

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Nemanja V. Jezdimirović

**PATOMORFOLOŠKA, MIKOLOŠKA I
MOLEKULARNA ISPITIVANJA ORGANA ĆURIĆA
RAZLIČITOG IMUNOLOŠKOG STATUSA NAKON
VEŠTAČKE INFEKCIJE SPORAMA *ASPERGILLUS
FUMIGATUS***

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Nemanja V. Jezdimirović

**PATHOLOGICAL, MYCOLOGICAL AND
MOLECULAR RESEARCH INTO THE ORGANS OF
TURKEY POULTS OF VARIOUS
IMMUNOLOGICAL STATUS FOLLOWING
ARTIFICIAL INFECTION WITH *ASPERGILLUS
FUMIGATUS* SPORES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor:

dr Milijan Jovanović, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Članovi komisije:

dr Milijan Jovanović, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

dr Dejan Krnjaić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

dr Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Datum odbrane:

Zahvalnost

Veliku zahvalnost za pomoć pri izradi ove disertacije dugujem:

- svom mentoru profesoru **dr Milijanu Jovanoviću**, na poverenju, znanju i iskustvu koje mi je preneo, strpljenju da me sasluša, na svim savetima i trudu da ova doktorska disertacija ugleda svetlo dana.
- profesoru **dr Dejanu Krnjaiću**, na ukazanom poverenju i nesebičnoj podršci pri izradi ove disertacije.
- **dr Branislavu Kureljušiću**, bih se zahvalio na bezuslovnoj pomoći, na strpljenju, nesebičnim savetima i sugestijama u izradi ove doktorske disertacije.
- kolektivu Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije, direktorki **dr Dobrili Jakić Dimić**, **dr Oliveru Radanoviću**, svim zaposlenima, tehničkom saradniku Milošu Raduloviću, na ukazanom poverenju i interesovanju sa kojim su pratili moj rad.
- Mojoj porodici, supruzi Jeleni, mom sinu Božidaru, mojoj ćerki Sofiji, na svim osmesima, pažnji, poljupcima i bezuslovnoj ljubavi koju su mi pružili i koji mi nisu dali da odustanem.
- Mojim roditeljima, mojoj majci, ocu, sestri Ani, što su verovali u mene, što su uvek bili uz mene, što su mi pružali ljubav i podršku svih ovih godina. Majci, ocu i mojoj sestri Ani koji su me učinili dobrim čovekom, dobrim sinom i dobrim bratom.

Na kraju bih želelo da izrazim posebno veliku zahvanost mom dragom učitelju, **dr Vojinu Ivetiću** na nesebičnoj velikoj pomoći i ličnom i profesionalnom zalaganju u izradi doktorske disertacije, na svim prijateljskim savetima, razumevanju, stručnim sugestijama, na ogromnoj podršci, na očinskim savetima i na kraju što mi nije dao da se predam nego da nastavim...

Mojim *anđelima*, zbog kojih postojim, *Boži i Sofiji*...

**Patomorfološka, mikološka i molekularna ispitivanja organa ćurića
različitog imunološkog statusa nakon veštačke infekcije sporama
*Aspergillus fumigatus***

REZIME

Aspergiloza ćuraka je jedno od najvažnijih respiratornih oboljenja, naročito kod najmlađe kategorije, koje može da prouzrokuje značajne ekonomske gubitke zbog mortaliteta i niskih proizvodnih performansi. U prirodnim uslovima infekcija nastaje aerogeno, tj. udisanjem velikog broja germinativnih oblika spora *Aspergillus fumigatus* u kratkom vremenskom periodu ili dugotrajnim izlaganjem respiratornog sistema niskoj koncentraciji u kontaminiranom vazduhu. Predisponirajući faktori za nastanak aspergiloze kod ćuraka, pored virusnih i bakterijskih infekcija jesu: slab imuni status nastao zbog duže primene antibakterijskih lekova, kontinuirano izlaganje stresogenim faktorima (učestala vakcinacija, loš kvalitet hrane), izlaganje lošim ambijentalnim i sanitarnim uslovima uzgoja.

Iako postoji mnogo radova o aspergilozi ćurića, malo se zna o patogenezi bolesti i patomorfološkim promenama u različitim tkivima kod imunosuprimiranih ptica. Imajući to u vidu zadatak ovog rada bio je da u eksperimentalnim uslovima ispita zdravstveno stanje, nastanak patomorfoloških promena i diseminaciju *Aspergillus fumigatus* u različitim organima kod imunosuprimiranih i imunokompetentnih ćurića.

Ogled je izveden na ukupno 90 ćurića oba pola, provenijencije „Converter“, podeljenih u četiri grupe: ogledna grupa 1 (O-1) i ogledna grupa 2 (O-2) sa po 30 jedinki i kontrolne grupe 1 (K-1) i 2 (K-2) sa po 15 jedinki u svakoj. Ispitivanja su obavljena 1, 3, 7, 14. i 21. dana nakon intratrahealne inokulacije $5,056 \times 10^7$ spora *A. fumigatus* 14 dana starim ćurićima grupe O-1, kao i grupe O-2, koja je prethodno tretirana deksametazonom u dozi od 4mg/kg telesne mase intramuskularno u trajanju od šest uzastopnih dana.

Za ocenu T ćelijskog imunskog statusa ćurića korišćen je fitohemaglutinin koji je intradermalno aplikovan u dozi od 100 µg/jedinki kod 40 ćurića (po 10 iz svake grupe) starosti od 28 dana.

Urađena su klinička, patomorfološka, mikološka, hematološka i molekularna ispitivanja.

Klinički simptomi infekcije uočeni su već nakon prvog dana od inficiranja kod dve trećine deksametazonom tretiranih (grupa O-2) i netretiranih ćurića (grupa O-1). Klinički simptomi oboljenja bili su više izraženi kod ćurića tretiranih deksametazonom u odnosu na netretirane.

Patomorfološki, u prvim danima posle infekcije uočeni su hiperemija i edem pluća uz početnu fokalnu ili difuznu ćelijsku infiltraciju. Od 3. do 21. dana posle infekcije dominira granulomatozna pneumonija različitog obima i intenziteta, što je uslovljeno, pored ostalog, i vremenom proteklom od infekcije. U početku granulomi su solitarni, a kasnije postaju multipli i konfluentni sa regresivnim promenama naročito od 14. i 21. dana posle infekcije. Histopatološke lezije kod ćurića prethodno tretiranih deksametazonom bile su intenzivnije i opsežnije.

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih pregledom pluća i vazdušnih kesa dobijenih od po 6 inficiranih ćurića za svaki dan žrtvovanja, ustanovljeno je da je *A. fumigatus* izolovan iz respiratornih organa već prvog i trećeg dana od infekcije kod 4 od 12 inficiranih jedinki (33,33%). Sedmog dana uzročnik je izolovan kod 50% inficiranih jedinki, četrnaestog kod 83,33% ćurića i dvadesetprvog dana od infekcije kod 6 od 6 žrtvovanih ćurića (100%).

Ustanovljeno je da se od sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od infekcije povećava broj izolata *A. fumigatus* iz organa ćurića inficiranih i tretiranih deksametazonom u odnosu na broj netretiranih i inficiranih ćurića. U grupi ćurića prethodno tretiranoj deksametazonom izolacija iz organa 1. i 3. dana posle infekcije je bila ista kao u grupi O-1, dok se 7, 14. i 21. dana posle infekcije broj izolata *A. fumigatus* povećao u poređenju sa netretiranom grupom O-1.

Dvadesetčetiri sata od aplikacije fitohemaglutinina prosečna vrednost debljine kože (DK) kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2) bila je statistički veoma značajno manja ($p < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod inficiranih ćurića (O-1).

Rezultati hematoloških ispitivanja pokazali su da je infekcija ćurića gljivicom *A. fumigatus* prouzrokovala slabu anemiju, leukocitozu, limfocitozu i heterofiliju, posle druge i treće nedelje.

PCR metodom *A. fumigatus* iz zbirnih uzoraka pluća i vazdušnih kes, srca, jetre i mozga ćurića posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja ustanovljen je veći broj pozitivnih uzoraka na prisustvo DNK *A. fumigatus* kod ćurića ogledne grupe 2.

Ključne reči: ćurići, *Aspergillus fumigatus*, veštačka infekcija, patomorfološke promene, histopatologija, nested PCR.

Naučna oblast: Klinička patologija i terapija životinja

Uža naučna oblast: Patološka morfologija

UDK broj: 591.2 : 616-091.8 : 636.592

Pathological, mycological and molecular research into the organs of turkey poults of various immunological status following artificial infection with *Aspergillus fumigatus* spores

SUMMARY

Aspergillosis is one of the most important respiratory diseases of turkeys, especially in the youngest age category. It may lead to significant economic losses due to mortality and poor production performance. In natural conditions the infection is aerogenous, that is, it occurs following the inhalation of large numbers of *Aspergillus fumigatus* germinating spores in a short period of time, or by long-lasting exposure of the respiratory system to their low concentrations in air. Apart from virus and bacterial infections, the predisposing factors for the emergence of aspergillosis in turkeys are: low immune status due to long-lasting use of antibacterial drugs, continual exposure to stressogenic factors (frequent vaccination, poor feed quality), and exposure to poor ambient and sanitary conditions of rearing.

In spite of plenty works about turkey aspergillosis, little is known about the pathogenesis of the disease and the pathomorphological changes in various tissues in immunosuppressed birds. Having considered these, this work was aimed at the research into the health status, development of pathological changes and dissemination of *Aspergillus fumigatus* in various organs of immunosuppressed and immunocompetent turkey poults in experimental conditions.

The experiment was performed on 90 turkey poults of both sexes, of the Converter hybrid, divided into four groups: treated groups 1 (O-1) and 2 (O-2) with 30 specimens in each, and the two control groups – group 1 (K-1) and group 2 (K-2) - each consisting of 15 birds. The analyses were done on days 1, 3, 7, 14 and 21 after intratracheal inoculation of 5.056×10^7 *A. fumigatus* spores to 14-day-old poults of group O-1 and those of O-2, which were intramuscularly administered dexamethasone in the dose of 4 mg/kg body weight, on six consecutive days.

To assess the T cell immune status of turkey poult phytohaemagglutinin was used, which was administered intradermally in the dose of 100 µg/specimen, to 40 poult (to 10 in each group) at the age of 28 days.

Clinical and pathological observations, and mycological, haematological and molecular tests were performed.

Clinical symptoms of the infection were noticed as soon as after day one following the infection in two thirds of dexamethasone-treated (group O-2) and untreated poult (group O-1). Clinical symptoms of the disease were more pronounced in poult treated with dexamethasone in comparison to those untreated.

As for pathomorphology, in the first days post infection (p.i.) hyperaemia and pulmonary oedema were noticed along with initial focal or diffuse cell infiltration. From day 3 to 21 p.i. granulomatous pneumonia dominated, whose extent and intensity depended, besides some other factors, on the time which passed from the infection. In the beginning, the granulomas are solitary, but later become multiple and confluent with regressive tissue changes, especially from day 14 and 21 p.i. Histopathological lesions in turkey poult treated with dexamethasone were more intensive and extensive.

Mycological analyses, which were done on lung and air sack samples obtained from 6 infected poult per each day of sacrifice, revealed that *A. fumigatus* was isolated from the respiratory organs as soon as on days 1 and 3 post infection in 4 out of 12 infected specimens (33.33%). On day 7, the causative agent was isolated from 50% of infected birds, on day 14 in 83.33% and on day 21 post infection in 6 out of 6 sacrificed turkey poult (100%).

It was detected that from days 7, 14 and 21 post infection the isolates of *A. fumigatus* from the organs of turkey poult infected and treated with dexamethasone increased in comparison with infected but untreated poult. In turkey poult pretreated with dexamethasone isolation from organs on days 1 and 3 p.i. was the same as in group O-1, whilst on days 7, 14 and 21 p.i. the number of *A. fumigatus* isolates increased in comparison to the untreated group O-1.

Twenty-four hours after the administration of phytohaemagglutinin the average skin thickness (DK) in infected and dexamethasone-treated turkey poult (group O-2) was significantly lower ($p < 0.001$) in comparison with the average DK in infected poult (O-1).

The results of haematological research showed that the infection of turkey poults with *A. fumigatus* produced mild anaemia, leucocytosis, lymphocytosis and heterophilia, two and three weeks after infection.

PCR assay performed for *A. fumigatus* DNA detected higher numbers of positive samples in pools composed of pooled samples of lungs and air sacks, hearts, livers, and brains of poults in group O-2 1, 3, 7, 14 and 21 days after the artificial infection.

Keywords: turkey poults, *Aspergillus fumigatus*, artificial infection, pathological changes, histopathology, nested PCR.

Field of science: Clinical pathology and therapy of animals

Specific field of science: Pathological morphology

UDK number: 591.2 : 616-091.8 : 636.592

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Respiratorne gljivične infekcije ptica.....	4
2.2. Otkriće infekcije <i>Aspergillus fumigatus</i> kod ptica.....	5
2.2.1. Učestalost pojavljivanja aspergiloze kod živine u našoj i drugim zemljama sveta.....	6
2.3. Etiologija.....	7
2.3.1. Klasifikacija (sistematika i nomenklatura)	7
2.3.2. Morfološke osobine <i>Aspergillus fumigatus</i>	11
2.3.3. Kulturelne osobine <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
2.3.4. Biohemijske osobine <i>Aspergillus fumigatus</i>	13
2.3.5. Imunološke osobine <i>Aspergillus fumigatus</i>	18
2.4. Animalni modeli aspergiloze	19
2.4.1. Ptičiji modeli aspergiloze.....	20
2.4.2. Zamorac kao model za aspergilozu	21
2.4.3. Kunić kao model za aspergilozu	22
2.4.4. Glodari kao modeli za aspergilozu	22
2.5. Patogeneza aspergiloze.....	24
2.6. Klinička slika aspergiloze.....	25
2.7. Patomorfološke promene	27
2.8. Serološka dijagnostika.....	29
2.9. Eksperimentalna infekcija ptica sa <i>A. fumigatus</i>	30
2.10. Eksperimentalna primena deksametazona kod ptica.....	32
2.10.1. Mehanizam inflamatorne i imunske reakcije organizma	34
2.10.2. Mehanizam delovanja glikokortikoida	36
2.11. Ispitivanje kožne bazofilne preosetljivosti (<i>Cutaneous Basophil Hypersensitivity</i> – CBH) izazvane fitohemaglutininom (PHA) kod živine	38
2.12. Vakcinacija	41
2.13. Uticaj infekcije sa <i>Aspergillus</i> spp. na hematološke parametre i imunski status živine	43
2.14. Primena molekularnih metoda dijagnostike <i>Aspergillus fumigatus</i> kod ptica...	45
3. CILJ I ZADACI.....	48

4. MATERIJAL I METODE	49
4.1. Formiranje oglada	49
4.1.1. Gljivični soj – Referentni soj <i>Aspergillus fumigatus</i>	50
4.1.2. Priprema suspenzije spora <i>Aspergillus fumigatus</i> za veštačku infekciju	50
4.1.3. Veštačka infekcija	51
4.1.4. Praćenje telesne mase i klinička opservacija	52
4.1.5. Uzorkovanje	52
4.2. Metode ispitivanja	52
4.2.1. Serološko ispitivanje	52
4.2.2. Imunološko ispitivanje sa fitohemaglutininom (PHA)	53
4.2.3. Hematološko ispitivanje	54
4.2.4. Mikološko ispitivanje	54
4.2.5. Molekularno ispitivanje	54
4.2.6. Histopatološko ispitivanje	57
4.2.7. Statistička analiza rezultata	57
5. REZULTATI	58
5.1. Praćenje telesne mase i zdravstvenog stanja ćurića tokom trajanja oglada	58
5.1.1. Telesna masa ćurića oglednih i kontrolnih grupa	58
5.1.2. Klinička slika kod ćurića veštački inficiranih sa <i>A. fumigatus</i> i tretiranih deksametazonom tokom trajanja oglada	61
5.2. Rezultati patomorfološkog ispitivanja	63
5.2.1. Patoanatomske promene kod ćurića inficiranih <i>A. fumigatus</i> , kao i tretiranih deksametazonom posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od infekcije	63
5.2.2. Mikroskopski nalaz	71
5.3. Rezultati mikoloških ispitivanja	79
5.3.1. Rezultati mikoloških ispitivanja delova unutrašnjih organa ćurića veštački inficiranih <i>A. fumigatus</i> posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije	79
5.3.2. Rezultati mikoloških ispitivanja uzoraka delova unutrašnjih organa ćurića višekratno tretiranih deksametazonom dobijeni posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije sa <i>A. fumigatus</i>	85
5.4. Rezultati molekularnih ispitivanja	91
5.5. Rezultati ispitivanja kožne bazofilne preosetljivosti (CBH) izazvane fitohemaglutininom kod ćurića kontrolnih i oglednih grupa	94
5.6. Rezultati imunskog odgovora na vakcinu protiv atipične kuge živine	101
5.7. Rezultati hematoloških ispitivanja	101
6. DISKUSIJA	110
7. ZAKLJUČCI	132

8. LITERATURA	134
Biografija autora	148
Izjava o autorstvu.....	149
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	150
Izjava o korišćenju	151

1. UVOD

Respiratorne bolesti zauzimaju značajno mesto u patologiji živine, a njihov značaj usko je povezan sa intenziviranjem živinarske proizvodnje. U etiologiji respiratornih bolesti učestvuju više bioloških agensa (virusi, bakterije i gljivice). Pojava kliničko – manifestnih oblika bolesti najčešće je posledica sinergističkog delovanja više respiratornih patogenih faktora sredine, pa njihov značaj stoji u pozitivnoj korelaciji sa brojnim negativnim faktorima koji prate intenzivnu živinarsku proizvodnju.

Aspergiloza ćuraka je jedno od najvažnijih respiratornih oboljenja, naročito kod najmlađih kategorija, koje može da prouzrokuje značajne ekonomske gubitke zbog mortaliteta i niskih proizvodnih performansi. Aspergiloza je mikotično nekontagiozno, primarno oboljenje respiratornog sistema sa akutnim ili hroničnim tokom, sporadičnim ili endemskim karakterom. U prirodnim uslovima infekcija nastaje aerogeno, tj. udisanjem velikog broja germinativnih oblika spora *Aspergillus fumigatus* u kratkom vremenskom periodu ili dugotrajnim izlaganjem respiratornog sistema niskoj koncentraciji u kontaminiranom vazduhu. Veći stepen učestalosti *Aspergillus fumigatus* u etiologiji aspergiloze ćurica, u odnosu na druge vrste aspergilusa (*A. flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. nidulans*) je posledica njegovih brojnih morfoloških i fiziološko - biohemijskih osobina (mala veličina, veća otpornost, adhezivnost i germinacija spora, rast na višim temperaturama, proizvodnja toksina i više enzima). Veruje se da navedene osobine ove vrste aspergilusa imaju značajnu ulogu u patogenezi aspergiloze, a da bitno ne utiču na stepen virulencije uzročnika. Svakako, poželjna visoka ambijentalna temperatura u prvim nedeljama odgoja ćurica, posebno kod najmlađih kategorija, pospešuje razvoj gljivica koje kontaminiraju prostirku ili kompletnu krmnu smešu namenjenu za ishranu ove kategorije. Spore gljivica dospele u vazduh predstavljaju rizik da osobe koje rade u živinarnicima obole od aspergiloze.

Aspergiloza je rasprostranjena širom sveta, pa i kod nas, posebno u uzgoju ćuraka kod najmlađih kategorija prouzrokujući značajne ekonomske gubitke nastale zbog mortaliteta, niskih proizvodnih performansi i lošeg kvaliteta trupova.

U prirodnim uslovima infekcija ćurića najčešće nastaje preko respiratornog sistema, odnosno aerogeno, a ređe ingestijom spora. Kliničkom slikom dominiraju respiratorni simptomi (dispnoja, hropci, disanje na otvoren kljun, opšta slabost), a ređe simptomi nervnog sistema, kada je inflamatorni proces lokalizovan najčešće u malom mozgu. Nervni simptomi su posledica hematogene diseminacije uzročnika. Značajno je saznanje da infekcija sa *Aspergillus fumigatus* može da započne već u inkubatoru ili u inkubatorskoj stanici. Poznato je da *A. fumigatus* može da penetrira kroz neoštećenu ljusku jaja, odnosno pore, i tako dospe u vazдушnu komoru gde se razmnožava. Iz vazdušne komore prolazi kroz jajčanu ovojnicu u belance i ubija embrione ćurića u starosti od 10 do 12 dana. Zaprljanost ljuske i povećana vlažnost vazduha u inkubatorima, u fazi leženja ćurića pospešuju razvoj gljivica i njihovu penetraciju u jaja.

Predisponirajući faktori za nastanak aspergiloze kod ćuraka, pored virusnih i bakterijskih infekcija su: slab imunski status nastao zbog duže primene antibakterijskih lekova, kontinuirano izlaganje stresogenim faktorima (učestala vakcinacija, gladovanje, loš kvalitet hrane ili hrana kontaminirana gljivicama i njihovim toksinima, metabolička oboljenja, prenaseljenost), izlaganja lošim ambijentalnim i sanitarnim uslovima uzgoja, i lošem menadžmentu (visoka vlažnost i temperatura, nedovoljna ili loša ventilacija, loša higijena objekta, vlažna i plesnima kontaminirana prostirka, visoka koncentracija prašine u objektima i dr.).

Patomorfološke promene aspergiloze kod ptica karakteriše dobro diferencirana i organizovana ćelijska infiltracija u respiratornim organima sa posledičnim razvojem granulomatozne pneumonije sa nekrozom. Za razumevanje patogeneze aspergiloze posebno je značajno poznavanje mehanizama indukcije inflamatornog odgovora pod uticajem *A. fumigatus*, evolucije patomorfološkog supstrata, kao i uslova njegove hematogene diseminacije u različita tkiva, zavisno od broja unetih spora i načina infekcije.

U literaturi su opisani rezultati ispitivanja mikroskopskih lezija u plućima, vazдушnim kesama, srcu i jetri ćurića eksperimentalno inficiranih inokulacijom suspenzije konidija *Aspergillus fumigatus* u vazdušne kese i traheju.

