from proliferative enteropathy. *Veterinary Microbiology*, 120(3-4), 381-386.

62. Collins, A. M., Fell, S. A., & Barchia, I. M. (2013). Cleaning and disinfection with Virkon S significantly reduces *Lawsonia intracellularis* survival and transmission to naive pigs. *Journal of Swine Health and Production*, 21(3), 144-147.

63. Collins, A., Love, R. J., Pozo, J., Smith, S. H., & McOrist, S. (2000). Studies on the *ex vivo* survival of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production*, 8(5), 211-215.

64. Cong, Y., Weaver, C. T., Lazenby, A., & Elson, C. O. (2000). Colitis induced by enteric bacterial antigen-specific CD4⁺ T cells requires CD40-CD40 ligand interactions for a sustained increase in mucosal IL-12. *The Journal of Immunology*, 165(4), 2173-2182.

65. Cordes, H., Riber, U., Jensen, T. K., & Jungersen, G. (2012). Cell-mediated and humoral immune responses in pigs following primary and challenge-exposure to *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Research*, 43(1), 9.

66. Correge, I., Hemonc, A., & Gouvars, B. (2009). Farming conditions and practices linked to *Salmonella* prevalence in slaughter pigs. *Épidémiologie et Santé Animale*, (55), 17-26.

67. Correia-Gomes, C., Economou, T., Mendonça, D., Vieira-Pinto, M., & Niza-Ribeiro, J. (2012). Assessing risk profiles for *Salmonella* serotypes in breeding pig operations in Portugal using a Bayesian hierarchical model. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 226.

68. Costea, P. I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., De Vos, W.M., Ehrlich, S.D., Fraser, C.M., Hattori, M., & Huttenhower, C. (2018). Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nature Microbiology*, 3(1), 8-16.

69. Cuppett, S. L., & Hall, C. A. (1998). Antioxidant activity of the Labiatae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 42, 245-272.

70. Cutler, R., & Gardner, I. (1988). A blue print for pig health research. *Report From the Australian Pig Research Council*, Canberra, Australia, 39-40, 48-51.

71. Dale, C. J. H., Moses, E. K., Ong, C. C., Morrow, C. J., Reed, M. B., Hasse, D., & Strugnell, R. A. (1998). Identification and sequencing of the groE operon and flanking genes of *Lawsonia intracellularis*: use in phylogeny. *Microbiology*, *144*(8), 2073-2084.
72. Davenport, E. R., Sanders, J. G., Song, S. J., Amato, K. R., Clark, A. G., & Knight, R. (2017). The human microbiome in evolution. *BMC Biology*, *15*(1), 1-12.
73. Davies, P. R., Morrow, W. E., Jones, F. T., Deen, J., Fedorka-Cray, P. J., & Gray, J. T. (1997a). Risk of shedding *Salmonella* organisms by market-age hogs in a barn with open-flush gutters. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *210*(3), 386-389.
74. Davies, P. R., Morrow, W. M., Jones, F. T., Deen, J., Fedorka-Cray, P. J., & Harris, I. T. (1997b). Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiology & Infection*, *119*(2), 237-244.
75. Davies, R. H., & Cook, A. (2008). Why has the UK pig industry more *Salmonella* than other European pig industries and how can we lift our position. *Feed Compounder*, *28*, 33-35.
76. De Lucia, A., Rabie, A., Smith, R. P., Davies, R., Ostanello, F., Ajayi, D., Petrovska, L., & Martelli, F. (2018). Role of wild birds and environmental contamination in the epidemiology of *Salmonella* infection in an outdoor pig farm. *Veterinary Microbiology*, *227*, 148-154.
77. Dean-Nystrom, E. A., Gansheroff, L. J., Mills, M., Moon, H. W., & O'Brien, A. D. (2002). Vaccination of pregnant dams with intimin O157 protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157: H7 infection. *Infection and Immunity*, *70*(5), 2414-2418.
78. Delić, N., Drašković V., Stevanović J., Savić B., Lakić N., Bošnjak-Neumüller J., & Stanimirović Z. (2018). The efficacy of two phytogenic feed additives in the control of swine dysentery. *Acta Veterinaria-Beograd*, *68*(2), 178-189.
79. Dewulf, J., & Van Immerseel, F. (2019). Biosecurity in animal production and veterinary medicine. *CABI Acco Leuven*.
80. Directive, C. (2008). Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs. *Official journal of the European Union*, *316*, 36-38. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0120>
81. Dong, G. Z., & Pluske, J. R. (2007). The low feed intake in newly-weaned pigs: problems and possible solutions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *20*(3), 440-452.
82. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(2), 308-316.

83. Draskovic, V., Bosnjak-Neumuller, J., Vasiljevic, M., Petrujkic, B., Aleksic, N., Kukulj, V., & Stanimirovic, Z. (2018). Influence of phytogenic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 151, 46-51.
84. Drašković, V., Stanimirović, Z., Glišić, M., Bošnjak-Neumuller, J., Teodorović, R., Teodorović, V., & Kukulj, V. (2020). The effects of a phytogenic additive on the histomorphometric characteristics of the intestines in weaned pigs with a subclinical natural infection with *Lawsonia intracellularis*. *Acta Veterinaria-Beograd*, 70(1), 81-91.
85. Durmic, Z., Pethick, D. W., Pluske, J. R., & Hampson, D. J. (1998). Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection. *Journal of Applied Microbiology*, 85(3), 574-582.
86. EC, Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the council laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption, Off. J. Eur. Commun., L273 (2002) 1–95.
87. Eijck, I. A. J. M. (2003). Gezond starten, gezond blijven. *Animal Sciences Group-WUR Praktijkonderzoek Veehouderij*, 29.
88. Ellis-Iversen, J., Smith, R. P., Gibbens, J. C., Sharpe, C. E., Dominguez, M., & Cook, A. J. C. (2011). Risk factors for transmission of foot-and-mouth disease during an outbreak in southern England in 2007. *Veterinary Record*, 168(5), 128.
89. England, J. J. (2002). Biosecurity: safeguarding your veterinarian: client: patient relationship. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 18(3), 373-378.
90. Evans, S. J., & Sayers, A. R. (2000). A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(3), 209-223.
91. FAO (2008). Food and Agriculture Organization of United States, 2008. Biosecurity for Highly Pathogenic Avian Influenza. Issues and options, Rome 73.
92. FAO (2009). The State of Food and Agriculture. Livestock in the Balance. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
93. FAO (2011). World Livestock 2011 - Livestock in food security. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
94. FAO (2012). Swine health management Volume 3 Frequently asked questions on pig biosecurity and disease reporting Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok.

95. FAO, (2014). FAO's Animal Production and Health Division: Meat & Meat Products [Online]. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome (Available: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html> [Accessed 14/02 2015]).
96. FAO/OIE Food and Agricultural Organization of the United Nations /World Organization for Animal Health, (2010): Good Practices for Biosecurity in the Pig Sector: Issues and Options in Developing and Transition Countries. FAO Animal Production and Health paper 169. FAO, Rome, 2010. Also available online at www.fao.org/docrep/012/i1435e/i1435e00.pdf. Accessed on August 24, 2010.
97. Fèvre, E. M., Bronsvoort, B. M. D. C., Hamilton, K. A., & Cleaveland, S. (2006). Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 14(3), 125-131.
98. Filippitzi, M. E., Brinch Kruse, A., Postma, M., Sarrazin, S., Maes, D., Alban, L., Nielsen, L.R., & Dewulf, J. (2017). Review of transmission routes of 24 infectious diseases preventable by biosecurity measures and comparison of the implementation of these measures in pig herds in six European countries. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 381-398.
99. Fosse, J., Seegers, H., & Magras, C. (2009). Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review. *Zoonoses and Public Health*, 56(8), 429-454.
100. França, S. D. A., Machado, G. D. S., Andreoli, P. R., Santos, J. C. B., & Guedes, R. M. C. (2010). In-feed macrolide Leucomycin (Leucomag 30% PR) for prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected pigs. *Ciência Rural*, 40(6), 1378-1384.
101. Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 94(2), 95-102.
102. Fraser, D. (2002). Farm animal welfare in a world of changing expectations. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, USA, 161-168.
103. Fraser, R. W., Williams, N. T., Powell, L. F., & Cook, A. J. C. (2010). Reducing *Campylobacter* and *Salmonella* infection: two studies of the economic cost and attitude to adoption of on farm biosecurity measures. *Zoonoses and Public Health*, 57(7-8), 109-115.
104. Frese, S. A., Parker, K., Calvert, C. C., & Mills, D. A. (2015). Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning. *Microbiome*, 3(1), 1-10.
105. Friedman, M., Bednář, V., Klimeš, J., Smola, J., Mrlík, V., & Literák, I. (2008). *Lawsonia intracellularis* in rodents from pig farms with the occurrence of porcine proliferative enteropathy. *Letters in Applied Microbiology*, 47(2), 117-121.
106. Fuller, R. (1989). Probiotic in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 131-139.

107. Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*, 32(4), 439.
108. Funk, J., & Gebreyes, W. A. (2004). Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Production*, 12(5), 246-251.
109. Gagrčin, M., Simić, M., Došen, R., & Ivetić, V. (2002). Aktuelni zdravstveni problemi u industrijskoj proizvodnji svinja i mogućnosti njihovog rešavanja. *Veterinarski Glasnik*, 56(1-2), 3-11.
110. García-Feliz, C., Carvajal, A., Collazos, J. Á., & Rubio, P. (2009). Herd-level risk factors for faecal shedding of *Salmonella enterica* in Spanish fattening pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 91(2-4), 130-136.
111. Gebhart, C. J., & Guedes, R. M. (2010). *Lawsonia intracellularis*. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 10, 503-512.
112. Gebhart, C. J., Barns, S. M., Mcorist, S., Lin, G. F., & Lawson, G. H. (1993). Ileal symbiont *intracellularis*, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(3), 533-538.
113. Gelaude, P., Schlepers, M., Verlinden, M., Laanen, M., & Dewulf, J. (2014). Biocheck. UGent: a quantitative tool to measure biosecurity at broiler farms and the relationship with technical performances and antimicrobial use. *Poultry Science*, 93(11), 2740-2751.
114. Giacomini, E., Gasparrini, S., Lazzaro, M., Scali, F., Boniotti, M.B., Corradi, A., Pasquali, P. & Alborali, G.L., 2018. The role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 1-6.
115. Glossop, C. E. (2002). Pigs in society. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, USA, 55-65.
116. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., & Blanquet-Diot, S. (2017). Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in Microbiology*, 25(10), 851-873.
117. Guedes, R. M. C., França, S. A., Machado, G. S., Blumer, M. A., & da Costa Cruz, E. C. (2009). Use of tylvalosin-medicated feed to control porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Record*, 165(12), 342-345.
118. Guedes, R. M., & Gebhart, C. J. (2003). Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Microbiology*, 91(2-3), 135-145.

119. Guedes, R. M., Gebhart, C. J., Armbruster, G. A., & Roggow, B. D. (2002a). Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative hemorrhagic enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(4), 258–263.
120. Guedes, R. M., Gebhart, C. J., Winkelman, N. L., Mackie-Nuss, R. A., Marsteller, T. A., & Deen, J. (2002b). Comparison of different methods for diagnosis of porcine proliferative enteropathy. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2), 99-107.
121. Guedes, R. M., Machuca, M. A., Quiroga, M. A., Pereira, C. E. R., Resende, T. P., & Gebhart, C. J. (2017). *Lawsonia intracellularis* in pigs: progression of lesions and involvement of apoptosis. *Veterinary Pathology*, 54(4), 620-628.
122. Guedes, R., & Gebhart, C. J. (2010). Evidence of cell-mediated immune response and specific local mucosal immunoglobulin (Ig) A production against *Lawsonia intracellularis* in experimentally infected swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(2), 97-101.
123. Gunn, G. J., Heffernan, C., Hall, M., McLeod, A., & Hovi, M. (2008). Measuring and comparing constraints to improved biosecurity amongst GB farmers, veterinarians and the auxiliary industries. *Preventive Veterinary Medicine*, 84(3-4), 310-323.
124. Halaihel, N., Liévin, V., Alvarado, F., & Vasseur, M. (2000). Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na⁺-solute cotransport activities in young rabbits. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(3), 587-596.
125. Hald, T., & Andersen, J. S. (2001). Trends and seasonal variations in the occurrence of Salmonella in pigs, pork and humans in Denmark, 1995-2000, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 114, 346–349.
126. Hartung, J., & Schulz, J. (2007). Risks caused by bio-aerosols in poultry houses. *International Conference: Poultry in the 21st Century, Avian Influenza and Beyond*. Bangkok, 1–11.
127. Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2011). Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications*, 35(3), 169-180.
128. Hatfield, J. (2002). Minimizing the environmental impact of the pig industry. *Pig Veterinary Society International Congress Proceedings*. Ames, Iowa, 95-103.
129. Hayama, Y., Shimizu, Y., Murato, Y., Sawai, K., & Yamamoto, T. (2020). Estimation of infection risk on pig farms in infected wild boar areas—Epidemiological analysis for the reemergence of classical swine fever in Japan in 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 104873.
130. Hayes, D. (2002). Impact of international trade on the global swine industry. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, USA, 49-53.

131. Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P., & Mölbak, K. (2001). De onde bakterier i maden!(The bad bacteria in food!). *Miljø og Sundhet. Sundhedsministeriets Miljømedicinske Forskningscenter*, 17-19.
132. Hémonic, A., Corrége, I., & Lanneshoa, M. (2010). Quelles sont les pratiques de biosécurité et d'hygiène en élevages de porcs. *Techniporc*, 33, 7-13.
133. Hessing, M. J. C., & Tielen, M. J. M. (1994). The effect of climatic environment and relocating and mixing on health status and productivity of pigs. *Animal Science*, 59(1), 131-139.
134. Holland, R. E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(4), 345-375.
135. Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172-184.
136. Holyoake, P. K., Collins, A., Donahoo, M., Lising, R., & Emery, D. (2009). Identifying obstacles to reducing the use of antibiotics to control porcine proliferative enteropathy. *Australian Veterinary Journal*, 87(1-2), 33-34.
137. Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Wilson, J., Hutto, D. L., & Wannemuehler, M. J. (2005). CD4+ T-cell responses and distribution at the colonic mucosa during *Brachyspira hyodysenteriae*-induced colitis in pigs. *Immunology*, 115(1), 127-135.
138. Hotes, S., Kemper, N., Traulsen, I., Rave, G., & Krieter, J. (2010). Risk factors for *Salmonella* infection in fattening pigs—An evaluation of blood and meat juice samples. *Zoonoses and Public Health*, 57, 30-38.
139. Huan, Y. W., Bengtsson, R. J., MacIntyre, N., Guthrie, J., Finlayson, H., Smith, S. H., Archibald, A. L., & Ait-Ali, T. (2017). *Lawsonia intracellularis* exploits β -catenin/Wnt and Notch signalling pathways during infection of intestinal crypt to alter cell homeostasis and promote cell proliferation. *PloS One*, 12(3), e0173782.
140. Huijsdens, X. W., Van Dijke, B. J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M. G., Heck, M. E., Pluister, G. N., Voss, A., Wannet, W. J., & De Neeling, A. J. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5(1), 26.
141. Isaacson, R., & Kim, H. B. (2012). The intestinal microbiome of the pig. *Animal Health Research Reviews*, 13(1), 100-109.
142. Ito, S., Jurado, C., Bosch, J., Ito, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Isoda, N., & Sakoda, Y. (2019). Role of wild boar in the spread of classical swine fever in Japan. *Pathogens*, 8(4), 206.

143. Jacobson, M., Andersson, M., Lindberg, R., Fossum, C., & Jensen-Waern, M. (2011). Microarray and cytokine analyses of field cases of pigs with diarrhoea. *Veterinary Microbiology*, *153*(3-4), 307-314.
144. Jacobson, M., Gerth Löfstedt, M., Holmgren, N., Lundeheim, N., & Fellström, C. (2005). The prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish piglet producing herds and wild boar population. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *52*(9), 386-391.
145. Jasni, S., McOrist, S., & Lawson, G. H. K. (1994). Reproduction of proliferative enteritis in hamsters with a pure culture of porcine ileal symbiont intracellularis. *Veterinary Microbiology*, *41*(1-2), 1-9.
146. Jensen, P. (1986). Observations on the maternal behaviour of free-ranging domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, *16*(2), 131-142.
147. Jensen, T. K., Christensen, B. B., & Boye, M. (2006a). *Lawsonia intracellularis* infection in the large intestines of pigs. *Apmis*, *114*(4), 255-263.
148. Jensen, T. K., Vigre, H., Svensmark, B., & Bille-Hansen, V. (2006b). Distinction between porcine circovirus type 2 enteritis and porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Comparative Pathology*, *135*(4), 176-182.
149. Jestin, A., Popoff, M. R., & Mahe, S. (1985). Epizootiologic investigations of a diarrheic syndrome in fattening pigs. *American Journal of Veterinary Research*, *46*(10), 2149-2151.
150. Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Golay, P. A., Cotting, C., Lardeau, A., & Keely, B. J. (2008). Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(16), 7151-7159.
151. Johnston, W. T., Dewey, C. E., Friendship, R. M., Smart, N., McEwen, B. J., Stalker, M., & de Lange, C. F. (2001). An investigation of the etiology of a mild diarrhea observed in a group of grower/finisher pigs. *The Canadian Veterinary Journal*, *42*(1), 33-37.
152. Jouany, J. P., & Morgavi, D. P. (2007). Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, *1*(10), 1443-1466.
153. Jubb, K. V. F., & Kennedy, P. C. 1970. The intestines. *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, New York, 84-88.
154. Jugl-Chizzola, M., Spergser, J., Schilcher, F., Novak, J., Bucher, A., Gabler, C., Hagmüller, W., & Zitterl-Eglseer, K. (2005). Effects of *Thymus vulgaris* L. as feed additive in piglets and against haemolytic *E. coli* *in vitro*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, *118*(11-12), 495-501.