Iako postoji dosta radova o aspergilozi ćurića, malo se zna o patogenezi bolesti i patomorfološkim promenama u različitim tkivima kod imunosuprimiranih jedinki. Imajući to u vidu, zadatak ovog rada bio je da u eksperimentalnim uslovima ispita

zdravstveno stanje, nastanak patomorfoloških promena i diseminaciju *Aspergillus fumigatus* u različitim organima kod imunosuprimiranih i imunokompetentnih ćurića.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Respiratorne gljivične infekcije ptica

Aspergiloza je mikotično oboljenje koje se karakteriše prvenstveno promenama na respiratornim organima, a ponekad protiče i kao generalizovana infekcija. Najčešći uzročnik je *Aspergillus fumigatus*, a u opadajućoj incidenci *A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus* i *A. nidulans* (Akan i sar., 2002; Kunkle, 2003; Martin i sar., 2007; Beernaert, 2010). Razlog što je *Aspergillus fumigatus* prevalentan prouzrokovač leži u činjenici što raste na temperaturi supstrata i do 50°C kada druge plesni (gljivice) gube tu sposobnost, što su njegove spore pahuljičaste i značajno manje (1-3 µm) od drugih, što ima znatno veću germinaciju od drugih vrsta aspergilusa, i na kraju, što *A. fumigatus* ima veću sposobnost adherencije za respiratorni epitel od drugih aspergilus vrsta (Richard i Thurston, 1983; Tronchin i sar., 1997; Bouchara i sar., 1997; Joseph, 2000). Prema tome, *Aspergillus fumigatus* je najčešći uzročnik aspergiloze živine i prvi put je nađen u plućima droplje (*Otis Tarda*) 1863 god., a ustanovio ga je Fresenius. Ovom prilikom Fresenius je nazvao uzročnika današnjim imenom, a otkrivenu respiratornu bolest nazvao je aspergilozom. Od tada do danas, aspergiloza je opisana kod velikog broja vrsta ptica (pilići, ćurići, guščići, golubovi, labudovi, nojevi, kanarinci i dr.) (Femenia i sar., 2007; Beernaert i sar., 2010; Arne i sar., 2011).

Ovo mikotično oboljenje akutnog i hroničnog toka rašireno je u celom svetu. Prevalenca kod komercijalnih i repro jata ćurića i pilića u zemljama Evrope kreće se od 10 do 25% (Sabino i sar., 2012), a u zemljama USA od 5 do 10% (Richard i Thurston, 1983; Morris i Fletcher, 1988; Kunkle, 2003). Prosečni godišnji gubici od aspergiloze u živinarstvu u SAD su oko 11 miliona dolara (Suleiman i sar., 2012). Sve češća pojava gljivičnih oboljenja kod živine, između ostalog, pripisuje se i nekontrolisanoj i neadekvatnoj primeni antibakterijskih lekova koji uništavaju prirodne saprofitske mikroorganizme neophodne za suprimiranje rasta i razmnožavanja gljivica (De Lucca, 2007).

2.2. Otkriće infekcije *Aspergillus fumigatus* kod ptica

Aspergiloza je ustanovljena kako kod ptica koje borave u zatvorenom prostoru kada se javlja endemski, tako i kod onih koje se drže u slobodnom prostoru uz sporadičnu pojavu, a naročito ako se smanji njihova opšta otpornost izazvana imunosupresivima (Kahn, 2000). Inače, bolest nije kontagiozna i češće nastaje kod imunokompromitovanih jedinki (Calnek, 1997; Levinson i Jawetz, 2001). Ipak, čini se da su mlađe individue podložnije infekciji od odraslih, a ćurići su osetljiviji od pilića (Kureljušić i sar., 2011).

Aspergiloza nastaje inhalacijom velikog broja spora, najčešćeg prouzrokovača *A. fumigatus*, u kratkom vremenskom periodu ili dugotrajnim izlaganjem ovog organskog sistema niskoj koncentraciji spora (kontaminirana prašina iz prostirke ili hrane), a ređe njihovom ingestijom preko kontaminirane hrane. Epizootskoj pojavi bolesti često prethodi stres izazvan lošom ventilacijom, lošim uslovima držanja, visokom temperaturom u objektima koja obezbeđuje brz rast i razmnožavanje gljivica što za posledicu ima stvaranje hidrofobnih konidija, koje lako dospevaju u vazduh i respiratorni sistem živine. Sa druge strane, visoka temperatura smanjuje vlažnost i dovodi do stvaranja prašine u čijim se česticama nalaze uzročnici. Isto tako, primena antimikrobnih lekova, za koje se zna da imaju imunosupresivni efekat, doprinosi nastanku bolesti (Pinello i sar., 1977; Latge, 1999; Kunkle, 2003; Lugauskas i sar., 2004; Gigli i sar., 2005 ;Nichita i sar., 2010; Neiguitsila i sar., 2011). Izgleda da i aktivna imunizacija živine protiv nekih oboljenja kao što su infektivni bronhitis i atipična kuga živine putem aerosola povećava incidenciju nastanka aspergiloze, ali i prisustvo mikotoksina u hrani (Barton i sar., 1992). Svakako, za nastanak bolesti je značajna i disfunkcija odbrambenih mehanizama prednjih delova respiratornog sistema, pa čak i poremećena funkcija intrapulmonalnih odbrambenih faktora čiji je zadatak eliminacija respiratornog patogena (Latge, 1999; Beernaert i sar., 2008).

Bolest obično protiče u akutnom ili hroničnom toku. Akutnu aspergilozu karakteriše invazivni oblik sa promenljivim morbiditetom i visokim mortalitetom, brzo napredovanje i loša prognoza. Kliničku simptomatologiju karakteriše dispnoja, dahtanje, distenzija abdomena zbog razvoja ascitesa (Latge, 1999; Saif i sar., 2008; Zafra i sar., 2008). Hronični tok aspergiloze nastaje nakon kontinuiranog i dugotrajnog

izlaganja živine sporama *A. fumigatus* u slučajevima kada je oslabljena otpornost organizma, odnosno kada je smanjena imunska sposobnost jedinki. Obično se javlja kod živine starosti od 13 do 18 nedelja (Akan i sar., 2002; Kunkle, 2003; Femenia i sar., 2009; Martin i sar., 2007; Zafra i sar., 2008; Kapetanov i sar., 2011). Makroskopsku sliku hroničnog toka bolesti karakteriše nalaz više gljivičnih čvorića u plućnom tkivu koji nekad konfluiraju, a u njihovom centru otkrivaju se gljivični elementi (hife). Ovakvi granulomi otežavaju plućnu cirkulaciju čije se posledice reperkutuju i na srčanu funkciju. U nekim slučajevima promene se otkrivaju u traheji i donjem grkljanu (syrings) (Pal i sar., 1988; Reichard i sar., 1997). Ponekad gljivice invadiraju i krvne sudove kada dolazi do njihove propagacije u druga tkiva i organe sa razvojem milijarnih i supramilijarnih granulomatoznih inflamacija (Richard, 1997; Keymer, 1982; Reece i sar., 1986; Akan i sar., 2002). Dokaz hematogene propagacije jeste nalaz germinativnih oblika gljivice u krvi posle aerogenog izlaganja živine sporama uzročnika *A. fumigatus* i *A. flavus* (Richard i Thurston, 1983).

2.2.1. Učestalost pojavljivanja aspergiloze kod živine u našoj i drugim zemljama sveta

Aspergiloza kod ptica je prijavljena skoro u svim zemljama sveta. Živinarska industrija suočava se sa značajnim ekonomskim gubicima nastalim zbog infekcije sa najčešće izolovanim ubikvitarnim gljivicama vrste *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus* i *A. nidulans*. Gubici izazvani gljivicama *Aspergillus* spp. nastaju zbog niskih proizvodnih performansi živine, mortaliteta i lošeg kvaliteta trupova (Joseph, 2000).

Neke geografske i sezonske karakteristike imaju uticaja na učestalost pojavljivanja aspergiloze kod nas, ali i širom sveta. Primećeno je da se aspergiloza kod brojlerskih pilića i ćurića u našoj zemlji češće zapaža severno od reke Save i Dunava u odnosu na druge delove. Slučajevi akutne aspergiloze kod brojlerskih pilića i ćurića u Vojvodini su dijagnostikovani na osnovu kliničkih i laboratorijskih ispitivanja tokom tri izabrane godine (2000, 2010 i 2014.) kod jaja i živine različite starosti (izležena jaja, mlade i odrasle jedinke). Ustanovljena je povećana incidencija akutne aspergiloze, posebno kod mladih jedinki (Kapetanov i sar., 2011).

Tokom 2000. godine akutna aspergiloza je ustanovljena kod 12 komercijalnih jata brojlerskih pilića i ćurića, 2010. kod 16 jata, a 2014. godine kod 21 jata obe vrste brojlera. Infekcija oka sa *A. fumigatus* dijagnostikovana je kod dva jata brojlera uzrasta od 10 dana. *Aspergillus* spp. je izolovan iz 6,86% neinkubiranih jaja, 23,07% uzoraka prostirke, 36,17% uzoraka iz spoljnog okruženja i 3,85% uzoraka sa površine inkubiranih jaja (Kapetanov i sar., 2011).

Učestalost pojave aspergiloze kod komercijalnog uzgoja ćuraka (8,5%) i roditeljskih jata (5%) je značajno manja od pojave kolibaciloze (16%) i kolere (18%) u većini zemalja SAD (Richard i Thurston, 1983; Morris i Fletcher, 1986; Kunkle, 2003). U zemljama Evrope prevalencija aspergiloze kod komercijalnih i roditeljskih jata ćuraka i pilića kreće se od 10% do 25% (Sabino i sar., 2012).

Slučajevi uginuća živine od aspergiloze mogu da se ustanove u bilo koje vreme tokom godine. Maksimalan stepen učestalosti uginuća ćuraka od aspergiloze na zapadnoj i istočnoj obali SAD zapažen je tokom leta zbog visoke koncentracije čestica prašine u vazduhu koje su odličan nosač spora gljivica (Sabino i sar., 2012).

Aspergiloza prouzrokuje prosečni godišnji gubitak od 11 miliona dolara u živinarstvu SAD (Suleiman i sar., 2012).

2.3. Etiologija

2.3.1. Klasifikacija (sistematika i nomenklatura)

Uzročnici aspergiloze su gljive iz roda *Aspergillus* unutar kojeg prevladava *A. fumigatus*. Ovaj rod obuhvata oko 200 vrsta, ali samo nekoliko njih (manje od 20) može da se razmnožava u organizmu sisara i ptica (Denning i sar., 2003; Richardson i Warnock, 2003). Ovi mikroorganizmi su obično saprofiti tla koji rastu na organskom materijalu pri temperaturi od 30 do 37°C uz veliku vlažnost te su široko rasprostranjeni u prirodi. Rastu na opalom lišću, u skladištima žita, sena i drugim materijama biljnog porekla. Njegove spore često se nalaze u vazduhu, prašini, vodi i hrani. Procenjuje se da se koncentracija konidija u kubnom metru vazduha može da kreće od 1 do 100 (Denning i sar., 2003). Tako je *A. fumigatus* najzastupljeniji organizam u mikroflori

fermentirajućeg biljnog materijala, a može se značajno razmnožiti i u vlažnoj dubokoj prostirci živinarnika.

Aspergillus fumigatus razmnožava se pomoću spora koje se stvaraju aseksualnim putem, pa se takve gljive nazivaju nesavršene, odnosno nepravne gljive - *Fungi imperfecti* (*Deuteromycetes*). Inače, polni način razmnožavanja *A. fumigatus* opisan je od strane O’Gorman i saradnika (2008). Tako, novi naziv za seksualni tip razmnožavanja, inače aseksualne gljive *A. fumigatus* je *Neosartorya fumigata* (O’Gorman i sar., 2008). Nomenklatura *A. fumigatus* i srodnih vrsta određena je ispitivanjem fenotipskih makro i mikromorfoloških osobina, temperaturnog režima rasta, genotipskih karakteristika (RAPD – PCR) i tipizacijom multilokus sekvence (MLST) za beta tubulin, kalmodulin i aktin gene. Na osnovu ovih rezultata otkriveno je 30 vrsta unutar podfamilije *Fumigati* (Horn i sar., 2009). Detaljno ispitivanje sojeva koji su ranije smatrani *A. fumigatus* pokazalo je da se ova vrsta može da podeli u četiri grupe i to: *A. fumigatus sensu stricto*, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* i *A. novofumigatus* (Balajee i sar., 2007; Horn i sar., 2009). Prema Balajee i sar. (2007) u tabeli 1 prikazano je filogenetsko stablo *Aspergillus* spp. podfamilije *Fumigati* dobijeno analizom gena za beta tubulin, a u tabeli 2 prikazan je spektar produkata *Aspergillus* spp. (Tabela 1 i Tabela 2).

Identifikacija kliničkih izolata *A. fumigatus* vrši se na osnovu makroskopskih karakteristika kolonija, morfoloških osobina konidija i konidiofora (oblik, veličina, boja, način vezivanja, prepoznavanje seksualne i aseksualne strukture), mikroskopskih (pregled organa za razmnožavanje, izgled, veličina i boja hifa, prisustvo ili odsustvo septi), filogenetskih (beta tubulin, kalmodulin, aktin i ITS) i molekularnih DNK karakteristika dobijenih sekvenciranjem (Gibbons i Rokas, 2013). Nažalost, postoje brojne poteškoće u indentifikaciji *A. fumigatus* na osnovu fenotipskih osobina, jer su one nestabilne, a klinički izolati ponekad imaju atipičan izgled sa sporom sporulacijom i aberentnim konidioforama koje ne produkuju konidije. Pored toga, morfološke osobine članova podfamilije *Fumigati* mogu da se preklapaju sa nekoliko postojećih vrsta (Balajee i sar., 2007). To su eukariotski mikroorganizmi koje odlikuje heterotrofni način ishrane (ne sadrže hlorofil), višećelijska organizacija i prisustvo polisaharida hitina i nešto malo celuloze u ćelijskom zidu. Micelijum aspergilusa se sastoji od razgranatih septiranih hifa. Na vrhovima hifa su proširenja - konidiofore na kojima su kratki dršci -

fijalide na koje se nastavljaju konidiospore - spore tako da formacija podseća na maslačak. Hidrofobni proteinski omotač štiti konidije od odbrambenih mehanizama domaćina (Penalver i sar., 1996). Pored ovog, i prisustvo melanina u ćelijskom zidu sa svojim hidrofobnim svojstvom štiti aspergiluse od UV zračenja i oksidativnog stresa (Grosse i sar., 2008, Jorgensen i sar., 2011).

Tabela 1. Filogenetsko stablo *Aspergillus* spp. Identifikovane vrste značajne za humanu i veterinarsku medicinu (zatomnjena polja).

<i>Neosartorya aurata</i>	<i>Aspergillus viridinutans</i>
<i>N. stramenia</i>	<i>N. laciniosa</i>
<i>N. assulata</i>	<i>N. spinosa</i>
<i>Aspergillus unilateralis</i>	<i>A. fumigatiaffinis</i>
<i>A. brevipes</i>	<i>A. terreus</i>
<i>A. duricaulis</i>	<i>A. tubigenis</i>
<i>N. multiplicata</i>	<i>A. niger</i>
<i>N. galapagensis</i>	<i>A. novofumigatus</i>
<i>N. glabra</i>	<i>N. coreana</i>
<i>A. turcosus</i>	<i>A. lentulus</i>
<i>N. nishimurae</i>	<i>A. flavus</i>
<i>N. hiratsukae</i>	<i>A. fumisynnematus</i>
<i>N. fennelliae</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>N. tatenoi</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>N. spathulata</i>	<i>A. fisherianus</i>
<i>N. pseudofischeri</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>N. quadricincta</i>	<i>A. fumigatus</i> var. <i>acolumnaris</i>
<i>N. udagawe</i>	<i>A. fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i>
<i>N. aureola</i>	<i>A. fumigatus</i> var. <i>phaliseptus</i>
	<i>A. fumigatus</i> var. <i>sclerotiorum</i>
	<i>A. fumigatus</i> = <i>A. anomalus</i>
	<i>A. fumigatus</i> (albino mutant)

Tabela 2. Produkti vrste *Aspergillus*, podfamilije *Fumigati*

Vrste	Produkti
<i>Aspergillus brevipes</i>	rokvefortin C, meleagrin
<i>Aspergillus duricaulis</i>	pseurotin A, fumagilin, asperpentin, asperdurin, hromanoli
<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	aurantin, cikloehinulin, neosartorin, palitantin, piriropeni
<i>Aspergillus fumigatus</i>	fumagilin, fumitoksini, fumitremorgini, gliotoksin, tripacidin, pseurotin, verukulogen, fumikvinazolini
<i>Aspergillus fumisynnematus</i>	neosartorin, piriropeni, fumimicin
<i>Aspergillus lentulus</i>	piriropeni A, E, O, terein, aurantin, neosartorin
<i>Aspergillus novofumigatus</i>	aszonalenin, cikloehinulin, neosartorin, palitantin, terein, teritrem B
<i>Aspergillus turcosus</i>	kotanini i nekoliko jedinstvenih ali još uvek nedovoljno poznatih sekundarnih metabolita
<i>Aspergillus unilateralis</i>	mikofenolna kiselina, drugi nedovoljno poznati sekundarni metaboliti
<i>Aspergillus viridutans</i>	viriditoksin, fomalignin A, variotin, viriditin
<i>Neosartorya assulata</i>	indol alkaloidi i nepolarni metaboliti
<i>Neosartorya aurata</i>	helvolic kiselina, žute neidentifikovane komponente
<i>Neosartorya aureola</i>	fumagilin, triptokvivalini, triptokvivaloni, pseurotin A i viriditoksin
<i>Neosartorya australensis</i>	vortmanin, aszonalenini
<i>Neosartorya coreana</i>	aszonalenini
<i>Neosartorya denticulata</i>	gliotoksin, viriditoksin
<i>Neosartorya fennelliae</i>	asperfuran, aszonalenin, fumigaklvin, viridikatumtoksin
<i>Neosartorya ferenczii</i>	asperfuran, aszonalenin, fumigaklvin, viridikatumtoksin, gliotoksin, fumigatins, aszonalenin
<i>Neosartorya fischeri</i>	terein, fumitremorgin A i C, triptokvivalin A, tripacidin, verukulogen, sarcin, fišerin, neosartorin
<i>Neosartorya galapagensis</i>	gregatins
<i>Neosartorya glabra</i>	asperpentin, avenaciolide
<i>Neosartorya hiratsuke</i>	avenaciolide
<i>Neosartorya lacinosia</i>	aszonalenini, triptokvivalini, triptokvivaloni
<i>Neosartorya multiplicata</i>	helvolic kiselina
<i>Neosartorya papuensis</i>	vortmanin
<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	asperfuran, citohalazinu slična jedinjenja gliotoksin, piriropeni

<i>Neosartorya quadricincta</i>	kvinolaktacin, aszonalenini
<i>Neosartorya spinosa</i>	pseurotin, aszonalenini
<i>Neosartorya spathulata</i>	ksantocilidi, aszonalenini
<i>Neosartorya stramenia</i>	avenacidide
<i>Neosartorya tetonoi</i>	aszonalenini
<i>Neosartorya udagawae</i>	fumigatin, fumagilin, triptokvivalini, triptokvivaloni
<i>Neosartorya warcupii</i>	vortmanin, aszonalenin, hromanol, triptokvivaloni

Za *Aspergillus fumigatus* obično se kaže da je termofilna vrsta, s obzirom da raste na temperaturi i do 55°C i da preživi na temperaturi 75°C, ali obilna sporulacija može da bude na temperaturi od 30°C (Raper i Fennell, 1965; Kwon-Chung i Bennett, 1992; Haines, 1995; Tekaiia i Latge, 2005). Ustanovljeno je da *Aspergillus fumigatus* proizvodi mnoge enzime kao što su fosfolipaze i različite proteaze (serin alkalna proteaza, aspartat proteaza, metaloproteaza) koje imaju sposobnost da suprimiraju imunski odgovor i oštete tkivo domaćina (Monod i sar., 1991; Monod i sar., 1993; Birch i sar., 1996; Reichard i sar., 1997). Takođe, dokazano je da *A. fumigatus* proizvodi nekoliko toksičnih supstanci od kojih je najviše proučavan gliotoksin. On inhibira fagocitozu makrofaga i heterofila, kao i aktivaciju B i T limfocita, a podstiče apoptozu makrofaga (Mullbacher i sar., 1985; Sutton i sar., 1994; Sutton i sar., 1996).

2.3.2. Morfološke osobine *Aspergillus fumigatus*

Hife *Aspergillus fumigatus* prečnika su 1 - 3µm, septirane su i granaju se u dva dela. Konidiofore su glatke, bezbojne do svetlo - zelene boje, dužine do 300µm i širine od 5 do 8 µm. Na kraju se postepeno povećavaju i formiraju vezikulu u obliku boce - pljoske čiji se prečnik kreće od 20 do 30µm sa jednim nizom fijalida iznad distalne polovine. Fijalide su dužine od 6 do 8µm i raspoređene su naviše paralelno sa osovinom konidiofore. Karakteristično za *A. fumigatus* je razvoj kolumnarnog oblika lanca konidija koji mogu da dostignu dužinu i do 400µm (Saif, 2008). Konidije su sferičnog do eliptičnog oblika, izrazito hidrofobne i lako dospevaju u vazduh ako su zrele (Bennett i Klich, 2003).

Nekoliko izolata *Aspergillus fumigatus* ne poseduje pigment i stvaraju bezbojne konidije, a svaka konidijalna glava produkuje hiljade spora prečnika 2 - 3µm (Latge, 1999).

Rezultati skorašnje molekularne studije DNK (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism) pokazali su visoki stepen genetske različitosti između pojedinih kliničkih izolata kod ljudi, morfološki definisani kao *A. fumigatus*. Ovo je dovelo do opisa novih vrsta - *A. lentulus* i *A. udagawae* (Balajee i sar., 2007; Horn i sar., 2009).