155. Kandasamy, S., Vlasova, A. N., Fischer, D. D., Chattha, K. S., Shao, L., Kumar, A., Langel, S. N., Rauf, A., Huang, H. C., Rajashekara, G., & Saif, L. J. (2017). Unraveling the differences between gram-positive and gram-negative probiotics in modulating protective immunity to enteric infections. *Frontiers in Immunology*, 8, 334.
156. Karuppanan, A. K., & Opriessnig, T. (2018). *Lawsonia intracellularis*: revisiting the disease ecology and control of this fastidious pathogen in pigs. *Frontiers in veterinary science*, 5, 181.
157. Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., & Tsunemitsu, H. (2006). Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(4), 350-354.
158. Kennedy, M. J., Rosnick, D. K., Ulrich, R. G., & Yancey Jr, R. J. (1988). Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *Microbiology*, 134(6), 1565-1576.
159. Kim, H. B., & Isaacson, R. E. (2015). The pig gut microbial diversity: understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary Microbiology*, 177(3-4), 242-251.
160. Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Sreevatsan, S., Tu, Z. J., & Isaacson, R. E. (2012). Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), 15485-15490.
161. Kim, J., Guevarra, R. B., Nguyen, S. G., Lee, J. H., Jeong, D. K., & Unno, T. (2016). Effects of the antibiotics growth promoter tylosin on swine gut microbiota. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 876-882.
162. Kim, J., Ha, Y., Jung, K., Choi, C., & Chae, C. (2004). Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68(3), 218-221.
163. Kim, Y., Yang, M., Goyal, S. M., Cheeran, M. C., & Torremorell, M. (2017). Evaluation of biosecurity measures to prevent indirect transmission of porcine epidemic diarrhea virus. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 89.
164. Kirwan, P. (2008). Biosecurity in the Pig Industry-An Overview. *Cattle practice*, 16, 147-154.
165. Kristensen, E., & Jakobsen, E. B. (2011). Danish dairy farmers' perception of biosecurity. *Preventive Veterinary Medicine*, 99(2-4), 122-129.
166. Kroismayr, A., Sehm, J., Pfaffl, M. W., Schedle, K., Plitzner, C., & Windisch, W. (2008). Effects of avilamycin and essential oils on mRNA expression of apoptotic and inflammatory markers and gut morphology of piglets. *Czech Journal of Animal Science*, 53(9), 377-387.

167. Kroll, J. J., Roof, M. B., & McOrist, S. (2004). Evaluation of protective immunity in pigs following oral administration of an avirulent live vaccine of *Lawsonia intracellularis*. *American Journal of Veterinary Research*, 65(5), 559-565.
168. Kroll, J. J., Roof, M. B., Hoffman, L. J., Dickson, J. S., & Harris, D. L. (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 173-197.
169. Kruse, A. B., de Knecht, L. V., Nielsen, L. R., & Alban, L. (2017). No clear effect of initiating vaccination against common endemic infections on the amounts of prescribed antimicrobials for Danish weaner and finishing pigs during 2007–2013. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 120.
170. Kruse, A. B., Nielsen, L. R., & Alban, L. (2018). Herd typologies based on multivariate analysis of biosecurity, productivity, antimicrobial and vaccine use data from Danish sow herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 104487.
171. Kumar, M., Kisson-Singh, V., Coria, A. L., Moreau, F., & Chadee, K. (2017). Probiotic mixture VSL# 3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin-deficient mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(1), 34-45.
172. Kyriakis, S. C., Bourtzi-Hatzopoulou, E., Alexopoulos, C., Kritas, S. K., Polyzopoulou, Z., Lekkas, S., & Gardey, L. (2002). Field evaluation of the effect of In-feed doxycycline for the control of ileitis in weaned piglets. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 49(7), 317-321.
173. Laanen, M., Beek, J., Ribbens, S., Vangroenweghe, F., Maes, D., & Dewulf, J. (2010). Biosecurity on pig herds: Development of an on-line scoring system and the results of the first 99 participating herds. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 79(4), 302-306.
174. Laanen, M., Maes, D., Hendriksen, C., Gelaude, P., De Vlieghe, S., Rosseel, Y., & Dewulf, J. (2014). Pig, cattle and poultry farmers with a known interest in research have comparable perspectives on disease prevention and on-farm biosecurity. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1-2), 1-9.
175. Laanen, M., Persoons, D., Ribbens, S., de Jong, E., Callens, B., Strubbe, M., Maes, D., & Dewulf, J. (2013). Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *The Veterinary Journal*, 198(2), 508-512.
176. Laanen, M., Ribbens, S., Maes, D., & Dewulf, J. (2011). The link between biosecurity and production and treatment characteristics in pig herds. *SafePorck*, Maastricht, Netherlands, 141-144.
177. Laine, T. M., Lyytikäinen, T., Yliaho, M., & Anttila, M. (2008). Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1), 21.

178. Larsen, I., Nielsen, S. S., Olsen, J. E., & Nielsen, J. P. (2016). The efficacy of oxytetracycline treatment at batch, pen and individual level on *Lawsonia intracellularis* infection in nursery pigs in a randomised clinical trial. *Preventive Veterinary Medicine*, *124*, 25-33.
179. Lawson, G. H. K., & Gebhart, C. J. (2000). Proliferative enteropathy. *Journal of Comparative pathology*, *122*(2-3), 77-100.
180. Lawson, G. H. K., Rowland, A. C., & MacIntyre, N. (1985). Demonstration of a new intracellular antigen in porcine intestinal adenomatosis and hamster proliferative ileitis. *Veterinary Microbiology*, *10*(4), 303-313.
181. Lawson, G. H., McOrist, S., Jasni, S., & Mackie, R. A. (1993). Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance *in vitro*. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(5), 1136-1142.
182. Le Bourgot, C., Le Normand, L., Formal, M., Respondek, F., Blat, S., Apper, E., Ferret-Bernard, S., & Le Huërou-Luron, I. (2017). Maternal short-chain fructo-oligosaccharide supplementation increases intestinal cytokine secretion, goblet cell number, butyrate concentration and *Lawsonia intracellularis* humoral vaccine response in weaned pigs. *British Journal of Nutrition*, *117*(1), 83-92.
183. Lebeer, S., Bron, P. A., Marco, M. L., Van Pijkeren, J. P., Motherway, M. O. C., Hill, C., Pot, B., Roos, S., & Klaenhammer, T. (2018). Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology*, *49*, 217-223.
184. Leite, F. L., Singer, R. S., Ward, T., Gebhart, C. J., & Isaacson, R. E. (2018a). Vaccination against *Lawsonia intracellularis* decreases shedding of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in co-infected pigs and alters the gut microbiome. *Scientific Reports*, *8*(1), 2857.
185. Leite, F. L., Vasquez, E., Vannucci, F. A., Gebhart, C. J., Rendahl, A., Torrison, J., Mueller, A., Winkelman, N. L., Rambo, Z. J., & Isaacson, R. E. (2018b). The effects of zinc amino acid complex supplementation on the porcine host response to *Lawsonia intracellularis* infection. *Veterinary Research*, *49*(1), 1-9.
186. Li, J. (2017). Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production—A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *30*(12), 1667.
187. Liebler-Tenorio, E. M., Pohlenz, J. F., Whipp, S. C. (1999). Diseases of the digestive system. *Diseases of Swine*, 8th ed., Ed. Straw, B. E., D'Allaire, S., Mengeling, W. L., Taylor, D. J. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 821-831.

188. Lindecrona, R. H., Jensen, T. K., Andersen, P. H., & Møller, K. (2002). Application of a 5' nuclease assay for detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal samples from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(3), 984-987.
189. Lister, S. A. (2008). Biosecurity in poultry management. *Poultry Diseases*. WB Saunders. 48-65.
190. Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Bravo, D., Maddox, C. W., & Pettigrew, J. E. (2014). Effects of capsicum oleoresin, garlic botanical, and turmeric oleoresin on gene expression profile of ileal mucosa in weaned pigs. *Journal of Animal Science*, *92*(8), 3426-3440.
191. Love, R. J., & Love, D. N. (1977). Control of proliferative haemorrhagic enteropathy in pigs. *Veterinary Record*, *100*(22), 473-473.
192. Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Zhang, J., Connor, J., Yeske, P., Loula, T., Levis, I., Dufresne, L., & Main, R. (2014). Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(5), 872-874.
193. Mach, N., Berri, M., Estellé, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Leplat, J. J., Chevaleyre, C., Billon, Y., Doré, J., & Rogel-Gaillard, C. (2015). Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environmental Microbiology Reports*, *7*(3), 554-569.
194. Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., de Kruif, A., & Van Soom, A. (2008a). Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology*, *70*(8), 1337-1345.
195. Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., & Haesebrouck, F. (2008b). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, *126*(4), 297-309.
196. Makinde, M. O., Umapathy, E., Akingbemi, B. T., Mandisodza, K. T., & Skadhauge, E. (1996). Effects of dietary soybean and cowpea on gut morphology and faecal composition in creep and noncreep-fed pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, *43*(1-10), 75-85.
197. Manzanilla, E. G., Nofrarias, M., Anguita, M., Castillo, M., Perez, J. F., Martin-Orue, S. M., Kamel, C., & Gasa, J. (2006). Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, *84*(10), 2743-2751.
198. Marković, R., Šefer, D., Krstić, M., & Petrujkić, B. (2009). Effect of different growth promoters on broiler performance and gut morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *41*(2), 163-169.
199. McCluskey, J., Hannigan, J., Harris, J. D., Wren, B., & Smith, D. G. (2002). LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection *in vitro* and *in vivo*. *Infection and Immunity*, *70*(6), 2899-2907.

200. McOrist, S. (2005). Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *The Veterinary Journal*, *1*(170), 8-9.
201. McOrist, S., & Gebhart, C. J. (2012). Proliferative enteropathy. *Diseases of Swine. 10th ed.* Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell Publishing, 811-819.
202. McOrist, S., & Smits, R. J. (2007). Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative. *The Veterinary Record*, *161*, 26-28.
203. McOrist, S., Gebhart, C. J., & Bosworth, B. T. (2006). Evaluation of porcine ileum models of enterocyte infection by *Lawsonia intracellularis*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *70*(2), 155-159.
204. McOrist, S., Gebhart, C. J., Boid, R., & Barns, S. M. (1995a). Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *45*(4), 820-825.
205. McOrist, S., Jasni, S., Mackie, R. A., MacIntyre, N., Neef, N., & Lawson, G. H. (1993). Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont intracellularis. *Infection and Immunity*, *61*(10), 4286-4292.
206. McOrist, S., Lawson, G. H. K., Rowland, A. C., & MacIntyre, N. (1989). Early lesions of proliferative enteritis in pigs and hamsters. *Veterinary Pathology*, *26*(3), 260-264.
207. McOrist, S., Mackie, R. A., & Lawson, G. H. (1995b). Antimicrobial susceptibility of ileal symbiont intracellularis isolated from pigs with proliferative enteropathy. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(5), 1314-1317.
208. McOrist, S., Morgan, J., Veenhuizen, M. F., Lawrence, K., & Kroger, H. W. (1997b). Oral administration of tylosin phosphate for treatment and prevention of proliferative enteropathy in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, *58*(2), 136-139.
209. McOrist, S., Roberts, L., Jasni, S., Rowland, A. C., Lawson, G. H. K., Gebhart, C. J., & Bosworth, B. (1996a). Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms. *Journal of Comparative Pathology*, *115*(1), 35-45.
210. McOrist, S., Smith, S. H., & Green, L. E. (1997a). Estimate of direct financial losses due to porcine proliferative enteropathy. *The Veterinary Record*, *140*(22), 579-581.
211. McOrist, S., Smith, S. H., Shearn, M. F. H., Carr, M. M., & Miller, D. J. S. (1996b). Treatment and prevention of porcine proliferative enteropathy with oral tiamulin. *Veterinary Record*, *139*(25), 615-618.

212. McOrist, S., Wager, A. M., Kratzer, D., & Sjösten, C. G. (2000). Therapeutic efficacy of water-soluble lincomycin-spectinomycin powder against porcine proliferative enteropathy in a European field study. *Veterinary Record*, *146*(3), 61-65.
213. McQuiston, J. H., Garber, L. P., Porter-Spalding, B. A., Hahn, J. W., Pierson, F. W., Wainwright, S. H., Senne, D. A., Brignole, T. J., Akey, B. L., & Holt, T. J. (2005). Evaluation of risk factors for the spread of low pathogenicity H7N2 avian influenza virus among commercial poultry farms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *226*(5), 767-772.
214. Merialdi, G., Bonilauri, P., Granelli, F., Luppi, A., & Dottori, M. (2003). Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. *The Veterinary Record*, *153*(17), 529-530.
215. Meroz, M., & Samberg, Y. (1995). Disinfecting poultry production premises. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, *14*(2), 273-292.
216. Milicevic, V., Radojicic, S., Valcic, M., Iovic, V., & Radosavljevic, V. (2016). Evidence of Aujeszky's disease in wild boar in Serbia. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1-11.
217. Mirajkar, N. S., Kelley, M. R., & Gebhart, C. J. (2017). Draft genome sequence of *Lawsonia intracellularis* strain E40504, isolated from a horse diagnosed with equine proliferative enteropathy. *Genome Announcements*, *5*(19), e00330-17.
218. Mirko, C. P., & Bilkei, G. (2006). Risk factors associated with *Brachyspira hyodysenteriae* PCR-positivity in East-European pig production units. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, *131*(11), 398-402.
219. Moeser, A. J., & Blikslager, A. T. (2007). Mechanisms of porcine diarrheal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *231*(1), 56-67.
220. Mølbak, L., Johnsen, K., Boye, M., Jensen, T. K., Johansen, M., Møller, K., & Leser, T. D. (2008). The microbiota of pigs influenced by diet texture and severity of *Lawsonia intracellularis* infection. *Veterinary Microbiology*, *128*(1-2), 96-107.
221. Moore, C. (1992). Biosecurity and minimal disease herds. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *8*(3), 461-474.
222. Morillo Alujas, A. (2005). Biosecurity in pig farming systems. *Albeitar*, *87*, 18-19.
223. Morin, M., Turgeon, D., Jolette, J., Robinson, Y., Phaneuf, J. B., Sauvageau, R., Beauregard, M., Teuscher, E., Higgins, R., & Lariviere, S. (1983). Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, *47*(1), 11-17.

224. Morris, R. S., Davies, P. R., & Lawton, D. E. (2002). Evolution of diseases in the world's pig industry. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, 1-10.
225. M'Sadeq, S. A., Wu, S., Swick, R. A., & Choct, M. (2015). Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Animal Nutrition*, 1(1), 1-11.
226. Mueller, K., Blum, N. M., Kluge, H., & Mueller, A. S. (2012). Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic-and antioxidant enzymes in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 108(4), 588-602.
227. Murphy, P., Dal Bello, F., O'Doherty, J. V., Arendt, E. K., Sweeney, T., & Coffey, A. (2012). Effects of cereal β -glucans and enzyme inclusion on the porcine gastrointestinal tract microbiota. *Anaerobe*, 18(6), 557-565.
228. Nabuurs, M. J. A., Van Zijderveld, F. G., & De Leeuw, P. W. (1993). Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhoea in pigs at weaning. *Research in Veterinary Science*, 55(1), 70-77.
229. Namkung, H., Li J. Gong, M., Yu, H., Cottrill, M., & De Lange, C. F. M. (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 84(4), 697-704.
230. National Research Council (NRC). (2012). Nutrient requirements of swine. *National Academies Press*, Washington, DC.
231. Neumann, E. J. (2012). Disease transmission and biosecurity. *Diseases of Swine. 10th ed. Chichester*, John Wiley & Sons Ltd, Oxford, UK, 141-164.
232. Newman, A. P., Reisdorf, E., Beinemann, J., Uyeki, T. M., Balish, A., Shu, B., Lindstrom, S., Achenbach, J., Smith, C., & Davis, J. P. (2008). Human case of swine influenza A (H1N1) triple reassortant virus infection, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1470-1472.
233. Nielsen, B. (2002). Pork safety—a world overview. *Proceedings of the 17th International Pig Veterinary Society Congress*, Ames, Iowa, USA, 121-135.
234. Nofrarias, M., Manzanilla, E. G., Pujols, J., Gibert, X., Majo, N., Segalés, J., & Gasa, J. (2006). Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84(10), 2735-2742.
235. Nogueira, M. G., Collins, A. M., Donahoo, M., & Emery, D. (2013). Immunological responses to vaccination following experimental *Lawsonia intracellularis* virulent challenge in pigs. *Veterinary Microbiology*, 164(1-2), 131-138.

236. Nogueira, M. G., Collins, A. M., Dunlop, R. H., & Emery, D. (2015). Effect of the route of administration on the mucosal and systemic immune responses to *Lawsonia intracellularis* vaccine in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 93(4), 124-126.
237. Nollet, N., Maes, D., De Zutter, L., Duchateau, L., Houf, K., Huysmans, K., Imberechts, H., Geers, R., de Kruif, A., & Van Hoof, J. (2004). Risk factors for the herd-level bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, 65(1-2), 63-75.
238. Oetting, L. L., Utiyama, C. E., Giani, P. A., Ruiz, U. D. S., & Miyada, V. S. (2006). Effects of herbal extracts and antimicrobials on apparent digestibility, performance, organs morphometry and intestinal histology of weanling pigs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4), 1389-1397.
239. Oh, Y. S., Lee, J. B., & McOrist, S. (2010). Microarray analysis of differential expression of cell cycle and cell differentiation genes in cells infected with *Lawsonia intracellularis*. *The Veterinary Journal*, 184(3), 340-345.
240. Opriessnig, T., Karuppanan, A. K., Beckler, D., Ait-Ali, T., Cubas-Atienzar, A., & Halbur, P. G. (2019). *Bacillus pumilus* probiotic feed supplementation mitigates *Lawsonia intracellularis* shedding and lesions. *Veterinary Research*, 50(1), 85.
241. Otake, S., Dee, S. A., Rossow, K. D., Moon, R. D., Trincado, C., & Pijoan, C. (2003). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *The Veterinary Record*, 152(3), 73.
242. Palaniappan, K., & Holley, R. A. (2010). Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 164-168.
243. Paluszak, Z., Skowron, K., Olszewska, H., Skowron, K. J., Bauza-Kaszewska, J., & Gryn, G. (2012). Sanitization efficacy of anaerobic digestion and aeration of slurry from the aspect of limiting emission of *Salmonella* into the environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3), 427-430.
244. Papatsiros, V. G., Tzika, E. D., Papaioannou, D. S., Kyriakis, S. C., Tassis, P. D., & Kyriakis, C. S. (2009). Effect of *Origanum vulgare* and *Allium sativum* extracts for the control of proliferative enteropathy in weaning pigs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 12(3), 407-414.
245. Patterson, J. A., & Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 82(4), 627-631.
246. Pearce, G. P. (1999). Epidemiology of enteric disease in grower. finisher pigs: a postal survey of pig producers in England. *Veterinary Record*, 144(13), 338-342.