2.3.3. Kulturelne osobine *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus veoma brzo raste na različitim konvencionalnim podlogama kao što je Sabouraud dekstrozni agar i Czapek agar. Kolonije dostižu veličinu od 4 ± 1cm tokom jedne nedelje kada se uzgajaju na Czapek podlozi pri temperaturi od 25°C (Raper i Fennell, 1965). Kao termofilna vrsta *A. fumigatus* raste i do 55°C, a može da se održava i opstane na temperaturi i do 70°C. Za mnoge patogene vrste *Aspergillus* spp. optimalna temperatura za rast je od 30°C do 37°C, a obilna sporulacija se dešava pri temperaturi od 30°C (Raper i Fennell, 1965; Kwon-Chung i Bennett, 1992; Haines, 1995).

Kolonije *A. fumigatus* su pljosnatog oblika, plavičasto - zelene, najpre bele boje, a zatim plavičasto - zelene kada konidije počinju da sazrevaju, posebno u sredini središnjeg dela kolonije. Daljim sazrevanjem kolonije dobijaju sivo - zelenu boju, dok rubovi kolonije ostaju bele boje. Ovakav morfološki izgled kolonija *A. fumigatus* karakterističan je za najveći broj kliničkih izolata, ali može da se razlikuje po boji, morfologiji i brzini rasta (Leslie i sar., 1988). Generalno se može reći da aspergilusi izolovani iz zemljišta i obolelih ljudi i životinja imaju izuzetno promenljive kulturelne i morfološke karakteristike u odnosu na izgled *A. fumigatus* opisan 1965. godine od strane drugih autora (Raper i Fennell, 1965; Leslie i sar., 1988; Schmidt i sar., 1997; Horn i sar., 2009).

2.3.4. Biohemijske osobine *Aspergillus fumigatus*

Potreba za bolje taksonomsko definisanje vrste *A. fumigatus* uslovalo je otkrivanje njegovih specifičnih biohemijskih i molekularnih karakteristika koje obuhvataju identifikaciju sekundarnih metabolita i ubihinon sistema (Matsuda i sar., 1992), kao i poznavanje izoenzimske strukture (Lin i sar., 1995; Rodriguez i sar., 1996). *Aspergillus fumigatus* proizvodi veći broj hidrolitičkih enzima, serin i aspartat proteinaze i metaloproteinaze koje poseduju snažne destruktivne osobine koje imaju značajnu ulogu u patogenezi bolesti (Kolattukudy i sar., 1993; Reichard i sar., 1997). Pored toga, *A. fumigatus* proizvodi i alkalne proteinaze (Smith i sar., 1994; Blanco i sar., 2002), dipeptidilpeptidaze i fosfolipaze koje doprinose virulenciji ove plesni olakšavajući joj kolonizaciju plućnog, ali i drugih tkiva (Karkowska–Kuleta i sar., 2009). Kothary i saradnici (1984) su prvi opisali pozitivnu korelaciju između produkcije elastaza i invazivnosti *A. fumigatus*. Isti autori su dokazali da sojevi *A. fumigatus* koji proizvode elastaze su letalniji od sojeva koji ne proizvode ove proteaze. Tako, prvi izazivaju uginuće kod svih inficiranih miševa tretiranih kortizonom, a drugi samo kod jedne trećine inficiranih miševa. U drugim istraživanjima je ustanovljeno da svi sojevi izolovani iz ljudi obolelih od invazivne aspergiloze pokazuju elastaznu aktivnost kao i jedna trećina sojeva izolovanih iz spoljašnje sredine (Blanco i sar., 2002). Serin proteinaza i metaloproteinaze imaju elastolitičko dejstvo, a prevashodno deluju na plućno tkivo koje je bogato elastinom (Horn i sar., 2009). Serin proteinaza (AFA 1p) je član familije suptilizina i može da degradira ne samo elastin već i kolagen, fibrin i fibrinogen. Ovaj protein nalazi se ekstracelularno, ali je povezan i sa ćelijskim zidom (Kauffman i sar., 2000). Pored navedenih proteinaza *A. fumigatus* proizvodi i druge hidrolitičke enzime, nukleaze i fosfataze (Kauffman i sar., 2000). Na kraju, ustanovljeno je da postoji značajna korelacija između aktivnosti fosfolipaze i jačine intenziteta infekcije prouzrokovane sa *A. fumigatus* (Alp i Arkan, 2008).

2.3.4.1. *Aspergillus fumigatus*, mogući faktori virulencije

Značaj infekcije izazvane sa *A. fumigatus* opisan je u brojnim radovima, a odnose se na identifikaciju faktora virulencije prouzrokovaca. Oni su vrlo različiti i varijabilni. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja njegova virulencija je multifaktorijska, i pre svega, zavisi od imunskog statusa domaćina i bioloških osobina plesni, a kodirana je od strane više gena (Rementeria i sar., 2005). Prema istraživačima Latge (2007) i Abadu i saradnicima (2010) virulencija *A. fumigatus* zavisi od nekoliko ključnih faktora: morfološke strukture plesni, kapaciteta za rast i adaptaciju na spoljašnje stresne uslove, razvijenih sopstvenih mehanizama za izbegavanje uticaja imunskog sistema domaćina i sposobnosti da izazove tkivne lezije kod domaćina. Da bi gljivica *A. fumigatus* bila invazivna neophodno je da njene konidije imaju sposobnost adhezije za bazalnu membranu ili različite proteine domaćina kao što su laminin, fibrinogen, albumin, kolagen, surfaktantni proteini (A i D), komplement, imunoglobulini i fibronektin, kao i sposobnost penetracije (Annaix i sar., 1992; Coulot i sar., 1994; Gil i sar., 1996; Bromley i sar., 1996; Penalver i sar., 1996; Bouchara i sar., 1997; Madan i sar., 1997; Tronchin i sar., 1997). Od postojećih mehanizama adhezije samo njih nekoliko izučavani su na molekularnom i biohemijskom nivou. Spoljni zid ćelijskog zida konidije *A. fumigatus* sastoji se od upletenih snopića sastavljenih od hidrofobnih proteina (hidrofobini) koji su odgovorni za hidrofobna svojstva (Thau i sar., 1994). Hidrofobini su porodica homolognih proteina prisutnih na površini plesni. Imaju malu molekulsku masu koja se kreće od 10-20 kDA i izuzetno su otporni na hemijsku degradaciju. Mapiran je i gen koji kodira Rodlet protein RodAp *A. fumigatus* (Parta i sar., 1994; Thau i sar., 1994). Detektovani su i drugi hidrofobni proteini tokom klijanja konidija *A. fumigatus*, ali njihova priroda i uloga u virulenciji nije još poznata (Penalver i sar., 1996). Ugljeni hidrati i drugi proteinski molekuli prisutni na površini zida konidija uključeni su u njihovo vezivanje na proteine domaćina (Madan i sar., 1997). Ova veza nastaje preko nespecifičnih fizičko - hemijskih interakcija i/ili specifičnih receptora na ćelijskom zidu plesni građenih od alfa, beta - 1,3 glukana, galaktomanana i hitina (Latge, 1999; Latge, 2005). Značajnim faktorom virulencije i invazivnosti *A. fumigatus* smatra se tolerancija na toplotu, prisustvo adhezina, produkcija pigmenata i ekstracelularnih enzima, kao i sekundarnih metabolita (mikotoksina) (Latge, 2007;

Karkowska-Kuleta i sar., 2009). Međutim, mnogi od njih štite plesan od štetnih uticaja spoljne sredine te je njihova uloga u patogenosti često nedovoljno jasna (Alp i Arikan, 2008; Karkowska-Kuleta i sar., 2009). Tako, značajan protektivni faktor *A. fumigatus* je sposobnost ćelijskog zida konidije, ali ne i hifa, da uz učešće enzima kodiranih od 6 gena sintetiše braon - zeleni ili sivi pigment melanin (Latge 2007). Proizvedeni pigment ima hidrofobne osobine (Brakhage i Liebmann, 2005). Prisustvo melanina ograničava aktivaciju komplemента i aktivnost neutrofila. Činjenica je i to da odsustvo proizvodnje melanina (bela konidija) smanjuje njihovu virulenciju i čini ih osjetljivim na dejstvo H₂O₂ i natrijum hipohlorita, ali i na fagocitozu od strane makrofaga u uslovima *in vitro* (Abad i sar., 2010). Opisano je nekoliko vrsta melanina: prekursor 1,8 dihidroksinaftalena (DHN melanin) i prekursor L - 3,4 dihidroksifenilalanina (DOPA melanin) su najvažniji i učestvuju u patogenezi bolesti (Hamilton i Gomez, 2002; Langfelder i sar., 2003). Sivo - zeleni i plavo - zeleni pigmenti konidija *A. fumigatus* potiču od DHN melanina (Brakhage i Liebmann, 2005). Sintetisani melanini štite *A. fumigatus* od uticaja ultravioletnog spektra, visokih temperatura i enzimskog razlaganja i tako obezbeđuju njegovo preživljavanje i produžavanje opstanka (Rementeria i sar., 2005). Melanini takođe štite *A. fumigatus* od uticaja reaktivnih kiseonikovih radikala nastalih tokom infekcije domaćina i obezbeđuju bolju podnošljivost temperaturnih razlika u odnosu na druge vrste aspergilusa, što je od suštinske važnosti za njegov rast u raspadnutoj organskoj materiji spoljne sredine. Ova fiziološka prilagodljivost obezbeđuje plesni predominantnu patogenost (Hensel i sar., 1998; Araujo i Rodrigez, 2009). Virulenciji *A. fumigatus* doprinosi i činjenica da su njegove konidije malog prečnika (2 - 3µm) i da se lako distribuiraju kroz ceo respiratorni sistem domaćina. Konidije dospele iz spoljne sredine u tkivo domaćina, gde su uslovi drugačiji, da bi preživele moraju da se stalno prilagođavaju (Bhabhra i sar., 2004; Rhodes, 2006). Proizvodnja i sekrecija hidrolitičkih enzima, kao što su proteinaze, lipaze i fosfolipaze su veoma važni faktori virulencije jer imaju značajnu ulogu u ishrani, oštećenju tkiva, diseminaciji po organizmu, pribavljanju gvožđa i savlađivanju imunskog sistema domaćina (Aboul-Nasr i sar., 2013). Ovi enzimi omogućavaju lakšu penetraciju plesni u tkiva i brži razvoj infekcije jer remete mehanizme imunskog sistema domaćina (Birch i sar., 2004). Međutim, lučenje enzima u spoljašnje okruženje može da bude važan adaptivni mehanizam tokom životnog ciklusa *A. fumigatus* (Monod i sar., 1993). Uloga

i značaj nekih faktora koji doprinose stepenu virulentnosti *A. fumigatus* i dalje su predmet ispitivanja jer se veruje da postoji značajna veza između njih, kao i da su neki od faktora kodirani brojnim genima. Zbog toga, često je nemoguće, da se bez sumnje, definiše koji od faktora u značajnoj meri doprinosi mehanizmu razvoja patogenosti. Postoje mnogi geni i proteini kojima se pridaje značaj za virulentnost *A. fumigatus*, ali još uvek nije otkriven faktor čiji bi nedostatak kompletno inhibirao invazivnost i letalitet ove plesni.

Važnost uloge gena u patogenosti plesni primećena je upotrebom mutanata kod kojih je eliminisan gen za virulentnost, što je za posledicu imalo smanjenje virulencije (Rementaria i sar., 2005). Tako, ribozomalna biogeneza proteina kodirana je od strane *crgA* (Bhabhra i sar., 2004), monoziltransferaza sa *ker/mntl* (Wagener i sar., 2008), a transmembranski senzor sa *ireA* genom (Feng i sar., 2011). Dobijeni rezultati pokazuju da su ovi proteini odgovorni za termotolerantni rast *A.fumigatus* i hipovirulentnost kada se odgovarajući gen ukloni iz genoma ove plesni (Feng i sar., 2011).

2.3.4.2. *Aspergillus fumigatus* i mikotoksini

Dokazano je da *A. fumigatus* proizvodi veći broj sekundarnih metabolita poznatih pod imenom mikotoksini. Oni mogu da povećavaju patogenost aspergilusa, da inhibiraju sintezu DNK i RNK i da izmene ćelijsku membranu što ima za posledicu oštećenje i smrt ćelije (Dagenais i Keller, 2009). Većina mikotoksina su produkti micelijuma. Oni su različite hemijske strukture i male molekulske mase (Dagenais i Keller, 2009). Proizvedeni i oslobođeni iz plesni mikotoksini inhibiraju druge mikroorganizme u svom okruženju čime obezbeđuju sopstvenu egzistenciju (Losada i sar., 2009), ali i mogućnost da prouzrokuju oboljenje ili smrt životinja i ljudi (Bennett i Klich, 2003; Bhatnagar i sar., 2015). Isto tako, mikotoksini povećavaju virulentnost, odnosno doprinose povećanju stepena patogenosti plesni. Nasuprot tome, neki mikotoksini imaju dokazana farmakološka dejstva i koriste se u terapiji nekih oboljenja (Latge, 2007; Ben-Ami i sar., 2010).

Izolovani su i opisani veći broj mikotoksina koje proizvodi *A. fumigatus*. Poseban značaj imaju: gliotoksin, fumagilin, fumitremogin, fumigaklavin C, helvolik kiselina, aureperon C, restriktocin i dr. (Dagenais i Keller, 2009; Ben-Ami i sar., 2010).

Značajnu ulogu u patogenezi aspergiloze imaju mikotoksini iz grupe EpipoliTiodioksoPiperazina (ETP), a među njima najpotentniji je gliotoksin sa moćnim anti - angiogenim efektom i odgovornošću za nastanak invazivne aspergiloze (Gardiner i Howlett, 2005; Ben-Ami, 2010).

Gliotoksin je ciklični neribozomalni dipeptid, a dobio je ime po metabolitu identifikovanom iz gljivice *Gliocladium fimbriatum*. Njegova toksičnost zasniva se na postojanju disulfidnog mosta koji može da inaktivira proteine preko reakcije sa tiolnim grupama i da stvara reaktivne vrste kiseonikovih slobodnih radikala. Zbog dostupnosti sekvencama kompletnog genoma plesni i efikasnih metoda za remećenje funkcije gena sada je moguće pristupiti putevima biosinteze mikotoksina grupe ETP i imati uvid u evoluciju te grupe gena (Gardiner i Howlett, 2005). Gliotoksin ima važna biološka dejstva kao što su: antimikrobno, antivirusno, genotoksično i imunosupresivno (Nieminen i sar., 2002). Visoka toksičnost grupe ETP toksina učinila ih je privlačnim i potencijalno terapijskim supstancama u tretmanu karcinoma (Tsunawaki i sar., 2004; Orciudlo i sar., 2007). Rezultati ispitivanja su pokazali da gliotoksin inhibira aktivnost NADPH oksidaze, smanjuje proizvodnju reaktivnih vrsta kiseonika (Reactive oxygen species-ROS) i slabi fagocitnu aktivnost neutrofila (Tsunawaki i sar., 2004; Orciuolo i sar., 2007). Takođe je dokazano da gliotoksin u uslovima in vitro prouzrokuje apoptozu i nekrozu (Gardiner i Howlett, 2005). Ranija ispitivanja su pokazala da svi sojevi *A. fumigatus* ne moraju obavezno da proizvode gliotoksin, i da sposobnost za njegovu sintezu nije stalna (Lewis i sar., 2005), kao i to, da različiti parametri mogu da utiču na biosintezu gliotoksina u uslovima in vitro (Kerzaon i sar., 2008).

Drugi važan toksin kojeg proizvodi *A. fumigatus* je fumagilin. To je antitumorski antibiotik koji inhibira angiogenezu (Rementeria i sar., 2005). Njegovo toksično dejstvo ogleda se u inhibiciji proliferacije endotelних ćelija i smanjivanju funkcije cilijarnog aparata respiratornog sistema kod ljudi. Skorašnji rezultati dokazuju da fumagilin utiče na aktivnost neutrofila i da smanjuje lokalni imunski odgovor (Fallon i sar., 2010). Helvolik kiselina, poznata pod imenom fumigacin je član porodice antibiotika iz grupe fuzidina (Rementeria i sar., 2005). Ona može da utiče na oksidativno pražnjenje i da prouzrokuje rupturu epitelnih ćelija (Amitani i sar., 1995).

2.3.5. Imunološke osobine *Aspergillus fumigatus*

Poznato je da *A. fumigatus* proizvodi značajan broj alergogenih molekula sa antigenim svojstvima što je poslužio kao osnova za rani razvoj i primenu imunoloških testova za serološku dijagnostiku aspergiloze kod imunokompetentnih domaćina. Nažalost, postoje kvalitativne i kvantitativne razlike u sastavu antigene komponente primenjene u raznim laboratorijama pa čak razlike postoje između serija koje potiču iz iste laboratorije (Hearn, 1992). Neki od njih kao što je citoplazmatska Mn superoksid dismutaza, kiseli ribosomalni protein P-2, ciklofilin, tioredoksin pripadaju porodici unakrsno reaktivnih alergena i reaguju sa raznim proteinima ljudskog organizma te mogu biti pokretači autoimunih bolesti u humanoj populaciji (Cramer i sar., 2011). Kod astmatičara i pacijenata sa alergijskom bronhopulmonalnom aspergilozom (ABPA) alergene molekule reaguju sa IgE antitelom (Abad i sar., 2010). Antigena svojstva *A. fumigatus* potiču od komponenti njegovog ćelijskog zida koje se prema istraživanjima (Latge i sar., 2005; Latge i sar., 2007 i Gastebois i sar., 2009) sastoje od polisaharida i proteina. Polisaharidi koji čine ćelijski zid su: beta 1,3 glukan (20-30%), alfa 1,3 glukan (10%), hitin (35-46%) i galaktomanan (20-25%). Purifikacijom galaktomanana ustanovljeno je da je on jedini polisaharidni antigen sa određenim karakteristikama koje odgovaraju *A. fumigatus* (Latge i sar., 1999). Tom prilikom je ustanovljeno da manan jezgro ima linearnu konfiguraciju koja sadrži alfa 1-2 i alfa 1-6 povezane ostatke u odnosu 1:3 i antigene kisele nestabilne bočne lance koji su razgranati na dva alfa (1-2) vezane ostatke manoze sastavljene od beta (1-5) ostataka galaktofuranose sa prosečnim stepenom polimerizacije od 4. Njegova sinteza odvija se pomoću enzima gvanozil i galaktoziltransferaze (Abad i sar., 2010). Izolovani galaktomanan iz *A. fumigatus* koristi se danas u komercijalnom testu (*Platelia Aspergillus*) za dijagnostiku invazivne aspergiloze kod ljudi (Del Palacio i sar., 2007). Beta glukan, komponenta ćelijskog zida takođe može da se koristi za dijagnostiku invazivne aspergiloze (Ishibashi i sar., 2004), a kinetika beta glukana je u korelaciji sa galaktomananom kod pacijenata obolelih od invazivne aspergiloze (Pazos i sar., 2005). Sa druge strane, neki autori u svojim istraživanjima (Latge, 1999; Rementaria i sar., 2005 i Latge, 2007) izveštavaju da je građa ćelijskog zida aspergilusa promenljiva i zavisi od više faktora. Ćelijski zid konidija se prema Abad i sar., 2010. razlikuje od zida hifa. Tako, hidrofobni sloj

konidija *A. fumigatus* pokriva imunogene strukture ćelijskog zida kao što su glukani i manani. Ovaj takozvani „Rodlet sloj“ sastavljen je od hidrofogina A i nestaje u fazi aktivacije konidija. Ovako konstituisani ćelijski zid svojom inertnošću i rigidnošću povećava otpornost prema aktivnosti imunskog sistema (Latge, 2007). Prepoznavanje *A. fumigatus* (polisaharidi, beta glukani, hitin i galaktomanan) od strane makrofagnih celularnih elemenata odvija se preko ćelijskih receptora PRR (Pattern Recognition Receptors) „*toll* receptor“ (TLR) i lektina tipa C. Lektini C (naročito dektin 1) ima važnu ulogu u prepoznavanju i ubijanju plesni i inflamacijskom signaliziranju. Odsustvo dektina 1 izrazito povećava sklonost ka infekciji sa *A. fumigatus* (Latge i sar., 2005). Takođe, vezivanje konidijalnog galaktomanana za pentraksin 3 receptor (PTX 3 receptor) povećava fagocitozu alveolarnih makrofaga i dendritičnih ćelija što rezultira promocijom Th 1 ćelija i citokina (Garlanda i sar., 2002). Suštinski značaj PTX 3 receptora i njihova pojačana aktivnost kod antigljivičnih reakcija izučavani su na modelu miša sa transplantacijom kostne srži (Ben- Ami i sar., 2010).

2.4. Animalni modeli aspergiloze

Životinjski modeli inficirani sa *Aspergillus* spp. se intenzivno koriste za izučavanje raznih aspekata aspergiloze. Razvijeno je nekoliko animalnih modela od strane raznih istraživača. Glavni cilj ovakvog eksperimentalnog ispitivanja aspergiloze, u uslovima *in vivo* je da se postigne detaljan uvid u patogenezu humane, ali i animalne aspergiloze, kao i njeno efikasno lečenje. Potom, cilj je i da se proceni validnost novih dijagnostičkih metoda aspergiloze, urođeni i adaptivni imunski odgovor, putevi prenošenja infekcije i njena imunološka analiza (Latge, 1999). Nedavno su razvijeni molekularni protokoli koji omogućuju dobijanje većeg broja gljivica mutanata, odnosno alternativni model infekcije zasnovan na ćelijskim kulturama ili beskičmenjacima. Ovi modeli će se široko koristiti za proveravanje takvih mutanata, čime će se smanjiti broj žrtvovanih životinja u grupi. Embrionirana jaja su jedan od alternativnih modela za ispitivanje stepena virulencije i patogenosti *A. fumigatus* i predstavljaju prelaz između beskičmenjaka i kičmenjaka (Jezdimirović i sar., 2013). Ovaj model je jeftin i na njemu se lako izazove infekcija sa *Aspergillus* spp. Istina, ishod infekcije na modelu embrioniranih jaja zavisi od doze - koncentracije konidija i starosti embriona. Na kraju,

ovaj model je visoko reproducibilan (Jezdimirović i sar., 2013). Da bi se obezbedio koristan i validan rezultat ispitivanja aspergiloze na inficiranim životinjama kao modelima, neophodno je pre započinjanja eksperimenta uzeti u obzir nekoliko faktora. Prvo, potrebno je da se izborom modela i vrste životinje može da imitira klinička slika bolesti, što bolje, tj. da se proceni da li je taj model akutne klinički manifestne bolesti viđen kod ljudi ili životinja. Drugo, da se proceni da li je model reproducibilan, treće, da li su protokoli laki za standardizaciju, i na kraju, da li je izabrani model ekonomičan. Tako, veliki broj studija je sproveden na različitim vrstama eksperimentalnih životinja koje su poslužile kao model bolesti (Polak, 1998). Za ispitivanje aspergiloze ptica korišćeni su različiti modeli: embrionirana jaja živine, mlade i odrasle jedinke inficirane preko pluća ili intravenski (Richard i Thurston, 1983; Chaudhary i Sadana, 1988; Kunkle i Rimler, 1996; Jezdimirović i sar., 2013). Dokazano je da su pilići manje osetljivi od ćurića i japanskih prepelica (Ghori i Edgar, 1973; Ghori i Edgar, 1979).