247. Pedersen, K. S., Skrubel, R., Stege, H., Angen, Ø., Ståhl, M., Hjulsgager, C., Larsen, L. E., & Nielsen, J. P. (2012). Association between average daily gain, faecal dry matter content and concentration of *Lawsonia intracellularis* in faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 58.
248. Pejsak, Z., Podgórska, K., Truszczyński, M., Karbowski, P., & Stadejek, T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), 1-5.
249. Peng, Q. Y., Li, J. D., Li, Z., Duan, Z. Y., & Wu, Y. P. (2016). Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 214, 148-153.
250. Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., & Oswald, I. P. (2004). Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 641-647.
251. Pinto, C. J., & Urcelay, V. S. (2003). Biosecurity practices on intensive pig production systems in Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(3), 139-145.
252. Platel, K., & Srinivasan, K. (2004). Digestive stimulant action of spices: a myth or reality?. *Indian Journal of Medical Research*, 119(5), 167-179.
253. Pluske, J. R., Hampson, D. J., & Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51(1-3), 215-236.
254. Pommier, P., Keita, A., Pagot, E., Duran, O., & Cloet, P. R. (2008). Comparison of tylvalosin with tylosin for the control of subclinical ileitis in swine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 159(1), 579-582.
255. Poppe, C., Smart, N., Khakhria, R., Johnson, W., Spika, J., & Prescott, J. (1998). *Salmonella typhimurium* DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *The Canadian Veterinary Journal*, 39(9), 559-565.
256. Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Beilage, E. G., Stärk, K. D., & Dewulf, J. (2016). The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal*, 10(3), 478-489.
257. Postma, M., Stärk, K. D., Sjölund, M., Backhans, A., Beilage, E. G., Lösken, S., Belloc, C., Collineau, L., Iten, D., Visschers, V., Nielsen, E. O., & Dewulf J. (2015). Alternatives to the use of

- antimicrobial agents in pig production: a multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 457-466.
258. Postma, M., Vanderhaeghen, W., Sarrazin, S., Maes, D., & Dewulf, J. (2017). Reducing antimicrobial usage in pig production without jeopardizing production parameters. *Zoonoses and Public Health*, 64(1), 63-74.
259. Pourabedin, M., & Zhao, X. (2015). Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), fnv122.
260. Pritchard, G., Dennis, I., & Waddilove, J. (2005). Biosecurity: reducing disease risks to pig breeding herds. *In Practice*, 27(5), 230-237.
261. Pyburn, D. (2001). Biosecurity: How do you define it. *Iowa State University Swine Disease Conference for Swine Practitioners*, Ames, Iowa, USA, 34–38.
262. Qaisrani, S. N., Moquet, P. C. A., Van Krimpen, M. M., Kwakkel, R. P., Verstegen, M. W. A., & Hendriks, W. H. (2014). Protein source and dietary structure influence growth performance, gut morphology, and hindgut fermentation characteristics in broilers. *Poultry Science*, 93(12), 3053-3064.
263. Raasch, S., Postma, M., Dewulf, J., Stärk, K. D. C., & Grosse Beilage, E. (2018). Association between antimicrobial usage, biosecurity measures as well as farm performance in German farrow-to-finish farms. *Porcine Health Management*, 4(1), 30.
264. Radojković, D., Petrović, M., & Radović, Č. (2010). Metodologija za procenu priplodne vrednosti svinja na osnovu osobina plodnosti primenom selekcijskih indeksa. *Biotechnology in Animal Husbandry* 26 (spec.issue), 123-131.
265. Ramirez, A. (2012). Differential diagnosis of diseases. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine. 10th ed Chichester: Wiley-Blackwell*, 159–179.
266. Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, 21-34.
267. Regulation, O. J. E. U. (2003). No 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *The Official Journal of the European Union*, 268, 29-43.
268. Republički zavod za statistiku (RZS), Saopštenje broj 029 - god. LXX, dostupan 14.02.2020. Republika Srbija, ISSN-0353-9555. <https://www.stat.gov.rs/sr-Latn/oblasti/poljoprivreda-sumarstvo-i-ribarstvo/stocarstvo>

269. Republički zavod za statistiku (RZS), Statistički godišnjak, dostupan 18.10.2019. Republika Srbija, Beograd ISSN 0354-4206. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2019/Pdf/G20192052.pdf>
270. Ribbens, S., Dewulf, J., Koenen, F., Mintiens, K., De Sadeleer, L., de Kruif, A., & Maes, D. (2008). A survey on biosecurity and management practices in Belgian pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 83(3-4), 228-241.
271. Riber, U., Cordes, H., Boutrup, T. S., Jensen, T. K., Heegaard, P. M., & Jungersen, G. (2011). Primary infection protects pigs against re-infection with *Lawsonia intracellularis* in experimental challenge studies. *Veterinary Microbiology*, 149(3-4), 406-414.
272. Riber, U., Heegaard, P. M., Cordes, H., Ståhl, M., Jensen, T. K., & Jungersen, G. (2015). Vaccination of pigs with attenuated *Lawsonia intracellularis* induced acute phase protein responses and primed cell-mediated immunity without reduction in bacterial shedding after challenge. *Vaccine*, 33(1), 156-162.
273. Richter, B., Ladinig, A., Nedorost, N., & Herbert, W. (2010). A TaqMan quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of *Lawsonia intracellularis* in fecal and tissue samples from pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(1), 70-73.
274. Rodrigues da Costa, M., Gasa, J., Calderón Díaz, J. A., Postma, M., Dewulf, J., McCutcheon, G., & Manzanilla, E. G. (2019). Using the Biocheck. UGent™ scoring tool in Irish farrow-to-finish pig farms: assessing biosecurity and its relation to productive performance. *Porcine Health Management*, 5(1), 1-9.
275. Roerink, F., Morgan, C. L., Knetter, S. M., Passat, M. H., Archibald, A. L., Ait-Ali, T., & Strait, E. L. (2018). A novel inactivated vaccine against *Lawsonia intracellularis* induces rapid induction of humoral immunity, reduction of bacterial shedding and provides robust gut barrier function. *Vaccine*, 36(11), 1500-1508.
276. Rose, N., & Madec, F. (2002). Occurrence of respiratory disease outbreaks in fattening pigs: relation with the features of a densely and a sparsely populated pig area in France. *Veterinary Research*, 33(2), 179-190.
277. Rowland, A. C., Lawson, G. H. K., & Maxwell, A. (1973). Intestinal adenomatosis in the pig: occurrence of a bacterium in affected cells. *Nature*, 243(5407), 417-417.
278. Ruiz-Fons, F., Rodríguez, Ó., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., & de La Fuente, J. (2007). Prevalence of infection in wild and farmed ungulates. *Veterinary Microbiology*, 16(1-3), 282-295.

279. Sait, M., Aitchison, K., Wheelhouse, N., Wilson, K., Lainson, F. A., Longbottom, D., & Smith, D. G. (2013). Genome sequence of *Lawsonia intracellularis* strain N343, isolated from a sow with hemorrhagic proliferative enteropathy. *Genome Announcements*, *1*(1), 00027-13.
280. Sampieri, F., Vannucci, F. A., Allen, A. L., Pusterla, N., Antonopoulos, A. J., Ball, K. R., Thompson, J., Dowling, P. M., Hamilton, D. L., & Gebhart, C. J. (2013). Species-specificity of equine and porcine *Lawsonia intracellularis* isolates in laboratory animals. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *77*(4), 261-272.
281. Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S., & Guerry, P. (1993). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(7), 3093-3097.
282. Schmitz-Esser, S., Haferkamp, I., Knab, S., Penz, T., Ast, M., Kohl, C., Wagner, M., & Horn, M. (2008). *Lawsonia intracellularis* contains a gene encoding a functional rickettsia-like ATP/ADP translocase for host exploitation. *Journal of Bacteriology*, *190*(17), 5746-5752.
283. Shen, Y. B., Piao, X. S., Kim, S. W., Wang, L., Liu, P., Yoon, I., & Zhen, Y. G. (2009). Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science*, *87*(8), 2614-2624.
284. Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G. E., Vilar, M. J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., & Casal, J. (2013). Biosecurity practices in Spanish pig herds: Perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Preventive Veterinary Medicine*, *110*(2), 223-231.
285. Smirnov, A., Perez, R., Amit-Romach, E., Sklan, D., & Uni, Z. (2005). Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *The Journal of Nutrition*, *135*(2), 187-192.
286. Smith, S. H., McOrist, S., & Green, L. E. (1998). Questionnaire survey of proliferative enteropathy on British pig farms. *Veterinary Record*, *142*(25), 690-693.
287. Smith, S. H., Wilson, A. D., Van Ettinger, I., MacIntyre, N., Archibald, A. L., & Ait-Ali, T. (2014). Down-regulation of mechanisms involved in cell transport and maintenance of mucosal integrity in pigs infected with *Lawsonia intracellularis*. *Veterinary Research*, *45*(1), 55.
288. Söderlind, O., & Möllby, R. (1979). Enterotoxins, O-groups, and K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal piglets with and without diarrhea. *Infection and Immunity*, *24*(3), 611-616.
289. Springer, S., & Selbitz, H. J. (1999). The control of necrotic enteritis in sucking piglets by means of a *Clostridium perfringens* toxoid vaccine. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *24*(3), 333-336.

290. Stanimirović, Z., Glavinić, U., Lakić, N., Radović, D., Ristanić, M., Tarić, E., & Stevanović, J. (2017). Efficacy of plant-derived formulation “Argus Ras” in *Varroa destructor* control. *Acta Veterinaria-Beograd*, 67(2), 191-200.
291. Stege, H., Jensen, T. K., Møller, K., Baekbo, P., & Jorsal, S. E. (2000). Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 46(4), 279-292.
292. Stege, H., Jensen, T. K., Møller, K., Baekbo, P., & Jorsal, S. E. (2001). Risk factors for intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 50(1-2), 153-164.
293. Stege, H., Jensen, T. K., Møller, K., Vestergaard, K., Baekbo, P., & Jorsal, S. E. (2004). Infection dynamics of *Lawsonia intracellularis* in pig herds. *Veterinary Microbiology*, 104(3-4), 197-206.
294. Suh, D. K., & Song, J. C. (2005). Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. *Journal of Veterinary Science*, 6(4), 289-293.
295. Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304-318.
296. Svendsen, J., Larsen, J. L., & Bille, N. (1974). Outbreaks of post weaning *Escherichia coli* diarrhoea in pigs. *Nordisk Veterinaermedicin*, 26(5), 314-322.
297. Szczotka, A., Stadejek, T., Zmudzki, J., Nowak, A., Osinski, Z., & Pejsak, Z. (2011). Immunohistochemical detection of *Lawsonia intracellularis* in tissue sections from pigs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(4), 531-538.
298. Tan, S. S., & Shackleton, D. M. (1990). Effects of mixing unfamiliar individuals and of azaperone on the social behaviour of finishing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 26(1-2), 157-168.
299. Tanquilut, N. C., Espaldon, M. V. O., Eslava, D. F., Ancog, R. C., Medina, C. D. R., Paraso, M. G. V., & Domingo, R. D. (2020). Biosecurity assessment of layer farms in Central Luzon, Philippines. *Preventive Veterinary Medicine*, 175, 104865.
300. Thomson, J. R., Smith, W. J., Murray, B. P., Murray, D., Dic, J. E., & Sumption, K. J. (2001). Porcine enteric spirochete infections in the UK: surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. *Animal Health Research Reviews*, 2(1), 31-36.
301. Tran, T. H. T., Everaert, N., & Bindelle, J. (2018). Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), 17-32.

302. Twomey, D. F., Miller, A. J., Snow, L. C., Armstrong, J. D., Davies, R. H., Williamson, S. M., Featherstone, C. A., Reichel, R., & Cook, A. J. C. (2010). Association between biosecurity and *Salmonella* species prevalence on English pig farms. *Veterinary Record* 166, 722–724.
303. Umu, Ö. C., Rudi, K., & Diep, D. B. (2017). Modulation of the gut microbiota by prebiotic fibres and bacteriocins. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28(1), 1348886.
304. Underdahl, N. R. (1983). The effect of feeding *Streptococcus faecium* upon *Escherichia coli* induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Progress in Food & Nutrition Science*, 7(3-4), 5-12.
305. Van der Wolf, P. J., Elbers, A. R. W., Van Der Heijden, H. M. J. F., Van Schie, F. W., Hunneman, W. A., & Tielen, M. J. M. (2001). *Salmonella* seroprevalence at the population and herd level in pigs in The Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 80(2), 171-184.
306. Van Rensburg, L. J., Van Heerden, J., Penrith, M. L., Heath, L. E., Rametse, T., & Etter, E. (2020). Investigation of African swine fever outbreaks in pigs outside the controlled areas of South Africa, 2012-2017. *Journal of the South African Veterinary Association*, 91(1), 1-9.
307. Van Zuidewijn, D. D. R., Schillings, P. H. M., Wobbes, T. H., Hendriks, T., & de Boer, H. H. M. (1992). Morphometric analysis of the effects of antineoplastic drugs on mucosa of normal ileum and ileal anastomoses in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 56(2), 96-107.
308. Vangroenweghe, F., Ribbens, S., Vandersmissen, T., Beek, J., Dewulf, J., Maes, D. and Castryck, F. (2009). Hygiene protocol–Hygiene lock. Keeping Pigs Healthy. 1st ed. F. Vangroenweghe, ed. *DCL Print & Signs, Zelzate, Belgium*, 115-116.
309. Vannucci, F. A., & Gebhart, C. J. (2014). Recent advances in understanding the pathogenesis of *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Pathology*, 51(2), 465-477.
310. Vannucci, F. A., Foster, D. N., & Gebhart, C. J. (2013a). Laser microdissection coupled with RNA-seq analysis of porcine enterocytes infected with an obligate intracellular pathogen (*Lawsonia intracellularis*). *BMC Genomics*, 14(1), 421-436.
311. Vannucci, F. A., Gebhart, C. J., & McOrist, S. (2019). Proliferative enteropathy. *Diseases of Swine*, 898-911.
312. Vannucci, F. A., Kelley, M. R., & Gebhart, C. J. (2013b). Comparative genome sequencing identifies a prophage-associated genomic island linked to host adaptation of *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Research*, 44(1), 49.
313. Vannucci, F. A., Pusterla, N., Mapes, S. M., & Gebhart, C. (2012). Evidence of host adaptation in *Lawsonia intracellularis* infections. *Veterinary Research*, 43(1), 53.

314. Vidic, B., Savic, S., Prica, N., & Suvajdzic, L. (2015). Epizootiology and control measures for *Salmonella* in pigs. *Procedia Food Science*, 5, 312-315.
315. Visscher, C., Kruse, A., Sander, S., Keller, C., Mischok, J., Tabeling, R., Henne, H., Deitmer, R., & Kamphues, J. (2018). Experimental studies on effects of diet on *Lawsonia intracellularis* infections in fattening boars in a natural infection model. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60(1), 22.
316. Walter, D., Gebhart, C., Kroll, J., Holck, J. T., & Chittick, W. (2004). Serologic profiling and vaccination timing for *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production*, 12(6), 310-313.
317. Ward, L. A., Rosen, B. I., Yuan, L., & Saif, L. J. (1996). Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *Journal of General Virology*, 77(7), 1431-1441.
318. Watson, E., Alberdi, M. P., Inglis, N. F., Lainson, A., Porter, M. E., Manson, E., Imrie, L., Mclean, K., & Smith, D. G. (2014). Proteomic analysis of *Lawsonia intracellularis* reveals expression of outer membrane proteins during infection. *Veterinary Microbiology*, 174(3-4), 448-455.
319. Watson, E., Clark, E. M., Alberdi, M. P., Inglis, N. F., Porter, M., Imrie, L., Mclean, K., Manson, E., Lainson, A., & Smith, D. G. (2011). A novel *Lawsonia intracellularis* autotransporter protein is a prominent antigen. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1282-1287.
320. Wattanaphansak, S., Gebhart, C. J., Anderson, J. M., & Singer, R. S. (2010b). Development of a polymerase chain reaction assay for quantification of *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(4), 598-602.
321. Wattanaphansak, S., Singer, R. S., & Gebhart, C. J. (2009b). *In vitro* antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4), 305-310.
322. Wattanaphansak, S., Singer, R. S., & Gebhart, C. J. (2010a). Evaluation of *in vitro* bactericidal activity of commercial disinfectants against *Lawsonia intracellularis*. *Journal of Swine Health and Production*, 18(1), 11-17.
323. Wattanaphansak, S., Singer, R. S., Isaacson, R. E., Deen, J., Gramm, B. R., & Gebhart, C. J. (2009a). *In vitro* assessment of the effectiveness of powder disinfectant (Stalosan® F) against *Lawsonia intracellularis* using two different assays. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 403-407.
324. Whipp, S. C., Robinson, I. M., Harris, D. L., Glock, R. D., Matthews, P. J., & Alexander, T. J. (1979). Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity*, 26(3), 1042-1047.

325. Whitney, M. H., Shurson, G. C., & Guedes, R. C. (2006). Effect of dietary inclusion of distillers dried grains with solubles, soybean hulls, or a polyclonal antibody product on the ability of growing pigs to resist a *Lawsonia intracellularis* challenge. *Journal of Animal Science*, 84(7), 1880-1889.
326. Wills, R. W. (2000). Diarrhea in growing-finishing swine. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(1), 135-161.
327. Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., & Kroismayr, A. (2008). Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(suppl_14), 140-148.
328. Wong, D. L. F., Dahl, J., Stege, H., Van der Wolf, P. J., Leontides, L., Von Altrock, A., & Thorberg, B. M. (2004). Herd-level risk factors for subclinical *Salmonella* infection in European finishing-pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 62(4), 253-266.
329. Wood, E. N., & Lysons, R. J. (1988). Financial benefit from the eradication of swine dysentery. *The Veterinary Record*, 122(12), 277-279.
330. World Health Organization (WHO). (2003). *Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark: the WHO international review panel's evaluation of the termination of the use of antimicrobial growth promoters in Denmark: Foulum, Denmark 6-9 November 2002* (No. WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1).
331. Yin, J., Wu, M. M., Xiao, H., Ren, W. K., Duan, J. L., Yang, G., Li, T. J. & Yin, Y. L. (2014). Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *Journal of Animal Science*, 92(2), 612-619.
332. Zimmerman, J. J., Benfield, D. A., Dee, S. A., Murtaugh, M. P., Stadejek, T., Stevenson, G. W., & Torremorell, M. (2012). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus. In J. J. Zimmermann, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, & G. W. Stevenson (Eds.), *Diseases of Swine*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 1675–1777.
333. Zu Ermgassen, E. K., Phalan, B., Green, R. E., & Balmford, A. (2016). Reducing the land use of EU pork production: where there's swill, there's a way. *Food Policy*, 58, 35-48.

PRILOZI

Prilog A

Upitnik Biocheck.UGent™



BIOCHECK.UGENT®

FIG 2.1

Faculty of Veterinary Medicine
Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health
Epidemiology Unit

E Jeroen.Dewulf@UGent.be
T 09 264 75 43

Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke
Belgium

www.biocheck.ugent.be



A. PERSONAL INFORMATION

All personal information is strictly optional and is only necessary for further personal usage of the Biocheck.UGent® or for the backup of previous results. All the information will be stored in an anonymous way and will never be passed to third parties.