2.4.1. Ptičiji modeli aspergiloze

Aspergiloza je jedna od važnih plućnih infekcija kod ptica i razvijeno je nekoliko ptičijih modela koji treba da imitiraju različite oblike aspergiloze kod životinja i ljudi (Clemons i Stevens, 2005). Među različitim vrstama životinja koje su obolele od aspergiloze, ptice su jedna od retkih vrsta koje mogu da podlegnu prirodnoj infekciji iako ne postoji imunosupresija (Dagenais i Keller, 2009). Izučavanje aspergiloze vršeno je na različitim vrstama ptica (pilići, pačiči, ćurići, prepelice i domaći golubovi), različite starosti (prvi dan života, nekoliko nedelja i odrasle jedinke), različitog imunskog statusa (imunokompetentne, imunosuprimirane) uz različiti način aplikacije suspenzije konidija *Aspergillus* spp. (intratrahealno, intrapulmonalno, direktno u vazdušne kese) (Steinbach i sar, 2004; Beernaert i sar., 2008; Dagenais i Keller, 2009). Imunosupresija je prouzrokovana aplikacijom kortikosteroida nekoliko dana pre infekcije, a neutropenija ciklofosamidom ili nekim drugim hemoterapeutikom (Stephens-Romero i sar., 2005; Beernaert i sar., 2008). Kod najvećeg broja inficiranih jedinki smrt je nastupila veoma brzo, najčešće dva dana posle infekcije. Ovim ispitivanjima je dokazano da su prepelice osetljivije od ćuraka, morke manje, a da su pilići najmanje osetljivi. Isto tako, dokazano je da postoji različita osetljivost između

pojedinih linija (Ghori i Edgar, 1973; Ghori i Edgar, 1979). Makroskopskim pregledom organa respiratornog sistema prepelica ustanovljene su fokalne hemoragične lezije u traheji, plućnom tkivu i vazdušnim kesama koje u daljoj evoluciji progrediraju u beličaste noduse (Chaudhary i Sadana, 1988). Ovim istraživanjima je ustanovljena diseminacija uzročnika jedino kod ćurića i hematogeno širenje detektovano je već 15 minuta posle aplikacije konidija putem aerosola (Richard i Thurston, 1983). Slični rezultati ispitivanja patogeneze aspergiloze dobijeni su i od strane drugih autora (Kunkle i Rimler, 1996; Kunkle, 2003). Prema Pedan i Rhoades (1992) patogeneza aspergiloze zavisi od virulencije uzročnika izolovanih iz različitih izvora, kao i od načina aplikacije patogena. Ovakva ispitivanja su pokazala da toksini koje produkuje *Aspergillus* spp. mogu, ali i ne moraju, da imaju uticaj na patogenezu bolesti ili da toksini čine životinje osetljivim na infekciju. Ipak, aflatoksin dodavan u hrani ne povećava osetljivost ćurića prema infekciji (Richard i sar., 1984). Sa druge strane, gliotoksin izazivajući imunosupresiju ima značaj u patogenezi bolesti (Richard i sar., 1984). Takođe, na modelu ptica je ispitivano da li konidije *Aspergillus*-a različitog porekla (dobijene iz raznih izvora) imaju uticaja na sam tok bolesti. Tako je dokazano da *Aspergillus* poreklom iz prostirke od meke strugotine drveta prisutan u većoj koncentraciji od 10^6 /g prostirke izaziva težak oblik aspergiloze, a ako se njoj doda bakar - sulfat smanjiće se koncentracija konidija aspergilusa i smrtnost kod eksperimentalnih ćurića (Hamet i sar., 1991). Druga ispitivanja pokazuju da kontaminacija ljuske embrioniranih jaja sa *A. fumigatus* i kasnije rukovanje sa njima ima za posledicu širenje konidija u inkubatoru (Hamet i sar., 1991).

2.4.2. Zamorac kao model za aspergilozu

Zamorci su eksperimentalne životinje koje se koriste za ispitivanje eksperimentalne aspergiloze, uključujući modele za izučavanje invazivne plućne aspergiloze (*Invasive Pulmonary Aspergillosis* - IPA), sistemske aspergiloze i model za endokarditis. Ovi modeli su posebno korišćeni u proceni efikasnosti terapije IPA, posebno kod imunosuprimiranih životinja koje su inače značajno manje eksploatisane od imunokompetentnih (Kirkpatrick i sar., 2000).

2.4.3. Kunić kao model za aspergilozu

Nekoliko vrsta aspergilusa (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*) izučavano je na kunićima tokom ispitivanja IPA, sistemske infekcije, gljivičnog keratitisa i efikasnosti terapije gljivičnih infekcija (Polak, 1998; Latage, 1999). Model kunića je takođe korišćen u cilju ispitivanja postojanja veze između progresije bolesti i njene težine (Chilvers i sar., 1989).

Prema Loeffleri i saradnicima (2002) PCR metode se uspešno koriste u dijagnostici sistemske bolesti na animalnim modelima i daleko su osetljivije u odnosu na konvencionalno zasejavanje kulture krvi. Međutim, za određivanje težine gljivične infekcije u plućnom tkivu kod IPA O'Sullivan i saradnici (2002) preporučuju kvantitativnu fluorescentnu PCR tehniku. U poslednjoj deceniji uvedena je dijagnostička procedura određivanje koncentracije galaktomanana u krvi kunića (enzim-imunska proba - EIA), odnosno GMEIA. Koncentracija cirkulišućeg antigena je u korelaciji sa težinom oštećenja tkiva sa gljivicama (Marr i sar., 2004).

2.4.4. Glodari kao modeli za aspergilozu

Eksperimentalni modeli glodara koriste se za izučavanje invazivne aspergiloze, i oni se tokom poslednje decenije, češće koriste u poređenju sa modelima na drugim vrstama životinja. Prednosti modela glodara (miš, pacov i zamorac) su: mogućnost korišćenja većeg broja životinja, lakše rukovanje njima, dostupnost genetski definisanih linija i veća ekonomičnost (Clemons i Stevens, 2005; Desoubeaux i Cray, 2017). Miš je najčešća vrsta glodara korišćena kao model za ispitivanje invazivne aspergiloze (IA), i smatra se zlatnim standardom za ispitivanje patogeneze ovog oboljenja (Dagenais i Keller, 2009). Bibliografskom analizom 800 publikovanih saopštenja ustanovljeno je da model miša ima prioritet u istraživanjima i korišćen je čak u 85,8 % od ukupnog broja saopštenja, model pacova u 10,8 % i zamorca u 3,8 % saopštenja (Desoubeaux i Cray, 2017). Takođe, ustanovljeno je da je tri četvrtine modela miševa imalo imunokompromitovani imunski status.

Razvijena su najmanje tri pulmonalna modela aspergiloze na miševima. Prvi model je izazivanje sistemske (diseminovane) infekcije sa *A. fumigatus* kod

imunokompetentnih i imunokompromitovanih jedinki posle intravenske inokulacije konidija ove gljivice (Dixon i sar., 1989; Sarfati i sar., 2002; Stephens-Romero i sar., 2005; Sheppard i sar., 2006). Imunosupresija je izazvana prethodnom aplikacijom glikokortikosteroida ili ciklofosfamida. Ovi modeli imitiraju dve glavne rizične grupe ljudi za nastajanje aspergiloze. To je transplantacija kostne srži kod ljudi sa leukemijom i transplantacija parenhimatoznih organa (Marr i sar., 2002; Denning i sar., 2003; Latge, 2007;). Drugi plućni model aspergiloze kod miševa je izazivanje invazivne plućne aspergiloze (IPA) posle intranazalne ili intratrahealne inokulacije suspenzije konidija *A. fumigatus*, i to pre svega, kod imunosuprimiranih jedinki koji imitira bronhopneumoniju kod ljudi. Objavljeno je nekoliko modela inhalacije prouzrokača aspergiloze kao alternativa za intranazalnu infekciju. U poslednjoj deceniji razvijen je model aspergiloze centralnog nervnog sistema (CNS) kod pancitopeničnih miševa kojima su konidije inokulisane direktno intracerebralno. Ovaj model se koristi za ispitivanje efikasnosti antigljivičnih lekova i progresije aspergiloze (Chiller i sar., 2002; Clemons i Stevens, 2005). Centralni nervni sistem je često mesto hematogene diseminacije *Aspergillus* spp. iz respiratornog sistema, a stepen mortaliteta nastao posle ove infekcije kod ljudi je veći od 80% (Clemons i Stevens, 2005).

Model alergijske bronhopulmonalne aspergiloze (ABPA) kod miševa je poseban primer kada bolest nastaje posle preosetljivosti domaćina na alergene *Aspergillus* spp., a ne invazivne infekcije. Ovaj specifični model razvijen je i koristi se za patološka i imunološka - alergološka ispitivanja. Modeli miševa su takođe korišćeni za različita ispitivanja aspergiloze uključujući i komparativno ispitivanje stepena virulencije različitih izolata *Aspergillus*-a, identifikacije gena značajnih za stepen njihove virulencije, komparativno ispitivanje stepena osetljivosti na infekciju sa *Aspergillus* i predkliničko ispitivanje antigljivične efikasnosti lekova (Clemons i Stevens, 2005).

Takođe, više od jedne decenije povećano je korišćenje genetski deficijentnih modela miševa (Knockout - KO) jer su lako dostupni. U većini slučajeva miševi su deficijentni u jednoj vrsti citokina ili faktora imunskog odgovora. Upotreba ovih modela pokazala je da deficijencija IL-4 i IL-10 povećava otpornost miševa prema infekciji, dok deficijencija IL-6, IL-12 i interferona gama smanjuje njihovu otpornost (Clemons i Stevens, 2005). Postoje i modeli mutanata miševa kojima se oponaša humana hronična granulomatozna bolest, nasledni poremećaj prirodne osetljivosti na različite infekcije

uključujući i plućnu aspergilozu. Ovi mutanti imaju nedostatak produkcije enzima NADPH - oksidaze koji umanjuje oksidativni stres u fagocitnim ćelijama koje učestvuju u fagocitozi *Aspergillus*-a. Miševi sa mutacijom u genu gp91 ili gp47 u NADPH oksidazi mogu da budu inficirani intrapulmonalnom aplikacijom aspergilusa bez izazivanja imunosupresije (Clemons i Stevens, 2005).

2.5. Patogeneza aspergiloze

Respiratorni sistem je glavni put infekcije živine sa *A. fumigatus*. Živina se inficira inhalacijom konidija ove gljivice iz kontaminiranog vazduha ili hrane (Oglesbee, 1997; Fedde, 1998; Kunkle, 2003; Prukner–Radovčić i Mazija, 2006). Živina može da se inficira u svim uzrastima, mada je patogenost uzročnika za ćurke izraženija kod mlađih jedinki. Konidije – spore *Aspergillus fumigatus* značajno su manjeg prečnika u poređenju sa sporama drugih vrsta aspergilusa pa većina njih lako savladava odbrambene mehanizme prednjeg dela respiratornog sistema (Fedde, 1998; Nganpiep i Maina, 2002; Reese i sar., 2006; Beernaert i sar., 2010; Arne i sar., 2011; Olias i sar., 2011) pri čemu ih hidrofobni proteinski omotač štiti od odbrambenih snaga domaćina (Penalver i sar., 1996). Pored toga, spore *A. fumigatus* značajno više od drugih vrsta aspergilusa, imaju sposobnost adherencije za epitel vazdušnih puteva (Tronchin i sar., 1997; Bouchara i sar., 1997). Pored napred navedenog mali dijаметar aspergilusnih spora i anatomija respiratornog sistema omogućavaju disperziju patogena u skoro sve njegove segmente (Marić i Simonović, 2009), tako da su kliničke manifestacije aspergiloze rezultat stepena invadiranosti organizma, oštećenja tkiva i imunskog odgovora domaćina (Marr i sar., 2004). Veoma važan podatak iznose pojedini autori (Monod i sar., 1991; Monod i sar., 1993; Birich i sar., 1996; Reichard i sar., 1997) da u patogenezi bolesti značajnu ulogu imaju proteaze uzročnika koje suprimiraju imunski odgovor ili lediraju afektirano tkivo (Mullbacher i sar., 1985; Sutton i sar., 1994). Sutton i sar. (1996) pokazuju da sekundarni metaboliti plesni, pre svega, gliotoksin doprinose razvoju bolesti inhibirajući fagocitozu od strane neutrofila i makrofaga ili remeteći saradnju T i B limfocita. Konidije dospele u respiratorne puteve se zadržavaju na epitelu. Na ovim mestima stvaraju se čvorići ili granulomi promera nekoliko milimetara. U sredini su nekrotizovani i sadrže razgranate hife. Plesni

proliferišu unutar granuloma koji se povećava, a toksini i enzimi, koje proizvodi plesan, oštećuju tkivo. Nakon udisanja, spore se hematogeno brzo šire na ostala tkiva. Živina obolela od hroničnog oblika aspergiloze obično ima otežanu plućnu cirkulaciju koja za posledicu ima proširenje desne srčane komore i ascites (Cvetnić, 2002). Isti autor navodi da alergijski faktori, koji su dobro proučeni kod ljudi nisu dovoljno poznati kod životinja, te je njihova uloga u patogenezi bolesti nepoznata.

2.6. Klinička slika aspergiloze

Aspergiloza, ili kako je neki autori još nazivaju: mikotična pneumonija, pneumomikoza, pseudotuberkuloza i “asper“ mikoza je nekontagiozno sporadično gljivično oboljenje više vrsta živine, kaveznih i divljih ptica (Arne i sar., 2011). Napred navedeni termini za ovu bolest, prema navodima Chute i sar., (1975) i Kunkle (2003) odnose se samo na one slučajeve kada je inflamatorni proces situiran u plućnom tkivu, vazдушnim kesama, pa čak i na mukozi traheje. Oboljenje je ustanovljeno kod skoro svih vrsta, proizvodnih i starosnih kategorija živine: kod pilića u odgoju (Corkich, 1982; Steinlage i sar., 2003; Zafra i sar., 2008), roditelja brojlerskih pilića (Martin i sar., 2006), ćurića (Singh i sar., 2012; Olias i sar., 2010a; Arne i sar., 2011; Kureljušić i sar., 2011; Kureljušić i sar., 2012), pačića u odgoju (Beytut i sar., 2007) i guščića (Beytut i sar., 2004).

Zdrava živina obično ne oboljeva, iako je izložena uticaju visoke koncentracije konidija *A. fumigatus* (Kapetanov i sar., 2011). Neki praktičari iz živinarske proizvodnje smatraju da je aspergiloza kod živine indukovana stresom, odnosno imunosupresijom (Tell, 2005). Eksperimentalno je dokazano da su pilići i ćurići do tri dana starosti veoma osetljivi na infekciju, dok su stariji znatno otporniji (Islam i sar., 2005). Nadalje, ustanovljena je i značajna razlika između stepena morbiditeta i mortaliteta kod jedinki različitih proizvodnih kategorija. Tako, najviši mortalitet zabeležen je kod petlića (9,03%), manji kod brojlerskih pilića (5,48%), a najmanji kod nosilja (1,92%) (Islam i sar., 2005).

Klinička ekprimacija akutne aspergiloze kod živine varira od jata do jata, od sezone do sezone i od godine do godine. U našim uslovima incidenca akutne aspergiloze kod brojlerskih pilića je veća u odnosu na period od pre deset godina

(Kapetanov i sar., 2011). Kao predisponirajući faktori za nastanak aspergiloze, pre svega, kod mladih kategorija spominju se: povećana kontaminacija vazduha i krmne smeše konidijama *A. fumigatus*, visoka ambijentalna temperatura, nizak procenat vlage ambijentalnog vazduha, loša ventilacija, ne sprovođenje sanitarno-higijenskih mera i neadekvatno skladištenje kompletne krmne smeše za ishranu živine (Oglesbee, 1997; Tell, 2005; Khosravi i sar., 2012). Takođe, pad imuniteta nastao tokom dugotrajne upotrebe antibiotika i glikokortikoida, česte vakcinacije, neadekvatna ishrana, prenaseljenost, kontinuirani stres, metabolička, bakterijska i virusna oboljenja, toksikoze, upotreba drvene strugotine za prostirku, povećana reproduktivna aktivnost i dr. mogu da doprinesu nastanku infekcije (McMillan i Petrak, 1989; Barton i sar., 1992; Isobe i Lilleho, 1992; Oglesbee, 1997; Verstappen i Dorrestein, 2005; Beernaert i sar., 2010).

Živina se inficira inhalacijom konidija *A. fumigatus* dospelih u vazduh iz prostirke ili hrane, a izleženi ćurici ili pilići inhalacijom konidija iz kontaminiranih inkubatora ili penetracijom konidija kroz ljusku jajeta (Jezdimirović i sar., 2013).

Klinički simptomi aspergiloze, pre svega, zavise od toga da li je infekcija lokalna ili generalizovana, odnosno od infekcijom zahvaćenog organa ili organskog sistema. Međutim, intenzitet kliničkih manifestacija aspergiloze kod ćurica i pilića zavisi od veličine infektivne doze, imunskog statusa i starosti jedinki (Dahlhausen i sar., 2006). Ustanovljena su dva klinička toka aspergiloze - akutni i hronični. Pretpostavlja se da je akutna aspergiloza posledica udisanja velikog broja konidija, a hronični oblik ovog oboljenja je posledica imunosupresije. Širom sveta je zabeleženo nekoliko oblika aspergiloze: kožni, nervni, očni, nazalni i visceralno-pneumonični - pluća i vazdušne kese (Tsai i sar., 1992; Islam i sar., 2005).

Akutni tok aspergiloze, koji traje svega nekoliko dana, pored opštih simptoma (inapetencija, somnolencija, nakostrešenost perja, skupljanje životinja na mestima gde je dotok svežeg vazduha, žeđ, dijareja, svrab kože sa intenzivnim kljućanjem, promenjen glas do njegovog potpunog gubitka) karakterišu i ozbiljni respiratorni simptomi - tahipneja i dispneja (Islam i sar., 2005; Stoute i sar., 2009; Beernaert i sar., 2010; Arne i sar., 2011). Ponekad se uočavaju i promene na očima, vodenasti iscedak iz očiju sa posledičnim blefarospazmom, fotofobijom, periorbitalnim edemom i zamućenjem korneje (Hope i sar., 2009; Beernaert, 2010). Takođe, kod ćurica i brojerskih pilića

opisani su neurološki simptomi (poremećaj ravnoteže, tortikolis, veslanje nogama, konvulzije, paraliza, a kod pilića epidermalne ciste na grudnom delu kože i krestama) (Akan i sar., 2002).

Kod pilića i ćurića inficiranih *in vivo* ili za vreme izleganja, aspergiloza je visoko smrtna u prvih 10 dana života, a praćena je omfalitisom i ozbiljnim respiratornim poremećajima. Omfalitis obično nastaje od 3. do 9. dana starosti pilića i ćurića. Ovo oboljenje je poznato pod imenom „Brooder“ pneumonija (Kunkle, 2003). Istraživač Cortes i sar. (2005) opisuje dve epidemije omfalitisa kod mladih ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*. Kod akutnog toka aspergiloze uginuće nastaje unutar 24 do 48 sati od infekcije sa mortalitetom od 50 - 90% (Dhama i sar., 2013).

U hroničnom toku, koji se sreće kod odraslih jedinki bolest protiče sporadično, a takođe mogu da se konstatuju respiratorne smetnje (Dhama i sar., 2013).

2.7. Patomorfološke promene

Kod većine vrsta živine primarna mesta razvoja patomorfološkog supstrata su niži delovi respiratornog sistema. Tako, tipično za invazivnu aspergilozu je nalaz beličastog mukoidnog eksudata u respiratornom sistemu, upadljiva kongestija pluća, zadebljanje membrana vazdušnih kesica i nalaz milijarnih nodula sa rastom gljivica, najčešće u kaudalnoj, torakalnoj i abdominalnoj vazdušnoj kesi, kao i spoljašnjoj površini pluća (Keymer, 1982).

Kod hronične aspergiloze makroskopski se uočava više gljivičnih čvorića koji se stapaju u veća granulomatozna oštećenja u čijem centru leže gljivični elementi (Pal i sar., 1988; Richard, 1997). Patološki supstrat može da bude situiran, osim na plućima i u vazdušnim kesama (najčešće pogođeni), na slezini, mozgu, očima i potkožnom tkivu. Makroskopski u plućnom tkivu i vazdušnim kesama nalaze se multipli žućkasti ili sivo - beli čvorići veličine zrna prosa do lešnika, a i veći. Na njihovoj površini uočavaju se sivkaste radijalne pruge što se histološki verifikuje kao radijalni rast plesni. Međutim, kod starijih čvorića centralno se nalazi kazeifikujući proces. Već 12 sati nakon intratrahealne inokulacije spora može se uočiti eozinofilna infiltracija plućnog tkiva, a tokom tri dana od inficiranja reaktivno bujanje epiteloidnih ćelija, fibroblasta i angioblasta (Schiefer, 1967).

Slične patomorfološke promene opisuju Knežević i Matejić (1996) kod pilića starih 8 do 10 dana. Ovi autori nalaze hepatizovane delove plućnog parenhima, najčešće na zadnjim delovima u kojima su prisutni aspergilozni noduli. Prema nalazima ovih autora, granulomatozne promene počinju pojavom homogenog eozinofilnog centra oko kojeg se nalaze multijedarne ćelije. Kod starijih čvorića ustanovljen je potpuno nekrotizovan centar oko kojeg se na periferiji nalaze gljivice, a zatim fibroblasti, histiociti, limfociti i kolagena vlakna. Hife gljivica se nalaze i u krvnim sudovima (Ozmen i Dorrestein, 2004).

Julian i Goryo (1990) su na 190 jednodnevnih komercijalnih pilića, smeštenih na dubokoj prostirci koja je tri nedelje pre naseljavanja kontaminirana sporama *A. fumigatus*, izučavali značaj plućne hipertenzije kod plućne aspergiloze i slabost desnog srca u otkrivanju etiologije ascitesa. Pilići sa vrlo izraženim disajnim sindromom uginuli su pre 15. dana starosti, a makroskopskim pregledom ustanovljena su tamna pluća i tvrda konzistencija. Međutim, kod pilića uginulih od slabosti desnog srca i ascitesa posle 15 dana nalaze se jako kongestirana pluća. Histološki primarno oštećena pluća očitana su kao akutna do subakutna fibrinozna bronhopneumonija. Rezultati ovog ispitivanja pokazuju da je 85% parabronha opturirano fibrinom i nekrotičnim detritusom ili granulomima. U tim žarištima nalaze se i aspergilusi. U kongestiranom plućnom tkivu uočavaju se bogati inflamatorni infiltrati. Pored uobičajenih ćelijskih elemenata, autori ističu i postojanje fibroblasta koji su komprimirali vazdušne, a odvojili krvne kapilare.

Na osnovu nalaza može da se zaključi da infekcija, koja uzrokuje akutnu fibrinoznu pneumoniju blokira tercijarne bronhe ili sprečava razvitak vazdušnih kapilara i može da prouzrokuje plućnu hipertenziju, kao i infekcije koje dovode do fibroplazije u intersticijalnom tkivu ili oštećenja plućnih kapilara. Autori zaključuju da gljivična pneumonija može da uzrokuje ascites usled slabosti desnog srca.

U jednom ispitivanju praćene su patološke promene kod ćurića starih 9 i 19 nedelja posle 24, 48, 72 i 96 sati od inokulacije konidija *A. fumigatus* (konc. 5×10^7) u vazdušne kese (Kunkle i Rimler, 1996). U obe grupe ćurića uočene lezije su ograničene na membranama vazdušnih kesa i plućno tkivo, u obliku fulminantnog zapaljenja. Slične promene zapažene su posle 24 i 96 sati od inokulacije *A. fumigatus*. Tipična slika posle 24 sata od inokulacije karakteriše se nakupljanjem epiteloidnih ćelija i

perivaskularnim infiltratima limfocita. Zbog jake inflamatorne reakcije, delovi gljivica nisu dokazivani u mnogim tkivnim presecima, a ako su bili obično su ih sadržavali fagociti i nekrotična područja. Uglavnom su nalaženi u citoplazmi epiteloidnih ćelija i multijedarnih džinovskih ćelija. Prema istraživanjima navedenih autora uočena oštećenja brzo su napredovala, tako da su granulomatozne pneumonije sa nekrozom nađene već 72 časa od inokulacije. Na kraju, autori zaključuju da se konidije sa mesta inokulacije prenose hematogeno ili limfogeno u subepitelni prostor tokom 24 sata od unošenja, i da je u početku zahvaćen intersticijum membrane vazdušne kese, a ne njena površina.

2.8. Serološka dijagnostika

Serološka dijagnostika za detekciju antitela na antigene *A. fumigatus* može biti od velike pomoći u otkrivanju dva oblika aspergiloze (aspergilom i alergijska bronhopulmonalna aspergiloza - ABPA) kod imunokompetentnih osoba. Iako je rast gljivica u tkivima pacijenata ograničen kod oba oblika oboljenja, često je snažan humoralni imunski odgovor na prisutni antigen (Kurup i Kumar, 1991; Latge, 2005). Razvijeno je više od dvadeset dijagnostičkih procedura za detekciju antitela protiv aspergilusa, a u kliničkim laboratorijama najčešće se koriste imunodifuzija i imunoelektroforeza (Hearn, 1992). Obe metode su jednostavne, lako izvodljive, jeftine i dovoljno osetljive da stvarno onemogućе lažno pozitivne rezultate koji su posledica niskih nivoa antitela (Latge, 2007). Obe procedure se zasnivaju na otkriću dve glavne precipitirajuće supstance, katalazi i dipeptidil-peptidazi. Primarni nedostaci ovih metoda su nemogućnost kvantifikovanja imunskog odgovora i nedostatak standardizacije zbog upotrebe neobrađenog ekstrakta aspergilusa (Hearn, 1992). Kasnije su objavljeni rezultati korišćenja immunoeseja koji je prečišćen biohemijskim procedurama (Moser i sar., 1994). Danas je moguće koristiti molekularno - biološke tehnike za proizvodnju čistog antigena. Tako, proteini *A. fumigatus* su proizvedeni u *E. coli* i *Pichia pastoris* (Moser i sar., 1992; Moser i sar., 1994). Ovakvi antigeni služe kao osnova za razvoj ELISA metode koja omogućava kvantifikaciju antitela (Kobayashi i sar., 1993; Latge i sar., 2005). U poslednje vreme u dijagnostici se koriste i imunofluorescentna tehnika

kao i dokazivanje antitela na rekombinantne antigene 18-kDa Aspf1, Aspf2, Aspf4 (Bernard i Latge, 2001).

2.9. Eksperimentalna infekcija ptica sa *A. fumigatus*

Primarni prouzročivač aspergiloze kod ptica je *A. fumigatus*. Često je udružen sa drugim vrstama aspergilusa, bakterijama i virusima u izazivanju akutnog i subakutnog oblika ovog oboljenja.

Ptice imaju jedinstvenu anatomsku građu i fiziološke funkcije respiratornog sistema (Fedde, 1998) u odnosu na sisare, zbog čega su nezamenljiv model za ispitivanje patogeneze, histopatologije i terapije aspergiloze kod njih, jer je oboljenje globalni problem u živinarstvu.

Izazivanje veštačke infekcije sa *A. fumigatus* kod ptica je koristan *in vivo* model za proučavanje interakcije između domaćina i patogena i procenu validnosti različitih kontrolnih metoda za dokazivanje prisustva prouzročivača. Zavisno od cilja ispitivanja mogu da se koriste više akutnih ili hroničnih modela. Model hronične infekcije je pogodniji za izučavanje efikasnosti antimikotičkih lekova, dok je model akutne eksperimentalne infekcije svrsishodniji za otkrivanje postojanja razlika od oboljenja zavisno od stepena virulencije između različitih sojeva *A. fumigatus* i težine kliničke slike.

Eksperimentalna infekcija sa *A. fumigatus* izvedena je na pilićima, ćurićima, prepelicama, golubovima, čvorcima i sokolovima različite starosti, počev od jednog dana života pa do osamnaest nedelja. Ptice su inficirane unošenjem suspenzije sa različitom koncentracijom konidija *A. fumigatus* (dobijene od izolata inficiranih i klinički obolelih ptica ili referentnih sojeva) različitim načinima aplikacije u cilju dobijanja modela sa akutnim ili hroničnim oblikom aspergiloze (Julian i Goryo, 1990; Kunkle i Rimler, 1996; Clemons i Stevens, 2005; Femenia i sar., 2007; Beernaert i sar., 2008; Beernaert i sar., 2010; Arne i sar., 2011).

Veštačka infekcija je izazivana inokulacijom spora *A. fumigatus* putem aerosol i parenteralno u respiratorne organe. Inokulacija spora je obavljena nebulizacijom u vidu suvog i vlažnog aerosola u ukupnoj koncentraciji od 5 do 500 mg, i koncentraciji od $5,18 \times 10^9$ u suvom aerosolu; intratrahealno ($1,35 \times 10^6$ do $1,2 \times 10^8$ po ptici);

intrapulmonalno (10^8), direktnom injekcionom aplikacijom u torakalnu i abdominalnu vazdušnu kesu ($1,35 \times 10^6$ do 10^8) i intravenski, najčešće kod jedne iste vrste ptica kako bi se odabrao najpodesniji način aplikacije inokuluma spora za izazivanje aspergiloze, i to kako kod imunokompetentnih, tako i kod imunosuprimiranih jedinki (Taylor i Burroughs, 1973; Van Cutsem, 1983; Julian i Goryo, 1990; Femenia i sar., 2007; Beernaert i sar., 2008; Arne i sar., 2011). Eksperimentalna aspergiloza je prouzrokovana kod jednodnevnih ćurića aplikacijom soja CBS 144.89 (prethodno izolovan iz ljudi obolelih od invazivne aspergiloze), u desnu kaudalnu torakalnu vazdušnu kesu u koncentraciji od 10^7 konidija po jedinki, a u cilju procene kliničkih, mikoloških i patoloških nalaza (Femenia i sar., 2007). Ova koncentracija nije prouzrokovala uginuće. Cilj injekcione aplikacije konidija *A. fumigatus* u traheju, pluća, vazdušne kese i venske krvne sudove je izazivanje primarnog oboljenja respiratornog sistema (Beernaert i sar., 2008; Arne i sar., 2011). Ovim načinima aplikacije inokuliše se definisan broj konidija koji je isti za svaku jedinku čime se postiže isti intenzitet patoloških promena. Međutim, svim navedenim putevima aplikacije, manje ili više, zaobilazi se važan deo gornjih disajnih puteva i njihovih udruženih mehanizama odbrane, posebno ako se inokulum aplikuje u torakalnu ili abdominalnu vazdušnu kesu (Fedde, 1998).

Aplikacijom inokuluma u vazdušnu kesu generalno se postižu ograničene lezije na lateralnim delovima pluća i vazdušnoj kesi. Međutim, promene su uglavnom u skladu sa onim koje se viđaju kod zapaljenja vazdušnih kesa i pneumonije (Kunkle, 1996; Richard i Sacco, 1998).

Veštačka infekcija prouzrokovana nebulizacijom konidija aspergilusa ima za cilj da imitira prirodne uslove kontaminacije, ali zahteva strogu standardizaciju ove procedure. Faktori koji značajno mogu da utiču na ovaj način infekcije su: vreme izlaganja živine uticaju konidija (od 5 do 60 min.), zapremina komore nebulizatora, koncentracija konidija i izvođenje inokulacije (Klimes i Severa, 1964; Taylor i Burroughs, 1973; Richard, 1981; Van Custem, 1983; Arne i sar., 2011).

Nebulizacija pulverizovanih (suvih) konidija, u poređenju sa vlažnim aerosolom dala je bolje rezultate u pogledu procene stepena morbiditeta i mortaliteta. Nedostatak primene vlažnog aerosola je u veličini kapljica u kojima su suspendovane konidije *A. fumigatus* (Klimes i Severa, 1964), a pulverizovanog aerosola u nepreciznom doziranju i delikatnom rukovanju. Infekcija izazvana aerosolom obezbeđuje prisustvo velikog

broja konidija u plućima čiji se broj izražava na masu pluća (gram) mereno neposredno posle izlaganja. Unošenje konidija u pluća u koncentraciji od 5×10^5 na gram prouzrokuje uginuće kod 50% inficiranih ćurića starosti tri nedelje (Richard i sar., 1981), a koncentracija od 3×10^4 /g ne dovodi do uginuća jednodnevnih pilića neposredno posle njihovog izlaganja (Taylor i Burroughs, 1973).

Eksperimentalna imunosupresija se koristi u cilju izazivanja aspergiloze kod manje osetljivih vrsta ili da smanji razlike u odgovoru ptica na infekciju sa *Aspergillus* spp. Protokol izazivanja imunosupresije obuhvata parenteralnu višednevnu aplikaciju imunosupresivnih supstanci (deksametazon, ciklofosamid) pre infekcije. Najčešće je primenjivan deksametazon u dozi od 2 do 5 mg/kg, intramuskularno tokom tri dana kod golubova (Beernaert i sar., 2008), brojerskih pilića (Corkier i De Loach., 1990) i ćurića (Le Loch i sar., 2006). Genotipizacija izolata iz unutrašnjih organa inficiranih jedinki obezbeđuje proveru i dokaz da je eksperimentalna infekcija posledica datog inokuluma tog soja *A. fumigatus* (Beernaert i sar., 2008).

U većini slučajeva eksperimentalna aspergiloza je hiperakutna infekcija dobijena jednokratnim unošenjem veoma visokih koncentracija konidija aspergilusa, te mortalitet i morbiditet nastaju obično između jednog i četrnaestog dana od infekcije (Ghori i Edgar, 1979; Richard i sar., 1981; Chaudhary i Sadana, 1988; Peden i Rhoades, 1992; Kunkle i Rimler, 1996; Arne i sar., 2011). Ako jedinke prežive akutno izlaganje utičaju konidija aspergilusa sedam dana posle njihove inokulacije mogu da se razviju hronične lezije (Faublee i Boller, 1975).

Ovi eksperimentalni modeli prikazuju pulmonalnu aspergilozu sa kliničkim simptomima i unutrašnjim lezijama. U ovim modelima, kao i onim sa inhalacijom konidija opisane su obimne intraokularne promene i neurološki simptomi koji su u vezi sa granulomima mozga (Faublee i Boller, 1975).

2.10. Eksperimentalna primena deksametazona kod ptica

Glikokortikoid kortizol intenzivno se produkuje i oslobađa uglavnom iz slojeva unutrašnje zone kore nadbubrežnih žlezda (zona fascikulata i retikularis) pod uticajem adrenokortikotropnog hormona (ACTH) koji se pod normalnim uslovima oslobađa u fiziološkim koncentracijama iz adenohipofize, a tokom stresa u znatno većim

koncentracijama (Ferguson i Hoenig, 2001). Koncentracija kortizola u cirkulaciji se naglo povećava tokom stresa i ona je marker za procenu intenziteta stresne reakcije (Hardy i sar., 2005).

Model ponavljane primene deksametazona, sintetskog derivata kortizola, ima za cilj da izazove stres i/ili imunosupresiju kod ćurića i pilića čime se povećava osetljivost organizma na oportunističke bakterijske i gljivične infekcije (Huff i sar., 2001).

Imunosupresija izazvana deksametazonom se koristi u eksperimentalnim ispitivanjima kod ptica da bi se prouzrokovala aspergiloza kod manje osetljivih vrsta, ili da se smanje razlike u odgovoru na infekciju između obolelih jedinki. Protokol se zasniva na ponavljanoj parenteralnoj aplikaciji deksametazona ili betametazona svakodnevno tokom tri do sedam uzastopnih dana, ili trokratno sa razmakom od dva dana u dozama od 2 do 5 mg/kg telesne mase (Arne i sar., 2011). Deksametazon ima više farmakoloških dejstava od kojih su najvažnija antiinflamatorno i imunosupresivno. Takođe, ovaj glikokortikoid prouzrokuje smanjenje ukupnog broja T limfocita, stvaranje limfokina i interferona (Isobe i Lillehoj, 1992). Glikokortikoidi deprimiraju razvoj i rast skeletnih mišića pilića, smanjuju apetit, unos hrane i telesnu masu (Dong i sar., 2007) tako što inhibiraju sintezu proteina i povećavaju njihov katabolizam. Sedmodnevna s.c primena deksametazona u dozi od 2 mg/kg kod pilića ne utiče na koncentraciju glukoze i ukupnu koncentraciju aminokiselina u krvi, ali značajno povećava koncentraciju insulina i urata (Song i sar., 2011).

Deksametazon primenjivan kod brojlerskih pilića u hrani tokom tri nedelje u dozama od 1, 2, 3, 4 i 6 mg/kg prouzrokuje primarnu heterofiliju izazivajući povećano oslobađanje heterofila iz kostne srži u cirkulaciju. Ovo povećanje je dozno i vremenski zavisno (duža - sedmodnevna primena deksametazona prouzrokuje značajnu heterofiliju u odnosu na kraće vreme - dvodnevna primena). Ovo povećanje broja heterofila se smanjuje i dostiže fiziološke vrednosti posle dve do tri nedelje od poslednje aplikacije deksametazona. Odnos heterofila/limfocita kod brojlerskih pilića je značajno povećan posle primene deksametazona. Povećan odnos heterofila/limfocita bio je izraženiji neposredno po završetku primene deksametazona u odnosu na sam početak tretmana, kao i sedam i četrnaest dana od obustavljanja primene hrane sa lekom (Aengwanich, 2007).

2.10.1. Mehanizam inflamatorne i imunske reakcije ogranzima

Inflamatorna reakcija je primarni odbrambeni odgovor domaćina na oštećenje tkiva ili infekciju koja je neophodna za obnavljanje homeostaze posle uspešne eliminacije štetnih agenasa i reparacije tkiva (Coutinho i Chapman, 2011).

Inflamacija može da bude akutna i hronična. Zapaljenje započinje na mestu oštećenja, pre svega ćelija mastocita i makrofaga koje oslobađaju proinflamatorne medijatore kao što su: bioaktivni amini, medijatori metabolizma lipida i citokini, uglavnom faktor nekroze tumora (TNF- α) i interleukin-1 (IL-1). Oni prouzrokuju vazodilataciju, povećanu permeabilnost kapilara (humoralni odgovor) i migraciju leukocita u povređena tkiva (ćelijski odgovor) što za posledicu ima stvaranje osećaja bola, povećanje toplote, nastajanje crvenila i otoka, kao i hemotaksičnih mehanizama koji pokreću aktivnost ćelija na mesto oštećenja (Hotamisligil, 2006; Knežević i Jovanović, 2008).

Ovo akutno zapaljenje je pozitivan odgovor, jer brzo eliminiše patogene i obično ne dovodi do oštećenja okolnih tkiva i ćelija. Nasuprot tome, hronično zapaljenje može da bude štetno za normalno funkcionisanje organizma domaćina, i može da prouzrokuje oštećenja tkiva i ćelija (Hotamisligil, 2006).

Odgovor akutne faze zapaljenja je sastavni deo ranog urođenog imunskog odgovora koji se takođe sastoji od fizičkih barijera, fagocita, komplementa i toll-like (TL) receptora (Kaneko, 1997; Cray i sar., 2009; Cray, 2015). Odgovor akutne faze zapaljenja je kompleksan sistemski inflamatorni proces koji počinje sa lokalnom stimulacijom i odgovorom na oštećenje ili infekciju, a nastavlja se produkcijom brojnih citokina koji se stvaraju u makrofagima, monocitima, leukocitima, endotelnim, epitelnim i adipoznim ćelijama, fibroblastima i tumorskim ćelijama. Neki od nastalih citokina šalju signal jetri da započne ili poveća sintezu proteina akutne faze. Procenjuje se da tokom akutnog inflamatornog odgovora može da se produkuje više od 200 proteina akutne faze (Kaneko, 1997). Svaki protein akutne faze ima jedinstvenu biološku funkciju, počev od toga da kao opsonin aktivira komplement i povećava fagocitozu (C reaktivni protein-CRP), pojačava hemotaksu i pomaže reparaciju tkiva (amiloid A iz seruma) do toga da se vezuje za hemoglobin da bi mu smanjio oksidativnu aktivnost (haptoglobin - HP) (Cray, 2011; O'Reilly i Eckersall, 2014).

Tokom razvoja odgovora akutne faze funkcija proteina akutne faze može da se povećava ili smanjuje (Cray i sar., 2009a; Cray, 2011). Glavni proteini akutne faze mogu da se povećaju 10 do 1000 puta, dok su kod zdravih životinja prisutni u zanemarljivim koncentracijama. Povećanje nastupa brzo, često u toku 24 h. Kada nastane odgovarajući odgovor na inflamatorni stimulus, smanjenje koncentracije proteina akutne faze može da bude jednako brzo zbog dobro izraženog sistema negativne povratne sprege i kratkog biološkog poluživota. Kod pasa, mačaka i velikih životinja amiloid A i CRP su glavni proteini akutne faze. Niske ili umerene koncentracije proteina akutne faze su često prisutne kod zdravih životinja. Ustanovljeno umereno povećanje koncentracije proteina akutne faze može da se poveća 2 do 10 puta, a niske koncentracije povećaju se za manje od dva puta. Ispoljavanje povećanja koncentracije proteina akutne faze (amiloid A i CRP) može da bude odloženo - posle 4 do 6 dana od inzulta, a povećane koncentracije mogu da se održavaju i po prestanku zapaljenja. Haptoglobin se često nalazi u niskim koncentracijama kod većine vrsta životinja.

Ispitivanje koncentracija proteina akutne faze zapaljenja izazvane inflamatornom supstancom (gvožđe) obavljeno je kod pilića (Chamanza i sar., 1999; Chamanza i sar., 1999a). Ustanovljene su značajne promene koncentracija serumskog amiloida A (SAA), transferina, antiinflamatornog proteina analoga haptoglobina (PIT-54) i alfa-1 kiselog proteina samo kod ptica (Wicher i Fries, 2010; Cray, 2015).

Imunski sistem čine urođeni i stečeni imunitet. Urođeni imunitet obezbeđuje početni, nespecifični odgovor na dejstvo patogena. Komponente koje čine urođeni imunski odgovor su leukociti, citokini, eikosanoidi, kao i neimunske ćelije: epitelne i endotelne (Coutinho i Chapman, 2010).

Stečeni imunitet je više specifičan odgovor koji se aktivira kada infektivni agens nije eliminisan putem urođenog imunskog odgovora. Ako životinja stupa u kontakt sa bilo kojim patogenom ponovo, imunska memorija će proizvesti brži i jači imunski odgovor nego onaj koji se dogodio tokom prvog susreta (Janeway i sar., 2005).

2.10.2. Mehanizam delovanja glikokortikoida

Glikokortikoidi se koriste da smanje broj ćelija i aktivnost imunskog sistema. Ovaj supresivni efekat glikokortikoidi uglavnom ispoljavaju na ćelije imunske odbrane u odnosu na humoralni imunitet. Umereno visoke doze glikokortikoida ne utiču na stvaranje antitela, a visoke doze i duga primena inhibišu njihovu produkciju. Glikokortikoidi prouzrokuju limfopeniju i eozinopeniju, njihovu redistribuciju i/ili lizu, i umanjuju funkcionalnu sposobnost monocita, makrofaga i eozinofila inhibišući stvaranje interleukina (IL), kao što su: IL-1 (makrofagi), IL-2 (limfociti), IL-3 i IL-6 i druge hemotaktičke faktore (Ferguson i Hoenig, 2001). Glikokortikoidi mogu da prouzrokuju apoptozu normalnih limfoidnih ćelija, ali i malignih.