1. Name (of the owner)

.....

2. Address

.....

3. Zip code

.....

4. City

.....

5. Country

.....

6. Telephone number

.....



B. FARM CHARACTERISTICS

7. Are there, besides pigs, any other farm animals (for professional use) present at your farm?
- Yes, which?
 - No
8. Number of sows:
9. Number of weaned piglets:
10. Number of fattening pigs:
11. Number of boars:
12. How many years of experience in keeping pigs does the person in charge have?
..... years
13. How many people are working at the pig herd?
..... people
14. How old is the oldest building in which pigs are kept?
..... years
15. How old is the youngest building in which the pigs are kept?
..... years



C. PURCHASE OF BREEDING PIGS

1. Are breeding pigs (sows/gilts/boars) being purchased?

- Yes
- No (go to question 10)

2. Do the breeding pigs come from the same supplier or from different suppliers?

- Always the same supplier
- Different suppliers

3. Is attention paid to the health status of the farm from where the animals originate, so that the health status is equal to or higher than the own farm?

Herd with a known health status = herd that is free of a number of important diseases (e.g. Scabies, PRRS, ...) and therefore guarantees that the delivered products (animals/ sperm) are also free of these diseases.

- Yes
- No

4. Are hygienic criteria (e.g. cleaning and disinfection of the vehicle) posed on the transport vehicle that brings the animals to the farm?

- Yes
- No

5. Number of times per year that breeding pigs are delivered?

- 2 times or less a year
- Between 3 and 6 times a year
- Between 6 and 12 times a year
- More than 12 times a year

6. Is a separated quarantine room used when breeding pigs are delivered?

The quarantine room can be in the same building but should have a separate entrance for animals and personnel, separate walls, a separate manure pit and separate air ventilation.

- Yes
- No (go to question 10)

7. Is there a strict all-in/all-out management practiced in the quarantine room?

AI/O means that the room is filled up and emptied in one time. The most important is that new animals are never in the quarantine room where animals of the previous rounds are still present

- Yes
- No

8. Minimal length of the quarantine period (in days):

..... days

9. Is there a separated hygiene lock for the quarantine room?

A hygiene lock is a room to change into specific cloths/boots

- Yes
- No



D. PURCHASE OF PIGLETS

10. Are piglets being purchased?

- Yes
- No (go to question 15)

11. Are the piglets coming from the same supplier or from different suppliers?

- Always same supplier
- Different suppliers

12. Is attention paid to the health status of the farm, where the animals are originating from, to be equal or higher than the own farm?

Herd with a known health status = herd that is free of a number of important diseases (e.g. Scabies, PRRS, ...) and therefore guarantees that the delivered products (animals/semen) are also free of these diseases.

- Yes, always higher or equal
- No, no attention paid to this
- Not know

13. Are hygienic criteria (e.g. cleaning and disinfection) posed on the transport vehicle that brings the animals to the farm?

- Yes
- No
- Not known

14. Number of times per year piglets are delivered:

- Twice or less per year
- Between 3 to 6 times per year
- Between 6 to 12 times per year
- More than 12 times per year

E. ARTIFICIAL INSEMINATION

15. Is semen purchased?

- Yes
- No (go to question 17)

16. Does the semen originate from a farm/ boar station with a known higher or equal health status than your farm?

Herd with a known health status = herd that is free of a number of important diseases (e.g. Scabies, PRRS, ...) and therefore guarantees that the delivered products (animals/semen) are also free of these diseases.

- Yes
- No
- Unknown

F. TRANSPORT OF ANIMALS

17. Are **fattening pigs** transported from the farm to the slaughterhouse?
- Yes
 - No (*go to question 20*)
18. Is the transport vehicle taking the **fattening pigs** to the slaughterhouse always empty on arrival at the farm?
- Yes, always empty
 - Sometimes empty (*go to question 20*)
 - No, never empty (*go to question 20*)
 - Unknown (*go to question 20*)
19. Is the transport vehicle for **fattening pigs** always cleaned and disinfected on arrival at the farm?
- Yes, always cleaned and disinfected
 - Sometimes cleaned and disinfected (*go to question 20*)
 - No, never cleaned and disinfected (*go to question 20*)
 - Unknown (*go to question 20*)
20. Are **sows** transported from the farm to other farms or to the slaughterhouse?
- Yes
 - No (*go to question 23*)
21. Is the transport vehicle for **sows** always empty on arrival at the farm?
- Yes, always empty
 - Sometimes empty (*go to question 23*)
 - No, never empty (*go to question 23*)
 - Not known (*go to question 23*)
22. Is the transport vehicle for **sows** always cleaned and disinfected on arrival at the farm?
- Yes, always cleaned and disinfected
 - Sometimes cleaned and disinfected (*go to question 23*)
 - No, never cleaned and disinfected (*go to question 23*)
 - Not known (*go to question 23*)
23. Are **piglets** transported from the farm to other farms?
- Yes
 - No (*go to question 26*)
24. Is the transport vehicle for **piglets** always empty on arrival at the farm?
- Yes, always empty
 - Sometimes empty (*go to question 26*)
 - No, never empty (*go to question 26*)
 - Not known (*go to question 26*)

25. Is the transport vehicle for **piglets** always cleaned and disinfected on arrival at the farm?
- Yes, always cleaned and disinfected
 - Sometimes cleaned and disinfected (*go to question 20*)
 - No, never cleaned and disinfected (*go to question 20*)
 - Not known (*go to question 20*)
26. Does the driver have entrance to the stables when loading the animals (fattening pigs, sows, and piglets)?
- Yes
 - No (*go to question 28*)
27. Does the driver receive and wear farm-specific clothing and shoes?
- Always
 - Sometimes
 - Never
28. Are the animals loaded from a separate loading area or directly from the stable / central corridor?
- Separate loading area (*go to question 30*)
 - Central corridor or stable
29. Is it possible for animals to return to the stables (walking back or being placed back) after being in the transport vehicle?
- Yes
 - No

G. FEED AND WATER SUPPLY

30. Can the feeding company fill up the silos without entering the clean/ herd specific road?

Clean road/area is the area around and part of the production site with restricted access, i.e. the area where only animals from the farm, persons after hygienic measure in hygiene lock and farm specific materials and vehicles are allowed. Dirty area comprises all other parts of the farm where visitors, external vehicles... have access to. The dirty area also includes the cadaver storage facility.

- Yes
- No

31. Does the transporter of the feed have entrance to the stables?

- Yes
- No (go to question 25)

32. Is a feeding company used where the feed meet special hygienic requirements (i.e. salmonella free, heat treatment)?

- Yes
- No
- Not known

33. Is the quality of the drinking water checked every year at the source or at the storage tank by means of a bacteriological analysis?

- Yes
- No

34. Is the quality of the drinking water checked every year at the main outlets (where the animals drink) by means of a bacteriological analysis?

- Yes
- No

H. REMOVAL OF MANURE AND DEAD ANIMALS

35. Is manure being removed through the dirty road?
- Yes
 - No
36. Are farm-specific hoses for removal of manure from the manure pit available (hoses for the removal of manure that stay at the farm all the time)?
- Yes
 - No
37. Is there a carcass storage, physically separated from the animal facilities?
- Yes
 - No (*go to question 43*)
38. Is the carcass storage located in the dirty area of the farm?
- Yes
 - No
39. Can carcasses be collected by the rendering company from the public road, without entrance to the premises?
- Yes
 - No
40. Is the carcass storage closed so vermin, dogs or cats don't have access to the carcasses?
- Yes
 - No
41. Is the carcass storage regularly (= after every pick-up) cleaned and disinfected?
- Yes
 - No
42. Is the carcass storage cooled?
- Yes
 - No
43. Are disposable gloves being worn when manipulating carcasses or are hands being washed and disinfected after manipulating carcasses?
- Always
 - Sometimes
 - Never

I. ENTRANCE OF VISITORS AND PERSONNEL

44. Are visitors obliged to check in before having entrance to the stables?

- Yes
- No

45. Is there a pig-contact free period of >12h expected for all visitors before they are allowed to enter the stables?

- Yes
- No

46. Is there a hygiene lock available and is it always used when visitors have access to the stables?

Hygiene lock is a room to change from own cloths/boots into farm specific cloths/boots and provides the opportunity to wash hands

- Yes
- No (go to question 49)

47. Are all stables only accessible for visitors from the hygiene lock?

- Yes
- No

48. Is there a strict separation between the clean and the dirty area of the hygiene lock?

The dirty area is where the employees and visitors enter the room, and store their personal clothes and shoes and wash/disinfect their hands; and the clean area is where farm specific overalls and boots can be put on.

- Yes
- No

49. Do visitors have to wear farm-specific clothing (disposable overalls/cleaned overalls)?

- Yes
- No

50. Do visitors have to wear farm-specific shoes (boots/overshoes)?

- Yes
- No

51. Do hands have to be washed and disinfected before entering the stables?

- Yes
- No

52. Do the farmer and the staff always carry out these hygienic measures themselves?

- Yes
- No

J. MATERIAL SUPPLY

53. Is there a specific pass-through for materials to enter the buildings of the farm (e.g. UV-cabinet for foreign materials)?