Mehanizam dejstva glikokortikoida je povezan sa glikokortikoidnim receptorom (GR), koji je vezan za „stresne proteine“ Hsp90 i Hsp70 u citoplazmi ćelije. Kortikoidi difunduju kroz ćelijske membrane u citoplazmu gde se vezuju za GR što za posledicu ima oslobađanje receptora iz veze sa stresnim proteinima. Glikokortikoidni receptor se translocira u jedru gde se, posredstvom DNK veznih domena vezuje na tzv. elemente koji reaguju na kortikoide (engl. glucocorticoid response element-GRE) koji su povezani sa ciljnim genima. U zavisnosti od podtipa glikokortikoidnog receptora i smeštaju GRE, kompleks ligand - glikokortikoidni receptor može da stimuliše ili inhibira ekspresiju gena (primer antiinflamatorno delovanje glikokortikoida). Kompleks ligand - GR koči aktivnost antiinflamatornih činitelja transkripcije koji se nalaze u kompleksu sa hromatinskim kompleksom koji sadrži histonske acetiltransferaze. Kompleks ligand - GR prouzrokuje razdvajanje tog koaktivacijskog kompleksa i stvaranje kompleksa koji sadrži histonske deacetilaze, što za posledicu ima kondenzaciju hromatina i kočenje transkripcije. Kompleks glikokortikoid - GR inhibira funkciju aktivacijskog proteina transkripcije (AP-1). Aktivacijski protein transkripcije indukuje nekoliko gena odgovornih za aktivnost kolagenaze, interleukina (IL-2, IL-2R) i ciklooksigenaze (COX 2) (Ferguson i Hoening, 2001).

Antiinflamatorni efekat glikokortikoida nastaje kao posledica ili njihovog direktnog vezivanja za glikokortikoid/glikokortikoid receptorski kompleks (GRE) povezan sa ciljnim genima, ili stupanjem kompleksa u interakciju sa drugim transkripcionim faktorima, posebno aktivacijskog proteina-1 ili jedarnog faktora kapa

B. Glikokortikoidi inhibiraju zapaljenje koje nastaje kao posledica produkcije citokina, hemokina, metabolita arahidonske kiseline i adhezivnih molekula. Oni inhibišu oslobađanje arahidonske kiseline i trombocitnog aktivirajućeg faktora (PAF) iz pluća i makrofaga povećavajući stvaranje proteina lipokortina koji inhibira enzim fosfolipazu A2 u membrani ćelije. Na ovaj način se sprečava produkcija prostaglandina, leukotrijena i PAF-a. Glikokortikoidi mogu da spreče i aktivnost fosfolipaze C. Ovi lekovi održavaju mikrocirkulaciju i integritet ćelijske membrane, a stabilizacijom lizosomalnih membrana sprečavaju oštećenje ćelija i tkiva. Glikokortikoidi smanjuju stvaranje i oslobađanje histamina iz oštećenih ćelija (Aron i Tyrrell, 1994).

Ovi lekovi inhibišu rane manifestacije zapaljenja (crvenilo, toplota, bol, otok: smanjen inluks i aktivnost leukocita) i kasne (zarastanje rana i proliferativna reakcija: smanjena aktivnost mononuklearnih ćelija, smanjena angiogeneza i manje fibroze). Na limfoidno tkivo, glikokortikoidi deluju tako što smanjuju klonalnu ekspanziju T i B ćelija i smanjuju stvaranje citokina od strane T ćelija.

Glikokortikoidi imaju uticaj na sve formirane elemente krvi. Povećavaju broj eritrocita i sadržaj hemoglobina, kao i broj trombocita. Povećavaju broj neutrofila, ali smanjuju njihovo prisustvo na mestu zapaljenja. Glikokortikoidi smanjuju broj monocita, eozinofila i bazofila. Smanjuju broj cirkulišućih limfocita (T>B) tokom 6 h. Inhibišu funkciju makrofaga: blokiraju stvaranje prostanoida, leukotriena, proinflamatornih citokina i PAF-a.

Deksametazon primenjivan u hrani brojlera u dozi od 1, 2 i 6 mg/kg prouzrokuje limfopeniju, heterofiliju, limfocitozu i povećava odnos heterofila i limfocita (Gross i Siegel, 1983; Puvadolpirod i Thaxton, 2000), i ukupan broj leukocita, koncentraciju hemoglobina, telesnu temperaturu i frekvencu disanja (Aengwanich, 2007). Deksametazon povećava koncentraciju hemoglobina i volumen eritrocita.

2.11. Ispitivanje kožne bazofilne preosetljivosti (*Cutaneous Basophil Hypersensitivity* – CBH) izazvane fitohemaglutininom (PHA) kod živine

Kožna reakcija preosetljivosti široko se primenjuje kao test indikator promena u ćelijskom imunskom odgovoru tokom izlaganja živine raznim stresorima (Lazarević i sar., 2000). Stepen reakcije zavisi od primenjenog stresora i trajanja izloženosti (Ecker i sar., 1995). Većina imunologa je mišljenja da edem kože prouzrokovan fitohemaglutininom (PHA) nije isključivo posredovan preosetljivošću izazvanom T limfocitima, već je posledica kožne bazofilne preosetljivosti (CBH) (McCorkle i sar., 1980). Ova tvrdnja je potkrepljena analizom edema kože čije nastajanje prolazi kroz dve različite faze posle inokulacije PHA kod živine. Prva faza u nastajanju edema na mestu aplikacije je eksudacija plazme iz okolnih krvnih sudova i ona nastaje posle 6 do 12 h od aplikacije. Posledica je oslobađanja urođenih lokalnih populacija ćelija (uglavnom bazofila i makrofaga) koje aktiviraju PHA stimulisane CD4 i T limfocitne ćelije (Elgert, 1996). Druga faza nastanka edema kože obuhvata infiltraciju naknadno oslobođenih T limfocita osetljivih na PHA. Ona nastaje posle 24 h od aplikacije PHA (Stadercker i sar., 1977; McCorkle i sar., 1980). Na osnovu ovih podataka može da se zaključi da su aktivirane T ćelije uključene u nastajanje edema kože.

Kožna bazofilna hipersenzitivnost izazvana intradermalnom aplikacijom PHA je korisna metoda za procenu ćelijskog imunskog odgovora u uslovima *in vivo* kod pilića i ćurića (Stadercker i sar., 1977; Goto i sar., 1978; Regnier i Kelly, 1981; Edelman i sar., 1986; Murray i sar., 1987; Brake i sar. 1988; Miljković i sar., 2007). Kožna bazofilna preosetljivost može da se izazove kod pilića aplikacijom PHA u kožu grudnog koša (Sinha i sar., 1988), u kožu u okolini uha i podbradnjaka (Stadercker i sar., 1977), krilni kožni nabor (Lamont i Smyth, 1984; Cheng i Lamont, 1988; Parmentier i sar, 1993) i u drugim uobičajenim mestima na koži (Goto i sar., 1978; Edelman i sar., 1986; Brake i sar. 1988). Ipak, intradermalna aplikacija PHA i merenje odgovora reakcije teško su izvodljivi ako se PHA aplikuje u nedovoljno razvijenu kožu krila kod pilića i ćurića mlađih od dve nedelje (Rose, 1977), i u neobraslim delovima kože pilića koji su isuviše tanki za adekvatnu primenu (Stadercker i sar., 1977). Kožna bazofilna ćelijski posredovana odložena preosetljivost izazvana aplikacijom PHA u kožu između 3. i 4. nožnog prsta kod brojlera starosti od 3 do 31 dana posebno je korisna i jednostavna *in*

vivo skrining metoda za procenu ćelijski posredovanog imunskog odgovora i otkrivanje smanjene aktivnosti T limfocita (Stadercker i sar., 1977; Corkier i De Loach, 1990). Odgovor na intradermalnu aplikaciju PHA manifestovan edemom može da se čita posle 6 do 48 h od aplikacije. Vreme ispoljavanja maksimalane infiltracije kože varira zavisno od reakcije različitog tipa ćelija (Martin i sar., 2006).

Edemi kože su pokazatelji ćelijski posredovane imunokompetentnosti i procenjivani su na osnovu četiri vrste zapažanja kod domaćih životinja: a) infiltracije leukocitima i/ili proliferacije na injekcionom mestu posle intradermalne aplikacije PHA (Stadecker i Leskowitz, 1974; Stadercker i sar., 1977; Sinha i sar., 1988; Corkier i De Loach, 1990), b) nastali edemi su nestajali kod timektomisanih ptica (Goto i sar., 1978), c) fitohemaglutinin pretežno stimuliše T limfocite, ali ne i B limfocite u uslovima *in vitro* (Elgert, 1996) i d) pojave odložene reakcije preosetljivosti, uključujući i pojavu edema na fitohemaglutinin koje su ponekad u uzajamnoj vezi sa sposobnošću životinja da kontrolišu određene vrste infekcija (najčešće virusne) (Turk, 1967). Na osnovu ovih nalaza jasno je da je edem kože posredovan sa PHA, i da predstavlja imunološku reakciju, ali nije jasan njegov funkcionalan značaj, odnosno tumačenje razlika u intenzitetu reakcije, tj. veličini edema.

Neka ispitivanja na divljim pticama pokazuju da pojava velikog edema kože posle aplikacije PHA ukazuje na veću verovatnoću stepena preživljavanja ptica (Gonzalez i sar.; 1999; Soler i sar., 1999). Iz tog razloga, edem kože posredovan sa PHA predstavlja pouzdanu zamenu za procenu opšte otpornosti organizma na bolesti (imunokompetentnost). Međutim, rezultati ispitivanja postojanosti edema kože posredovanog dejstvom PHA ukazuju na njegovu promenljivost zbog čega je sugerisano da je edem pokazatelj opšteg zdravstvenog stanja jedinki (Duffy i Ball, 2002; Ardia, 2005) ili zamena za procenu imunološke aktivnosti u određenim trenucima života životinja (Martin i sar., 2000; Tell i sar., 2005). Neki imunolozi ukazuju da je pojava velikih edema kože posledica alergije ili nekontrolisane lokalne inflamatorne aktivnosti (Elgert, 1996), i navode da veliki edemi nisu uvek bolji (Martin i sar., 2006).

Rusov i saradnici (1994) su ispitivali reakciju osetljivosti na PHA kod lakih i teških provenijencija brojlera u uslovima *in vivo* i pokazali da se pod uticajem PHA ne menja ukupni broj leukocita i odnos između diferenciranih leukocita u perifernoj krvi, i da citomorfološki sadržaj infiltrata kože nastao 12 h od inokulacije PHA ukazuje na

povećanje broja heterofila, smanjenje broja leukocita, makrofaga i mastocita. Kod praćenja imunološke reaktivnosti živine u intenzivnom uzgoju brzi odgovori mogu da se dobiju procenom statusa aktivnosti T limfocita.

Korišćenje mitogenih supstanci kod T i B ćelijski zavisnih antigena, bez prethodne senzibilizacije makroorganizma takođe se naziva odložena bazofilna preosetljivost, pa se često oba termina koriste u istraživačkoj terminologiji. Kao mitogena supstanca, u imunologiji se u poslednjoj deceniji koristi makromolekul fitohemaglutinin izolovan iz ekstrakta crvenog pasulja (*Phaseolus vulgaris*) (Martin i sar., 2006). Fitohemaglutinin (PHA-P) predstavlja prečišćenu smešu dva izolektina (eritroaglutinin PHA-E i leukoaglutinin PHA-L).

Kod ljudi i drugih kičmenjaka konzumiranje sirovih zrna pasulja prouzrokuje inflamaciju digestivnog sistema, a PHA i aglutinaciju eritrocita (Naspitz i Richter, 1968). Slično drugim lektinima, PHA je mitogena supstanca prema mnogim tipovima ćelija kičmenjaka, uključujući i T limfocite (Elgert, 1996).

Odgovor na mestu gde je inokulisan fitohemaglutinin manifestuje se lokalnim povećanjem i zadebljanjem kože nastalim zbog nakupljanja T limfocita i ćelija zapaljenskog procesa. Edem je posledica povećane permeabilnosti krvnih sudova izazvane oslobađanjem vazoaktivnih amina, serotonina i histamina, oslobođenim iz mastocita, kao i zbog senzibilizacije sa antitelima ili T ćelijama zavisnih antigena (Ptak i sar., 1991; Miljković i sar., 2007).

Pilići su senzibilisani na korišćene mitogene i B i T ćelijski zavisne antigene aplikovane intradermalno (Miljković i sar., 2007). Najveći broj autora opisuje jednostranu interdigitalnu aplikaciju fitohemaglutinina kod pilića i ćurića. Meri se edem kože u milimetrima pre i posle aplikacije PHA, odnosno intenzitet odložene kožne preosetljivosti. Test kože i odložena preosetljivost izvedeni u uslovima *in vivo* imaju za rezultat inicijalni edem nastao kao odgovor na dejstvo senzibilizirajućeg agensa koji povećava debljinu kože koja se može videti posle 4 do 6 sati od aplikacije. Mnogi rezultati ispitivanja ukazuju da zdravi pilići imaju snažan imunološki odgovor i potkrepljuju hipotezu da neke promene u ćelijski posredovanom imunskom odgovoru i drugi patogeni mogu potencijalno da utiču na imunski odgovor.

2.12. Vakcinacija

U protekle dve decenije brojne studije su dokumentovale značaj stečenog imuniteta za odbranu ljudskog organizma od invazivne gljivične infekcije. Postoji široki konsenzus na polju medicinske mikologije da je ćelijski imunitet važan za uspešnu odbranu domaćina od infekcije gljivicama. Trenutno, postoji više projekata istraživanja razvoja vakcine protiv širokog spektra patogenih gljivica kod ljudi (Dixon i sar., 1989; Clemons i Stevens, 2005).

Međutim, u poslednjih nekoliko godina rezultati nekih ispitivanja ukazuju na potencijalnu efikasnost humoralnog imuniteta u zaštiti domaćina protiv dve glavne patogene gljivice (*Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*) (Cenci i sar., 2002). Ustanovljeno je da je produkcija antitela na unete antigene *C. albicans* (manan, proteaze, proteine toplotnog stresa) povezana sa zaštitom od infekcije. Dokazano je da vakcine mogu da stvaraju antitela protiv eksperimentalne infekcije prouzrokovane sa *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*, dok u slučajevima vakcinacije sa *Coccidioides immitis* nije zapažena aktivnost humoralnog imuniteta i stvaranje protektivnih antitela kod ljudi (Cenci i sar., 2002). Ovi rezultati podstiču gledište da odgovor stečenog imuniteta može da bude mobilisan za preveniranje i lečenje gljivičnih infekcija.

Slična istraživanja stepena imunogenosti *A. fumigatus* sprovedena su kod ćurića i brojlerskih pilića u cilju preveniranja ovog oboljenja. Mišljenje je da bi aktivni imunitet, dobijen posle vakcinacije ptica, ali i pasivni (imunoglobulini) bili korisni u preveniranju i lečenju aspergiloze. Međutim, pokušaji da se osmisle planovi vakcinacije sa različitim preparatima vakcine su pod velikim znakom pitanja, jer se radi o imunosuprimiranim životinjama koje bi trebalo tretirati imunoglobulinima (Schmidt, 2002). Korišćenje vakcina sa *A. fumigatus*, dobijene različitim tehnološkim i farmaceutskim postupcima dalo je veoma neusaglašene rezultate (Richard i sar., 1981).

Činjenica je da je uloga stečenog imuniteta u razjašnjavanju aspergiloze i dalje nejasna. Tako, dvokratna vakcinacija nije obezbedila zaštitu ćurića od prethodnog nefatalnog izlaganja dejstvu spora *A. fumigatus*, već naprotiv, prouzrokovala je teži oblik zapaljenja vazdušnih kesa (Kunkle, 2003).

Ispitivana je efikasnost nekoliko eksperimentalno pripremljenih vakcina od izolata *A. fumigatus* (kultura filtrata *A. fumigatus*, suspenzija spora, micelijuma, germinal) kod ćurića. Vakcina je aplikovana subkutano, dvokratno (prva i druga nedelja života), a u starosti od jednog meseca ćurići su izlagani uticaju sporama *A. fumigatus* u obliku aerosola i koncentraciji koja prouzrokuje 100% uginuće kod nevakcinisanih ćurića. Rezultati ispitivanja efikasnosti različitih vakcina ukazuju na zaštitni efekat od 38 do 48% kod ćurića vakcinisanih vakcinom sa germinalnim *A. fumigatus*, i 50% kod ćurića vakcinisanih sa micelijarnom vakcinom *A. fumigatus* (Richard i sar., 1981). Na osnovu procene efikasnosti ispitivanih vakcina u zaštiti ćurića od infekcije sa *A. fumigatus* može da se zaključi da je stepen zaštite nedovoljan, zbog čega je primena vakcina ograničena (Richard i sar., 1981; Richard i sar., 1984). Nijedna komercijalna vakcina protiv infekcije sa *Aspergillus* spp. nije registrovana u svetu (Arne i sar., 2011).

Iako su predlagani brojni protokoli primene antimikotičkih lekova za lečenje aspergiloze ptica, lečenje ove mikoze u živinarskim farmama je praktično nemoguće (Beernaert i sar., 2010).

Preveniranje infekcije živine sa *A. fumigatus* se sprovodi primenom biosigurnosnih mera i smanjivanjem broja predisponirajućih faktora. S obzirom da je *Aspergillus* spp. oportunistički patogen redukcija predisponirajućih imunosupresivnih faktora kao što su kontinuirani stres, primena antibakterijskih lekova i drugih imunosupresivnih supstanci i malnutricija, doprinose sprečavanju pojave oboljenja. Izbegavanje prisustva ključnih faktora za nastanak aspergiloze, kao što su: prašnjava i buđava prostirka i hrana, ali i sprovođenje dobrog menadžmenta prostirke zajedno sa svakodnevnom procenom njenog kvaliteta tokom celog životnog veka jata živine obezbeđuju zaštitu od infekcije (Beernaert i sar., 2010; Arne i sar., 2011). Takođe, prostirka i hranilice treba da budu čiste, suve i bez prašine da bi se ograničio razvoj gljivica. Neophodno je kontrolisati relativnu vlažnost preko odgovarajuće ventilacije da bi se sprečilo vlaženje prostirke i stvarali pogodni uslovi za razvoj gljivica (DeBey i sar., 1995; Kunkle, 2003). U cilju sprečavanja infekcije i kontrolisanja stepena kontaminacije životnog okruženja (površine i unutrašnjost objekta) ubikvitarnim gljivicama korisno je povremeno primenjivati fungistatike, kao što su: tiabendazol, nistatin, bakar sulfat (Dyar i sar., 1984) i enilkonazol u obliku spreja, magle ili nebulizacije. I na kraju, ali ne manje važno, potrebno je maksimalno smanjiti efekte

stresora, kao što su: debikiranje kljunova i prenaseljavanje u objektima (Akan i sar., 2002).

2.13. Uticaj infekcije sa *Aspergillus* spp. na hematološke parametre i imunski status živine

Poznate su visoke fiziološke intra- i interspecijske hematološke varijacije kod ptica. Posledica su postojanja velikog broja vrsta, razlika u brzini metabolizma, pola, starosti, reproduktivnog statusa i sezonskih varijacija.

Hematološko ispitivanje je jedno od značajnih ispitivanja koje može da doprinese otkrivanju i praćenju poremećenog zdravlja i fiziološkog statusa živine. Ovim ispitivanjem se procenjuje ćelijski (broj i morfologija ćelijskih elemenata krvi) i serumski sastav krvi, koagulacija, formiranje krvnih ćelija, sinteza hemoglobina, imunski status i poremećaj svih ovih procesa (Albert, 2005; Kassirskii, 2010). Promenjene vrednosti hematoloških parametara su dobar indikator za procenu odgovora živine na različite prouzrokovaoče bolesti i stresna stanja (Etim i sar., 2014; Anjorin i Cyriacus, 2014).

Gljivična infekcija - aspergiloza je praćena teškom do umerenom heterofilijom (često sa toksičnim promenama u beloj krvnoj lozi), limfocitozom i monocitozom kod brojlerskih pilića (Mitchell i Johns, 2008; Etim i sar., 2014). Rezultati hematoloških ispitivanja dobijeni kod brojlerskih pilića, koji su tokom tri nedelje konzumirali hranu kontaminiranu metabolitima *A. flavus* i *A. ochraceus* ukazuju da mikotoksini značajno smanjuju broj leukocita, limfocita, eritrocita, koncentraciju hemoglobina i vrednost hematokrita, a značajno povećavaju broj heterofila (analog neutrofilima kod sisara) (Tuzcu i sar., 2010; Anjorin i Cyriacus, 2014).

Takođe, ispitivan je uticaj *Aspergillus terreus* (mikotoksin - teritrem B) na rast, biohemijske i hematološke parametre brojlerskih pilića koji su tokom šest nedelja konzumirali hranu kontaminiranu ovom vrstom plesni. Ustanovljeno je značajno sniženje koncentracije gvožđa, hemoglobina i glikemije u krvi, a pad koncentracija navedenih parametara progresivno se povećavao sa većim unosom kontaminirane hrane (Kiran i sar., 2015). Pad koncentracije hemoglobina, albumina, proteina i glukoze u krvi brojlera uočen je i posle konzumiranja hrane kontaminirane gliotoksinom (Reddy i sar.,

1997). Kiran i saradnici (2015) su našli da mikotoksin teritrem B, primenjivan u hrani tokom šest nedelja dovodi do značajnog smanjenja broja eritrocita, leukocita, heterofila i limfocita, i da je ovo smanjenje u korelaciji sa unetom količinom hrane. Takođe, ovaj mikotoksin prouzrokuje značajno povećanje broja bazofilnih granulocita, ali ne utiče na broj monocita.