- Yes
- No

54. Are specific measures taking for material supply (i.e. cleaning and disinfection, quarantine period at special location)?

- Yes
- No



K. RODENT AND BIRD CONTROL

55. Are vermin (rats, mice, etc.) considered to be a problem at the farm?

- Yes
- No

56. Is the outside of the farm buildings (around the walls) paved and clean (removal of weeds, waste, ...) so that vermin can't hide?

- Yes
- No

57. Is there a rodent control program?

- Yes (farmer, staff or professional company)
- No

58. Do companion animals have access to the stables, including feed and bedding material storage?

- Yes
- No

59. Can birds enter the stables?

- Yes
- No

60. Are grids placed before the air intakes?

- Yes
- No



L. LOCATION OF THE FARM

61. Is the farm located in an area with a high density of pigs or a low density of pigs?

(A high density of pigs= average pig density at municipality level > 300 pigs/km²)

- Low density
- High density

62. Are other pig farms located within a radius of 500 meters of your farm?

- Yes
- No

63. Is manure from other farms spread on neighboring farmlands situated directly next to your stables (< 500 meters)?

- Yes
- No

64. Are transport vehicles carrying animals from other farms often (minimum once a day) passing on a road less than 100 meters from your farm (e.g. due to location of a slaughterhouse in the neighborhood, ...)?

- Yes
- No

65. Have wild boars been spotted in the neighborhood (within a range of 10 km) of your farm?

- Yes
- No (go to question 67)

66. Is the farm enclosed (using fences, wire, ...)?

- Yes
- No

M. DISEASE MANAGEMENT

67. Do you make use of and do you always follow a prelisted vaccination scheme and a protocol for strategic treatments (additives, antibiotics)?
- Yes
 - No
68. Is there a regular (= at least once a year) evaluation made of the disease status of the farm (serology, trends in slaughterhouse findings, ...)?
- Yes
 - No
69. Are stay-behinds (due to unclear cause) and/or diseased animals isolated from the healthy ones (in physically separated hospital pens or by euthanasia)?
- Always
 - Sometimes
 - Never
70. Are diseased animals consistently handled/visited after the healthy animals?
- Yes
 - No



N. FARROWING AND SUCKLING PERIOD

71. Are there sows present at the herd?

- Yes
- No (go to question 79)

72. Are sows washed before being moved to the farrowing unit?

- Always
- Sometimes
- Never

73. Are suckling piglets transferred between sows (cross-fostering)?

- Yes
- No (go to question 76)

74. Does cross-fostering of suckling piglets between different sows occur once or more than once (per piglet)?

- Once
- More than once

75. Does cross-fostering sometimes occur after 4 days post-farrowing?

- Yes
- No

76. How many times are the piglets manipulated between birth and weaning (vaccination, castration, clipping of the teeth, ...)?

..... times

77. Are materials/tools for treatment (e.g. castration blade, tail-docker, ear-tagger, iron injection needles) regularly cleaned and disinfected between litters?

- Yes
- No

78. Do you work with two blades and a small box containing a disinfectant when castrating the piglets?

- Yes/No castration/I use a different blade per pen
- No

O. NURSERY UNIT

79. Is there a nursery unit present at the herd?

Nursery unit = the unit where all weaned piglets are housed together

- Yes
- No (go to question 85)

80. Is a strict all-in/all-out management practiced in each compartment (= a room consisting of pens with animals from the same age) of the nursery unit?

All-in/all-out means that the compartments are filled up and emptied in one single time. The most important point is that new animals are never placed in a compartment where animals from previous rounds are still present.

- Yes
- No

81. Are older piglets sometimes mixed with piglets of a younger age?

- Yes
- No

82. What is the **maximal** pig density of a pen in the nursery?

- 3 or less piglets per m²
- 4 piglets per m²
- 5 piglets per m²
- 6 or more piglets per m²

83. Is the nursery physically separated (= no direct contact or access from sows via door to nursery, preferably separate stable) from the sow unit?

- Yes
- No

84. Is a separated hygiene lock available for the nursery unit?

- Yes
- No

P. FATTENING UNIT

85. Are there fattening pigs present at the herd?

- Yes
- No (go to question 91)

86. Is a strict all-in / all-out management practiced in **all compartments** of the fattening unit?

All-in/all-out (AIAO) means that the compartments are filled up and emptied in one time. The most important is that new animals are never put in a compartment where animals of the previous rounds are still present.

- Yes
- No

87. Is a strict all-in / all-out management practiced in **each pen per compartment** of the fattening unit?

- Yes
- No

88. Are the different age groups strictly separated in different (= physically separated) compartments?

- Yes
- No

89. Are older fattening pigs sometimes mixed with pigs of a younger age?

- Yes
- No

90. What is the maximal pig density in a pen in the fattening unit?

- 1 or more m² per animal
- Between 0,7 and 0,9 m² per animal
- Between 0,6 and 0,7 m² per animal
- Less than 0,6 m² per animal

Q. MEASURES BETWEEN COMPARTMENTS

91. Are clothing and footwear changed between compartments?
- Always
 - Sometimes
 - Never
92. Are hands washed and/or disinfected between different compartments/units?
- Always
 - Sometimes
 - Never
93. Are disinfection baths and/or boot washers used between different compartments/units or are boots changed between compartments?
- Yes
 - No



R. WORKING LINES

94. Is all work performed from younger pigs to older ones?

- Yes
- No

95. Is the equipment that is needed for a specific animal category placed according to working lines and therefore the equipment is not used in other age categories?

- Yes
- No



S. USE OF EQUIPMENT

96. Is a protocol present for cleaning and disinfection of equipment (e.g. brooms, spades) after use and is this protocol adhered to?
- Yes
 - No
97. Is used equipment clearly marked or recognizable for the unit or age group (e.g. by colors)?
- Yes
 - No
98. Are boards that are used for driving pigs easy to clean and are they regularly (i.e. after every use or at least after every production round during the sanitary period) cleaned (and disinfected)?
- Yes
 - No
99. Is equipment (that comes into direct contact with animals) present on the farm that is used on other farms?
- Yes
 - No
100. Are dedicated injection **syringes** available and used for each age group?
- Yes
 - No
101. Are dedicated injection **needles** available and used for each age group?
- Yes
 - No
102. After how many animals is the needle changed (if this is different for the different age categories/type of units, please fill in worst case)?
..... animals

T. CLEANING AND DISINFECTION

103. Are the different stages in the cleaning and disinfection process respected and is there sufficient time (according to the used product specifications) provided for each stage?
- Always
 - Sometimes
 - Never
104. Is the efficacy of cleaning and disinfection checked by for example taking a hygienogram?
- Quantification of the bacterial status of the environment.*
- Always
 - Sometimes
 - Never
105. Are stables cleaned and disinfected **after each production round**?
- This question concerns all stables: farrowing crates, nursery unit and fattening unit.*
- Yes
 - No
106. Is there sufficient time after cleaning and disinfection for drying or adjusting the temperature before animals enter the stable?
- Yes
 - No
107. Are corridors and the loading area cleaned and disinfected after pigs are moved?
- Yes
 - Sometimes
 - No
108. Are disinfection baths/ boot washers present at the entrance of the farm and are they used?
- Yes
 - No (go to the end)
109. Is the fluid of footbaths immediately changed when visually contaminated?
- Yes
 - No

BIOGRAFIJA

Vladimir Drašković, rođen je 20.02.1988. godine u Smederevu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2007/2008 godine, a diplomirao 2014. godine sa prosečnom oceno 9,20. Tokom studija više puta je bio nagrađivan od strane Fakulteta veterinarske medicine za jednog od najboljih studenata, u periodu od 2008. do 2009. bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Školske 2011/2012 godine bio je stipendista Zadužbine "Dragoljuba Marinkovića". Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 2014/2015 godine. Položio je sve ispite predviđene planom i programom poslediplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,88.

Od maja 2014. godine angazovan je bio kao istraživač pripravnik, a od marta 2018. godine kao istraživač saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” (ev. br. 46002) kojim je rukovodio prof. dr Zoran Stanimirović u periodu 2011-2019 godine.

U oktobru 2018. godine izabran je u zvanje asistenta na Katedri za zoohigijenu Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

U okviru CEEPUS programa, 2019. godine (od 01.02.2019. do 28.02.2019.) boravio je na stručnom usavršavanju na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Ljubljani.

Učestvovao je na nekoliko domaćih i međunarodnih naučnih i tri inovaciona projekta od kojih je na dva bio rukovodilac. Kao autor ili koautor objavio je preko 20 naučnih i stručnih radova, od kojih je osam u međunarodnim časopisima sa SCI liste, i to: jedan rad M21a, tri rada M21 i četiri rada M23 kategorije.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Владимир Љ. Драшковић

број уписа 14/8

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај фитогеног адитива у контроли пролиферативне ентеропатије уз процену производних резултата одлучене прасади природно инфициране бактеријом *Lawsonia intracellularis*“

- 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, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Владимир Љ. Драшковић

Број уписа 14/8

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Утицај фитогеног адитива у контроли пролиферативне ентеропатије уз процену производних резултата одлучене прасади природно инфициране бактеријом *Lawsonia intracellularis*“

Ментор 1: Др Зоран Станимировић, редовни професор

Ментор 2: Др Владимир Кукољ, ванредни професор

Потписани Владимир Љ. Драшковић

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај фитогеног адитива у контроли пролиферативне ентеропатије уз процену производних резултата одлучене прасади природно инфициране бактеријом *Lawsonia intracellularis*“

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).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.