Mikotoksini značajno narušavaju homeostazu krvi i prouzrokuju imunosupresiju. Takođe, metaboliti *A. flavus* imaju imunosupresivni efekat, tj. značajno smanjuju aktivnost ćelijski posredovanog imuniteta, odnosno smanjuju ukupan odnos leukocita i limfocita. Mikotoksini deluju kao imunosupresori dovodeći do inhibicije i humoralnog i celularnog imunskog odgovora. Oni inhibiraju fagocitozu i mikrobiocidnu aktivnost makrofaga i smanjuju sadržaj T limfocita u perifernoj krvi brojerskih pilića (Oguz i sar., 2000).

Aflatoksin je veoma snažan imunosupresor i prouzrokuje depleciju limfoidnog tkiva, remeti funkcije makrofaga i limfocita i redukuje sintezu i produkciju komplementa. Ochratoksin dovodi do atrofije limfnih organa, oštećenja ćelija uključenih u humoralni i celularni imunski odgovor, i remeti fagocitnu aktivnost. Takođe, trihoteceni dovode do deplecije limfoidnih organa živine, smanjenja limfocitnog mitogenog odgovora i citotoksični su za makrofage. Svi ovi mikotoksini slabe imunski odgovor na vakcinalne antigene i značajno povećavaju osetljivost prema raznim infekcijama (Resanović, 2015).

Stres prouzrokuje povećanje broja heterofila i smanjenje broja limfocita, kao i loš heterofilno - limfocitni odnos, što predstavlja bolji indikator stresa od povećanja koncentracije kortikosterona u krvi (Resanović i Palić, 2009). Povećanje heterofila (heterofilija) nastaje kao posledica opšte zapaljenske reakcije izazvane intoksikacijom i akutnim hemoragijama. Takođe, hemolitička anemija može da prouzrokuje heterofiliju, a povećan procenat bazofila ukazuje na hroničnu hemolitičku anemiju i gljivičnu infekciju (Anjorin i Cyriacus, 2014).

Parenteralna višekratna primena deksametazona prouzrokuje ćelijski posredovanu imunosupresiju i smanjuje otpornost na infekcije kod različitih vrsta životinja, uključujući piliće i ćurice (Huff i sar., 1998). Injekciona primena deksametazona se široko koristi u eksperimentalnim modelima za procenu imunomodulacije, odnosno imunosupresije izazvane stresom. Deksametazon

primenjivan trokratno (svaki drugi dan) ili tokom tri do sedam uzastopnih dana u dozi od 2 do 5 mg/kg (i.m.) kod ćurića, brojerskih pilića, golubova i sokolova prouzrokuje imunosupresiju ćelijskog imuniteta i menja odnos heterofila i limfocita (Huff i sar., 1998; Beernaet i sar., 2008). Ovaj glikokortikoid povećava učestalost pojave aerosakulitisa i osteomijelitis - kompleksa nakon eksperimentalne infekcije ćurića izazvane sa *E.coli*. Oba tretmana značajno su smanjivala relativnu masu burze Fabricii. Deksametazon povećava broj izolata *E. coli* iz tkiva ćurića, kao i odnos heterofila i limfocita, tj. povećava broj heterofila a smanjuje broj limfocita. Ovi rezultati ukazuju da stresom izazvana imunosupresija (primenom deksametazona) može biti uključena u etiologiju aerosakulitisa i osteomijelitis kompleksa ćurića izazvanog eksperimentalnom inokulacijom *E. coli* (Huff i sar., 1998).

2.14. Primena molekularnih metoda dijagnostike *Aspergillus fumigatus* kod ptica

Invazivne gljivične infekcije mogu da predstavljaju ozbiljnu pretnju po zdravlje stanovništva. Populacija stanovništva je u stalnom porastu, a takođe i broj imunokompromitovanih ljudi, pa je i stepen pojave gljivičnih infekcija u poslednjim decenijama sve prisutniji. Tradicionalne dijagnostičke metode, kao što su histologija i mikologija imaju nisku osetljivost, ali se još uvek smatraju zlatnim standardom u dijagnostici gljivičnih oboljenja. Zbog ove činjenice sve više se razvijaju i druge metode za dijagnostiku infektivnih gljivičnih agenasa. U kliničkoj praksi razvijene su nove serološke i molekularne metode koje imaju veći stepen osetljivosti u odnosu na klasične. Testovi koji detektuju prisustvo antigena galaktomanana za dijagnozu aspergiloze, β -glukana za dijagnostiku invazivne kandidijaze i plesni, kao i drugi antigen i antitelo testovi za *Cryptococcus* spp., *Pneumocystis* spp. i dimorfne gljivice već uveliko su našli primenu u svakodnevnoj rutinskoj kliničkoj dijagnostici. S druge strane nove PCR i druge molekularne metode kao što su matriksna laserska jonizujuća desorpcija (MALDI) i fluorescentna hibridizacija in situ (FISH) pokazuju veći stepen osetljivosti i preciznosti, pa polako pronalaze put u standardnoj rutinskoj kliničkoj praksi (Richard C. Barton, 2013).

Veoma brz razvoj molekularne biologije doprineo je razvoju novih molekularnih metoda koje se danas sve češće koriste u dijagnostici infektivnih bolesti. Danas se molekularne metode, od kojih je najznačajnija PCR koriste u rutinskoj laboratorijskoj i kliničkoj praksi zamenjujući standardne konvencionalne metode. Osnovne prednosti ovih metoda jesu jednostavnost i brzina izvođenja. Korišćenje PCR metode povećava mogućnost identifikacije uzročnika u ranom stadijumu infekcije kada su i veće mogućnosti za uspešniju terapiju. PCR je jedna od starijih i najšire korišćenih metoda za dijagnostiku gljivičnih infekcija (Tsui i sar., 2011). Osnovni nedostatak klasične PCR tehnike je činjenica da ne postoji mogućnost kvantifikacije amplifikovane DNK iz uzorka. Ovo je vrlo značajno radi utvrđivanja da li se radi samo o kolonizaciji ili o aktivnoj infekciji. Problem je rešen razvojem real-time PCR tehnike koja ima sposobnost da kvantifikuje količinu amplifikovane DNK u realnom vremenu. Danas je real-time PCR sve više u upotrebi u laboratorijskoj primeni u odnosu na standardnu PCR. Uprkos velikom potencijalu PCR metoda, proces izolacije DNK je ometao pokušaje za standardizaciju ovih metoda, jer su se vrlo često javljale značajne razlike u korišćenju raznih metoda ekstrakcije. Gljivice, i to naročito plesni imaju kompleksno građen ćelijski zid koji se teško razlaže, što zahteva dugotrajne i složene postupke ekstrakcije DNK (Tsui i sar., 2011). Tehnike ekstrakcije su obično zasnovane na enzimskoj digestiji uz korišćenje toksičnih hemijskih supstanci kao što su: fenol - hloroform, mehanička destrukcija perlicama i sonifikacija. Da bi se prevazišle ove teškoće razvijene su i metode automatizovane ekstrakcije u kojima je smanjeno vreme ekstrakcije i mogućnost greške. Drugi problem koji se javlja kod primene PCR za dijagnostiku gljivica je potencijalna kros kontaminacija. Imajući u vidu da su gljivice ubikvitarne u životnoj sredini, i da vrlo lako kontaminiraju površine i materijale koji se koriste u laboratoriji, uključujući i reagensne, potrebno je primenjivati mere predostrožnosti, a osoblje koje radi u laboratoriji mora biti iskusno i dobro obučeno. Na kraju, vrlo je važan izbor prajmera za dijagnostiku, kao i korišćenje optimalanih PCR protokola. Zbog navedenih mogućih problema, ni jedan od ponuđenih protokola ne daje dovoljno dokaza za tačnost, i ne može da se smatra standardom u dijagnostici gljivičnih infekcija.

Zbog visoke incidencije sistemskih gljivičnih infekcija kod imunokompromitovanih ljudi i životinja veliki broj naučnika pokušava da otkloni

nedostatke poznatih molekularnih metoda (PCR), matriksna laserska jonizujuća desorpcija (MALDI) i fluorescentna hibridizacija in situ (FISH) tako što razvijaju i modifikuju određene postupke u cilju povećanja njihove osjetljivosti i specifičnosti u otkrivanju odgovarajućeg soja prouzrokovala. U tom smislu, razvijen je dvostepeni PCR protokol koji smo i mi koristili za identifikaciju *Aspergillus fumigatus* u unutrašnjim organima ćurica, kao što su: pluća i vazdušne kese, trahea, jetra, srce, bubreg, mozak i kostna srž.

Protokol modifikovane dvostepene PCR metode omogućava specifično povećanje osjetljivosti mesta na 18S rRNK subjedinići koja je duboko smeštena u *A. fumigatus*. Na ovaj način obezbeđuje se direktna i brza detekcija DNK gljivice (Bansod i sar., 2008). Prvi korak u detekciji *A. fumigatus* je primena prvog para prajmera AFU7S i AFU7AS koji daju PCR proizvod od 405 baznih parova (bp). Dobijeni proizvod od 405bp je uziman kao matrica za drugi krug reakcija u kojem je korišćen drugi par prajmera: AFU5S i AFU5S. Proizvod drugog kruga korišćenih prajmera iznosio je 236bp (Bansod i sar., 2008).

3. CILJ I ZADACI

Cilj istraživanja je da se kod ćurića eksperimentalno inficiranih sa *Aspergillus fumigatus* ispita uticaj uzročnika na njihovo zdravstveno stanje, evoluciju patomorfološkog supstrata, imunološki odgovor, kao i propagacija uzročnika u druga tkiva. Postavljeni cilj biće realizovan kroz sledeće zadatke:

1. Klinička opservacija imunokompetentnih i imunosuprimiranih (deksametazonom tretiranih) ćurića veštački inficiranih sa *Aspergillus fumigatus*.
2. Ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih promena u parenhimatoznim organima (pluća, vazdušne kese, jetra, srce i mozak) veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića, korišćenjem standardnih i specifičnih histoloških metoda.
3. Mikološka i molekularna ispitivanja organa imunokompetentnih i imunosuprimiranih inficiranih ćurića.
4. Ispitivanje stepena ćelijskog imunskog odgovora kod veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića posle intradermalne aplikacije fitohemaglutinina.
5. Ispitivanje aktivnosti humoralnog imunskog odgovora kod imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića posle primene vakcine protiv atipične kuge živine.
6. Hematološka ispitivanja kod veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića.
7. Statistička obrada i poređenje rezultata dobijenih kod oglednih i kontrolnih grupa.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Formiranje ogleđa

Za predviđena istraživanja korišćeni su jednodnevni ćurići poreklom od roditeljskih parova provenijencije „Converter“. Imunoprofilaksa kod roditeljskog jata sprovedena je prema programu za roditeljske parove.

Ogled je izveden na ukupno 90 ćurića, oba pola, podeljenih u četiri grupe: ogleđna grupa 1 (O-1), ogleđna grupa 2 (O-2) sa po 30 jedinki, i kontrolna grupa 1 (K-1) i kontrolna grupa 2 (K-2) sa po 15 jedinki u grupi. Ćurići su smešteni u odvojene bokseve na dubokoj prostirci od drvene šuške debljine 12 cm, koja je tokom ogleđa redovno negovana. Gustina naseljenosti iznosila je 12 jedinki po kvadratnom metru. Pre naseljavanja ćurića objekat je mehanički očišćen, sanitarno opran i dezinfikovao sa komercijalnim hlornim preparatom „Hlorocet“. Posle izvršene dezinfekcije uzeti su brisevi sa više mesta u boksu za bakteriološki i mikološki pregled radi procene efikasnosti dezinfekcije. Završna dezinfekcija, sprovedena sa parama formaldehida, izvedena je nakon unošenja prostirke. Po završenoj fumigaciji uzorkovana je prostirka za mikološki pregled.

Ishrana ćurića, *ad libitum*, sa kompletnom krmnom smešom (ĆU-1) proizvođača „Veterinarski zavod Subotica“ za ishranu ove starosne kategorije obavljana je, u početku pomoću plastičnih tacni, a kasnije visećih cilindričnih ručnih hranilica prečnika 40 cm postavljenih u nivou grudne muskulature. Pre početka hranjenja kompletna krmna smeša pregledana je mikološki i hemijski kako bi se isključio mogući izvor infekcije. Tokom ogleđa, ćurići su kontinuirano napajani svežom vodom iz zvonastih plastičnih pojilica zapremine 5 litara. Punjene su ručno, a svaka od njih je obezbeđivala oko 3 cm pojidbenog prostora po jedinki.

Mikroklimatski uslovi su prilagođeni potrebama ćurića. Temperaturni režim održavan je prema preporuci proizvođača komercijalnog hibrida uz korišćenje grejnog

tela (električna veštačka kvočka) konvencionalnog tipa koje je pored toplote obezbeđivalo i izvor svetlosti neophodne jačine za ćuriće.

Na dan uvođenja ćurića u ogled, punkcijom srca jednodnevnih ćurića uzorkovana je krv radi određivanja titra pasivno prenetih antitela protiv virusa Newcastle bolesti. Istog dana je žrtvovano 5 ćurića, a uzorci organa ispitivani su mikološki zasejavanjem na Sabouraud dekstrozni agar da bi se isključila moguća prirodna infekcija sa *Aspergillus fumigatus* koja može da nastane još tokom inkubiranja jaja.

Nakon aklimatizacije, sedmog dana starosti ćurića sve četiri grupe (O-1; O-2; K-1 i K-2) su vakcinisane protiv atipične kuge živine. Antigen La Sota soj (vakcina Lasovak, Vet. zavod Subotica) je aplikovan okulo-nazalno, prema uputstvu proizvođača. Kontrola imunskog odgovora ćurića na dati antigen obavljena je 21. dana nakon vakcinacije uzorkovanjem krvi iz krilne vene.

Četnaestog dana starosti ćurići ogledne grupe 1 (O-1) inficirani su intratrahealno suspenzijom spora *Aspergillus fumigatus* u koncentraciji od $5,056 \times 10^7$ cfu u zapremini fiziološkog rastvora NaCl od 0,3ml po ćuretu. Ćurići ogledne grupe 2 (O-2) inficirani su istog dana, istom koncentracijom spora u istoj zapremini vehikuluma, s tom razlikom što su oni svakodnevno, tokom šest uzastopnih dana pre infekcije tretirani i.m. deksametazonom (u obliku natrijum-fosfata - Dexaveto[®] 0,2) u dozi od 4mg/kg telesne mase. Ćurićima kontrolne grupe 1 i 2 četrnaestog dana starosti je intratrahealno aplikovano po 0,3 ml sterilnog fiziološkog rastvora NaCl, a ćurićima kontrolne grupe 2 i deksametazon i.m. u dozi od 4mg/kg telesne mase tokom šest uzastopnih dana pre intratrahealne inokulacije sterilnog fiziološkog rastvora.

4.1.1. Gljivični soj – Referentni soj *Aspergillus fumigatus*

Za eksperimentalnu infekciju korišćen je referentni soj *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 (kataloški broj: 01021, Lot broj: 1021-08), KWIK STIK DUO PACK (Microbiologics, USA).

4.1.2. Priprema suspenzije spora *Aspergillus fumigatus* za veštačku infekciju

Priprema suspenzije spora za veštačku infekciju je obavljena na Odeljenju za bakteriologiju i parazitologiju Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije, a određivanje

broja spora u Laboratoriji za mikologiju Odeljenja za biljnu fiziologiju Instituta za Biološka Istraživanja "Siniša Stanković". Nakon otvaranja kwick stick duo packa i pripreme uzorka po uputstvu proizvođača, dobijena suspenzija je zasejavana na 2 ploče Sabouraud dekstroznog agara. Jedna ploča je inkubirana na 25°C, a druga na 37°C tokom 48 sati. Nakon inkubacije pregledana je čistoća kulture, izgled izraslih kolonija i napravljeni su preparati koji su obojeni Lactophenol-cotton blue. Kolonije *Aspergillus fumigatus* su presejane na 5 ploča Sabouraud dekstroznog agara i inkubirane na 37°C tokom 72 sata. Nakon ponovne kontrole čistoće kulture, spore sa dobijenih kultura *Aspergillus fumigatus* su isprane sterilnim fiziološkim rastvorom NaCl-a uz blago prelaženje podloge sterilnim staklenim štapićima. Dobijena suspenzija spora, sa sterilnim pasterovim pipetama preneti je u erlenmajer boce, i profiltrirana kroz sloj sterilne gaze radi odvajanja eventualno prisutnih delova micelijuma plesni. Za brojanje spora *Aspergillus fumigatus* korišćena je komorica za brojanje krvnih ćelija „Neubauer“. Zapremina suspenzije spora od 50 µl preneti je na pločicu za brojanje prekrivenu pokrovnim staklom. Svetlosnim mikroskopom je nađena mrežica i prebrojane spore u 5 polja, zbog preciznijeg proračuna. Izračunat je prosečan broj spora po jednom vidnom polju prema sledećoj formuli:

$$X_{sr}=(320+310+325+308+318)/5=316,4$$

Prosečan broj spora po jednom vidnom polju iznosio je 316, a zatim je taj broj pomnožen sa ukupnim brojem polja, 16 i dobijena je sledeća vrednost:

$$316,4 \times 16 = 5056$$

$$5056 \times 10^4 = \mathbf{5,056 \times 10^7 \text{ spora}}$$

4.1.3. Veštačka infekcija

Pripremljena suspenzija spora *Aspergillus fumigatus* je pre aplikacije temperirana na sobnoj temperaturi. Pomoću automatske mikropipete (Eppendorf) suspenzija je razlivena u sterilne mikrotube sa poklopcem u zapremini od 0,3 ml koja sadrži individualnu koncentraciju/dozu ($5,056 \times 10^7$ spora) spora za veštačku infekciju. Pripremljeni broj mikrotuba odgovarao je broju ćurića oglednih grupa (O-1; O-2).

Ćurići su inficirani intratrahealno uvođenjem polietilenske braunile (sistem za intravensku aplikaciju leka) u traheju. Na plastičnu brizgalicu zapremine od 1ml stavljena je prethodno, od sistema odsečena gumena cevčica. Ovim sistemom je

aspirirana suspenzija spora *A. fumigatus*, a pomoćnik je fiksirao jedinku, otvorao kljun i lagano povlačio jezik rostralno kako bi bio vidljiv otvor laringsa. Gumena cevčica je pažljivo uvođena u traheju i pritiskom na klip brizgalice sporo aplikovana suspenzija.

4.1.4. Praćenje telesne mase i klinička opservacija

Telesna masa ćurića merena je na dan veštačke infekcije, a potom nakon druge i treće nedelje posle infekcije. Nakon inokulacije suspenzije spora ćurići su svakodnevno, tri puta tokom dana, opservirani u cilju ocene kliničkog stanja u periodu posle inokulacije. U toku oglada meren je i prosečni sedmodnevni prirast. Oglad je trajao 35 dana, a za vreme trajanja nije zabeleženo uginuće, kako ćurića ogledne grupe 1 i 2, tako i kontrolne grupe 1 i 2.

4.1.5. Uzorkovanje

Za serološko - imunološko ispitivanje, radi kontrole imunskog odgovora (serokonverzija) na aplikovani antigen uzimano je po 10 uzoraka krvi punkcijom krilne vene ćurića oglednih i kontrolnih grupa, 21. dana posle vakcinacije. Dvadesetprvog dana od infekcije uzorkovana je krv od po 10 ćurića iz svake grupe (obe ogledne i obe kontrolne) za hematološko ispitivanje.

U cilju ocene evolucije patomorfološkog supstrata, kao i propagacije uzročnika u druga tkiva u određenom vremenskom intervalu od infekcije (1, 3, 7, 14 i 21. dana) žrtvovano je po šest ćurića iz oglednih grupa i po tri iz kontrolnih od kojih su uzorkovani organi (pluća i vazdušne kese, srce, jetra i mozak) za mikološka, patomorfološka, histopatološka i molekularna ispitivanja. Dodatno, za molekularna ispitivanja uzorkovani su uzorci kosne srži i bubrega.

4.2. Metode ispitivanja

4.2.1. Serološko ispitivanje

Uzorci krvi iz krilne vene ćurića uzimani su na dan uvođenja u ogled i 21. dana posle vakcinacije protiv atipične kuge živine. Ispitani su serološki metodom inhibicije

hemaglutinacije (HI test) na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge živine.

Krvni serumi ćurića ispitivani su u predviđenim terminima (HI test) na sledeći način:

- 0,025ml PBS-a se unese u svaki pojedinačni bunarčić mikroploče sa V-dnom.
- 0,025ml seruma se dodaje u prvi red svih bunarčića na ploči.
- Dvostruko serijsko razređenje od 0,025ml zapremine seruma se izvede na celoj ploči.
- Dodaje se 0,025ml virusne suspenzije koja sadrži 4 HAJ u svaki bunarčić i ostavi 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- U sve bunarčiće se dodaje 0,025ml 1% eritrocita petla i ostavi na sobnoj temperaturi 40 minuta.
- Ploče se čitaju nakon 40 minuta kada se u kontrolnim bunarčićima natalože eritrociti.
- Očitava se tako da se u nagnutoj mikrotitar ploči posmatra prisutnost ili odsutnost toka u obliku suze sa istom brzinom koji ima tok u kontrolnim bunarčićima, koji sadrže samo eritrocite (0,025ml) ili PBS (0,05ml).
- Hi titar je najveća dilucija seruma koja kompletno inhibira 4 HAJ antigena.

4.2.2. Imunološko ispitivanje sa fitohemaglutininom (PHA)

Za ocenu T ćelijskog imunskog statusa ćurića korišćen je fitohemaglutinin (PHA) proizvođača „INEP“ iz Beograda. Fitohemaglutinin je aplikovan kod 40 ćurića (po 10 iz svake grupe-ukupno 4 grupe) starosti od 28 dana, odnosno 21. dana nakon primene vakcine protiv atipične kuge živine. Fitohemaglutinin je davan u dozi od 100 µg/jedinki. Pre aplikacije je razblaživan sa sterilnim fiziološkim rastvorom NaCl u zapremini od 0,1ml i u njoj aplikovan intradermalno između 3. i 4. prsta desne noge ćureta. Sterilan fiziološki rastvor, koji je istovremeno predstavljao kontrolnu supstancu, aplikovan je u istoj zapremini, na istom mestu kao i PHA, ali samo u levu nogu svakog pojedinačnog ćureta. Debljina kože (DK) izražavana u milimetrima, merena je kutinometrom („John Bull“, British indicators LTD, England) 0., 6., 12. i 24. časa posle aplikacije PHA i fiziološkog rastvora.

Reakcija kožne bazofilne hipersenzitivne preosetljivosti (*Cutaneous Basophil Hypersensitivity* – CBH) je takođe vizuelno procenjivana na osnovu intenziteta eritema i otoka kože.

4.2.3. Hematološko ispitivanje

Hematološko ispitivanje je sprovedeno prema preporuci Rusova-a (2002). Krv je za ovo ispitivanje uzorkovana punkcijom krilne vene (*v. brachialis*).

Uzorkovana je puna krv sa antikoagulansom (EDTA) i ispitana pomoću hematološkog analizatora „ADVIA 120“, Siemens, Nemačka. Ispitivani su sledeći parametri: broj eritrocita, hematokrit, koncentracija Hb i leukogram. Za određivanje broja eritrocita - direktna metoda, korišćene su modifikovane Neubauer komorice za brojanje ćelija, za određivanje hemoglobina hematološki analizator „ADVIA 120“, Siemens, Nemačka, a za određivanje hematokrita - mikrohematokrit metoda uz korišćenje heparisanih mikrokapilara i centrifuge. Za određivanje broja leukocita, korišćena je indirektna metoda brojanja leukocita, a za određivanje leukocitarne formule - mikroskopska analiza bojenog razmaza krvi - Wrightov rastvor (proizvođač NRK Inžinjeri, Beograd).

4.2.4. Mikološko ispitivanje

Uzorkovani organi za mikološko ispitivanje su inokulisani na Sabouraud dekstrozni agar i inkubisani na temperaturi od 25°C u aerobnim uslovima u svrhu izolacije infektivnog agensa. Da bi se izbegla bakterijska kontaminacija podlozi su dodavani antibiotici: penicilin G (20 ij/ml) i streptomycin sulfat (40 µg/ml). Makroskopska i mikroskopska ispitivanja izraslih kolonija izvršena su prema Swatek-u (1985).

4.2.5. Molekularno ispitivanje

4.2.5.1. Priprema tkiva za molekularno ispitivanje

Za molekularno ispitivanje uzorkovani su organi respiratornog sistema (pluća i vazdušne kese), zatim kostna srž, mozak, srce, jetra i bubreg. Za svaki uzorak organa

korišćen je poseban pribor (skalpel, pinceta) kojim je organ prebacivan u obeležene čašice vodeći pritom računa o mogućoj unakrsnoj kontaminaciji.

Da bi se izbegla spoljna kontaminacija uzoraka tkiva sporama *A. fumigatus* čitav postupak pripreme i samo izvođenje su obavljani pod sterilnim uslovima u laminarnoj komori biološke sigurnosti nivoa 2 (Bio safety level 2).

Uzorak tkiva mase 1g je maceriran u sterilnom avanu sa tučkom, a zatim je usitnjeni deo tkiva prebačen u sterilne epruvete zapremine 15ml sa dodatkom sterilnog fiziološkog rastvora NaCl u odnosu 1:10 (1g tkiva i 9ml rastvora). Zatim je izvršena temeljna homogenizacija na vortex aparatu. U Eppendorf sterilne mikrotube zapremine od 1,5ml prebačeno je po 200µl homogenizovanog tkiva i dodata proteinaza K u zapremini od 20µl i 180µl ATL pufera. Mikrotube su obeležene, a zatim inkubirane tokom noći u termostatu na temperaturi od 56°C. Nakon inkubacije uzorci su tretirani u 3 uzastopna ciklusa, od kojih je svaki imao fazu zamrzavanja u tečnom azotu na temperaturi od -70°C (1 minut) i fazu kuvanja na temperaturi od 100°C (2 minuta). Dalja ekstrakcija je nastavljena sa *QIAamp DNA Mini kit* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*) prema protokolu za ekstrakciju iz tkiva. Uzorci ekstrahovane DNK čuvani su na temperaturi od -20°C.

I Ekstrakcija – Ekstrakcija DNK *Aspergillus fumigatus* i Nested - PCR iz uzoraka organa – prema uputstvu proizvođača *QIAamp DNA Mini kit* (*Qiagen, Hilden, Nemačka*)

Protokol za ekstrakciju DNK:

Procedura:

1. Sipati 20µl proteinaze K na dno mikrotube zapremine od 1,5 ml.
2. Dodati 200µl uzorka u mikrotubu. Ukoliko je volumen uzorka manji od 200µl, dodati PBS do potrebnog volumena.
3. Dodati 200µl pufera AL i mešati 15 sekundi.
4. Inkubirati na temperaturi od 56°C tokom 10 minuta.
5. Kratko centrifugirati kako bi se uklonile kapljice sa poklopca mikrotube.
6. Dodati 200µl apsolutnog etanola (96 - 100%) u uzorak i mešati tokom 15 sekundi. Kratko centrifugovati da bi se uklonile kapljice sa unutrašnje strane poklopca.
7. Mešavinu iz prethodnog koraka pažljivo sipati u kolonicu i paziti da se ne pokvasi rub. Centrifugirati na 6000×g (8000 rpm), 1 minut. Postaviti kolonicu u novu sabirnu

tubicu, a staru i filtrat odbaciti. Ukoliko nije sve prošlo kroz membranu, ponavljano je centrifugiranje pri većoj brzini sve dok sav sadržaj ne prođe.

8. Pažljivo se otvora kolonice i dodaje pufer AW1 u zapremini od 500 μ l. Paziti da se ne pokvasi rub kolonice. Zatvoriti kolonice i centrifugirati na 6000 \times g (8000 rpm), 1 minut. Postaviti kolonicu u novu sabirnu tubicu, a staru i filtrat odbaciti.

9. Pažljivo otvoriti kolonicu i dodati pufera AW2 u zapremini od 500 μ l. Paziti da se ne pokvasi rub kolonice. Zatvoriti kolonicu i centrifugirati pri punoj brzini (20000 \times g, 14000 rpm), 3 minuta.

10. Postaviti kolonicu u mikrotube zapremine od 1,5 ml. Sabirne tubice i filtrat odbaciti. Pažljivo otvoriti kolonicu i dodati pufer AE u zapremini od 200 μ l ili destilovanu vodu. Inkubirati na sobnoj temperaturi 1 minut. Centrifugirati na 6000 \times g (8000 rpm), 1 minut. Kolonice odbaciti. Izolovana DNK je u mikrotubama zapremine od 1,5 ml.

11. Ekstrahovana DNK je čuvana na temperaturi od - 87°C ili je odmah korišćena u reakciji lančane polimeraze.

Izvođenje dvo stepenog (Nested) PCR protokola za detekciju *A. fumigatus* - a obavljeno je prema proceduri Bansod i saradnika (2008). Korišćena su dva para oligonukeotidnih prajmera. Prvi stepen PCR protokola izvođen je primenom oligonukeotidnih prajmera AFU7S (5'CGG CCC TTA AAT AGC CCG'3) i AFU7AS (5'CGG CCC TTA AAT AGC CCG'3), a produkt ove reakcije iznosio je 405bp. Ovaj proizvod je predstavljao matricu za drugi stepen reakcije koja je izvođena sa drugim parom oligonukleotidnih prajmera AFU5S (5'AGG GCC AGC GAG TAC ATC ACC TTG'3) i AFU5AS (5' GG G (AG)GT CGT TGC CAA C(CT)C (CT)CC TGA'3) koji su imali sposobnost da se vežu za 18s rRNK *A. fumigatus*. Metodom provere oligonukleotidnih prajmera (BLAST) potvrđena je 100% specifičnost za *A. fumigatus*.

Vizuelizacija lančane reakcije polimeraze je postignuta gel elektroforezom u agaroznom gelu koncentracije 2%, u 1 \times TBE puferu, sa dodatkom etidium - bromida kao fluorescentnog indikatora. Proces elektroforeze je obavljen u *Hoeffler submarine* aparatu za elektroforezu, pri naponu od 60 V i jačini struje od 10mA tokom 30 minuta.

Radi određivanja karakteristične dužine amplifikovanog segmenta korišćen je molekularni marker *Fast ruler DNA ladder, low range* (*Fermentas, Lithuania*).

Da bi se izbegla unakrsna kontaminacija, svaka faza dijagnostičkog postupka (od pripreme uzorka do nested - PCR) je rađena u odvojenim prostorijama koje su namenjene PCR dijagnostici, uz primenu odgovarajuće opreme i materijala.

4.2.6. Histopatološko ispitivanje

Za histopatološko ispitivanje uzorkovani su tkivni isečci pluća, vazdušnih kesa, srca, jetre, bubrega i mozga dimenzija $1 \times 1 \times 0,5$ cm gde je bilo moguće izmeriti dimenzije, a zatim fiksirani u 10% neutralnom formalinu. Fiksacija je obavljena u plastičnim bočicama sa širokim grlom i poklopcem u trajanju od 48 do 72 sata. Nakon fiksacije tkivo je obrađeno u automatskom tkivnom procesoru (dehidracija kroz rastuće koncentracije etanola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski blokovi su isečeni pomoću rotacionog mikrotoma na rezove debljine $5 \mu\text{m}$, a zatim obojeni hematoksilin-eozin, Grocott i PAS metodom. Histološki preparati su pregledani optičkim mikroskopom Olympus BX51 uz upotrebu uobičajenih uveličanja (20, 40, 100, 200, 400 i 600 puta). Za morfometrijsku analizu korišćen je morfometrijski softver Olympus Cell B. Digitalne fotografije su napravljene pomoću optičkog mikroskopa Olympus BX51 sa digitalnom kamerom Olympus Color View III.

4.2.7. Statistička analiza rezultata

Za statističku analizu dobijenih rezultata korišćene su osnovne statističke metode, odnosno deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina – \bar{X} , standardna devijacija - SD, standardna greška - SE, minimalna prosečna vrednost - X_{\min} , maksimalna prosečna vrednost - X_{\max} i koeficijent varijacije – CV). Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički značajnih razlika upotrebljena su dva testa. Prvi test, potpuno slučajan plan (ANOVA), je grupni test i na osnovu njega je ustanovljeno eventualno postojanje signifikantnih razlika između posmatranih grupa. Drugi test je pojedinačni test, Tukey test, pomoću kojeg su ustanovljene statistički signifikantne razlike između grupa, pojedinačno. Signifikantnost razlika je određena na nivou značajnosti od 5% i 1%. Svi dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Statistička analiza dobijenih rezultata je izvršena u statističkom paketu *GraphPad Prism 6.01*, u programskom dodatku za *Microsoft Excel 2007*.

5. REZULTATI

5.1. Praćenje telesne mase i zdravstvenog stanja ćurića tokom trajanja ogleda

5.1.1. Telesna masa ćurića oglednih i kontrolnih grupa

Telesna masa ćurića ogledne grupe 1 i ogledne grupe 2 merena je na dan veštačke infekcije, kao i posle dve i tri nedelje od infekcije. Telesna masa ćurića kontrolne grupe 1 i kontrolne grupe 2 merena je u istim vremenskim razmacima (14, 28 i 35. dana starosti) (Tabela 3, Grafikon 1, 2).

Tabela 3. Poređenje vrednosti prosečnih telesnih masa ćurića kontrolnih i oglednih grupa.

Prosečna telesna masa (g) ćurića kontrolnih i oglednih grupa tokom trajanja ogleda				
Grupe Starost (dani) i termini merenja	Kontrolna grupa X±SD		Ogledna grupa X±SD	
	K-1 (n=6)	K-2 (n=6)	O-1 (n=10)	O-2 (n=10)
14.	343±21	338±14	330±22	358±27
28.	1227±80	1130±160*	1142±90*	966±143*
35.	1451±95*	1401± 67	1438±125*	1276±164*

K-1 – ćurići kontrolne grupe - netretirani

K-2 – ćurići kontrolne grupe - tretirani deksametazonom tokom 6 uzastopnih dana

O-1 – ćurići ogledne grupe - inficirani sa *A. fumigatus* sa 14 dana starosti

O-2 – ćurići ogledne grupe - tretirani deksametazonom tokom 6 uzastopnih dana pre inficiranja sa *A. fumigatus*

*–statistički značajna razlika ($P<0,05$) između vrednosti prosečne telesne mase ćurića grupe K-2 i grupe O-2, kao i između prosečne telesne mase ćurića grupe O-1 i O-2 posle 2 nedelje od inficiranja (starost 28 dana).

*–statistički značajna razlika ($P<0,05$) između vrednosti prosečne telesne mase ćurića grupe K-1 i O-2, kao i između posmatranog parametra kod ćurića grupe O-1 i O-2 posle 3 nedelje od inficiranja (starost 35 dana).

Četnaestog dana starosti, prosečna telesna masa ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) iznosila je 343 ± 21 g, a kontrolne grupe 2 (K-2) prosečna telesna masa bila je 338 ± 14 g.

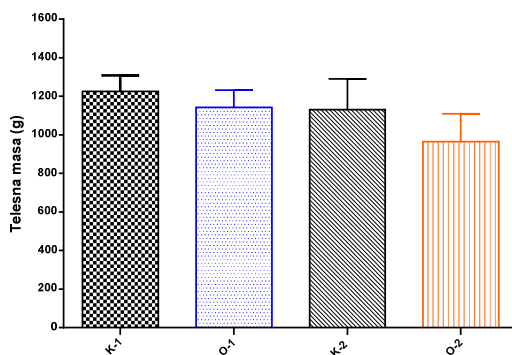
Kod ćurića ogleadne grupe 1 (O-1) prosečna telesna masa četnaestog dana starosti bila je 330 ± 22 g, a kod ćurića ogleadne grupe 2 (O-2) iznosila je 358 ± 27 g (Tabela 3).

Dvadesetmog dana starosti, prosečna telesna masa ćurića grupe K-1 iznosila je 1227 ± 80 g, a kod ćurića grupe K-2 bila je neznatno manja, 1130 ± 160 g.

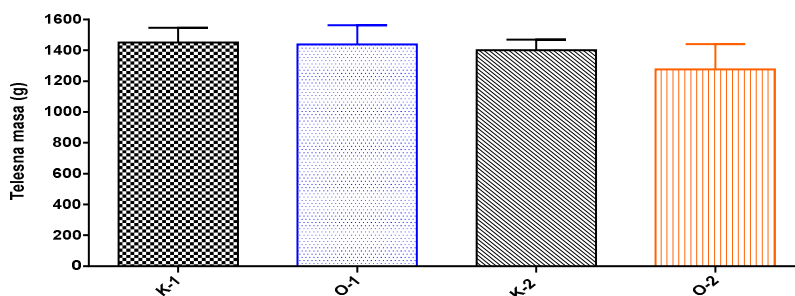
Prosečna telesna masa ćurića grupe O-1 na 28. dan starosti, odnosno posle dve nedelje od veštačkog inficiranja bila je 1142 ± 90 g, a kod ćurića grupe O-2 vrednost ovog parametra bila je statistički značajno manja ($p < 0,05$), i iznosila je 966 ± 143 g (Tabela 3).

Tridesetpetog dana starosti, odnosno tri nedelje posle veštačke infekcije prosečna telesna masa ćurića grupe K-1 bila je 1451 ± 95 g, a ćurića grupe K-2 telesna masa je bila neznatno manja i iznosila je 1401 ± 67 g. Prosečna telesna masa ćurića grupe O-1, u ovom periodu merenja (na kraju ogleada), bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) i iznosila je, 1438 ± 125 g, u poređenju sa telesnom masom od 1276 ± 164 g koja je ustanovljena kod ćurića grupe O-2 (Tabela 3).

Značajno smanjenje ($P < 0,05$) vrednosti prosečne telesne mase ćurića ogleadne grupe 2 u odnosu na vrednost prosečne telesne mase ćurića ogleadne grupe 1 ustanovljeno je posle druge i treće nedelje od inficiranja (Tabela 3, Grafikon 1, 2).



Grafikon 1. Prosečna telesna masa ćurića kontrolne grupe (K-1), ćurića kontrolne grupe tretirane deksametazonom (K-2) sa 28 dana starosti, prosečna telesna masa ćurića ogleadne grupe 1 (O-1) posle 2. nedelje od inficiranja sa *A. fumigatus* (ista starost), i ćurića ogleadne grupe 2 (O-2) tretiranih deksametazonom i inficiranih, ustanovljene posle 2 nedelje od inficiranja.



Grafikon 2. Prosečna telesna masa ćurića kontrolne grupe (K-1), ćurića kontrolne grupe tretirane deksametazonom (K-2) sa 35 dana starosti, prosečna telesna masa ćurića ogledne grupe 1 (O-1) posle 3 nedelje od inficiranja sa *A. fumigatus* (ista starost), i ćurića ogledne grupe 2 (O-2) tretiranih deksametazonom i inficiranih, ustanovljena posle 3 nedelje od inficiranja.

Značajno smanjenje ($P < 0,05$) vrednosti prosečne telesne mase dobijeno je kod ćurića ogledne grupe 2 u drugoj i trećoj nedelji od inficiranja u odnosu na telesnu masu ćurića kontrolne grupe 1 i kontrolne grupe 2 (Tabela 3, Grafikon 1,2).

Dobijena vrednost prosečne telesne mase kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) ustanovljena u starosti od 28 i 35 dana u poređenju sa vrednošću telesne mase ćurića inficirane grupe (O-1) posle druge (starost 28) i treće nedelje (starost 35 dana) od inficiranja ne pokazuju statističku značajnost. Takođe, nije ustanovljena statistički značajna razlika u vrednostima prosečne telesne mase između ćurića kontrolnih grupa K-1 i K-2 posle 28 i 35 dana starosti (Tabela 3; Grafikon 1,2).

Sedmodnevni prirast kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) u starosti od 28 dana iznosio je 442 g, a u poslednjoj nedelji merenja (35. dan starosti) prirast je bio 224g. Sedmodnevni prirast kod ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) u starosti od 28 dana iznosio je 396g, a u poslednjoj nedelji merenja bio je 271g.

Sedmodnevni prirast kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) u prvoj nedelji od infekcije (21. dan starosti) iznosio je 406g, a u trećoj nedelji od infekcije (35. dan starosti) 296g.

Kod ćurića ogledne grupe 2 (O-2) sedmodnevni prirast u prvoj nedelji od infekcije (21. dan starosti) bio je značajno manji (304g) u poređenju sa istim parametrom kod ćurića grupe O-1. U trećoj nedelji nakon infekcije (35. dan starosti) sedmodnevni prirast kod ćurića grupe O-2 iznosio je 310g i bio je neznatno veći u poređenju sa prirastom ćurića grupe O-1.

Analiza rezultata ispitivanja uticaja veštačke infekcije sa *A.fumigatus* na prirast i telesnu masu ćurića pokazuje da izvedena infekcija ne utiče na prirast i prosečnu telesnu masu ćurića, i to kako posle 2. tako i posle 3. nedelje od inficiranja.

Tretman deksametazonom 6 dana pre inficiranja i infekcija su statistički značajno ($P<0,05$) smanjili prirast i prosečnu telesnu masu ćurića, i to, kako posle druge, tako i posle treće nedelje od inficiranja u poređenju sa posmatranim parametrima kod ćurića koji su ili samo inficirani (grupa O-1), samo tretirani deksametazonom (grupa K-2), ili koji nisu tretirani bilo čime, intaktna kontrola (grupa K-1).

5.1.2. Klinička slika kod ćurića veštački inficiranih sa *A. fumigatus* i tretiranih deksametazonom tokom trajanja oglada

Opšte zdravstveno stanje ćurića praćeno je tokom pet nedelja trajanja oglada. Ćurići su posmatrani tri puta dnevno tokom ovog perioda i registrovani su svi vidljivi znaci i simptomi poremećenog zdravlja. Odmah po intratrahealnoj jednokratnoj inokulaciji suspenzije spora ćurićima ogledne grupe 1 i 2, kao i fiziološkog rastvora kontrolnim grupama ćurića (grupa 1, 2) javila se prolazna blaga dispneja verovatno zbog kratkotrajne opturacije stenoze bronhusa od strane inokuluma.

Prvi klinički znaci aspergiloze uočeni su već drugog dana nakon inficiranja ćurića sa *A. fumigatus*. U oglednoj grupi 1, jedna trećina ćurića, a u oglednog grupi 2, dve trećine ćurića skupljena je u grupe. Ćurići su somnolentni, potišteni, neki sa uvučenom glavom i zatvorenim očima i nakostrešenog perja.

Trećeg dana nakon inficiranja ćurići se iz obe ogledne grupe i dalje skupljaju u manje grupe, obično u uglovima boksa, potišteni su, zatvorenih očiju i nakostrešenog perja. Duže vreme provode u ležećem položaju. Ćurići obe ogledne grupe smanjeno konzumiraju hranu (Slika 1, 2, 3).

Četrtog dana od infekcije, kod ćurića obe ogledne grupe primećuje se neveselost, pospanost, opuštenost krila i nakostrešenost perja. U ovom periodu se



Slika 1. Izgled ćurića O-1 grupe, dva dana od veštačkog inficiranja sa *A. fumigatus*. Čurići su bezvoljni, pospani i nakostrešenog perja.



Slika 2. Izgled ćurića O-1 grupe, tri dana od veštačkog inficiranja sa *A. fumigatus*. Čurići su bezvoljni, duže vreme provode u ležećem položaju i sakupljaju se u manje grupe po uglovima boksa.



Slika 3. Izgled ćurića O-2 grupe, četiri dana od veštačkog inficiranja sa *A. fumigatus*. Čurići su pospani ili kunjaju sa izrazito nakostrešenim perjem. Slabo konzumiraju vodu i hranu.



Slika 4. Izgled ćureta O-2 grupe, četiri dana od veštačkog inficiranja sa *A. fumigatus*. Posle četiri dana od infekcije prvi put se zapažaju respiratorne smetnje. Vide se dispneja i disanje na otvoreni kljun (glad za vazduhom).

uočavaju prvi znaci poremećene funkcije respiratornog sistema (dispnoja, tahipnoja, disanje na otvoreni kljun i pojava sekreta iz nosnica praćeni povremenim otresanjem glave (Slika 4, 5). Najupečatljivija klinička simptomatologija primećena je kod 4 ćureta iz ogledne grupe 2. Ovi ćurići pri inspirijumu ekstenziraju vrat i dišu na otvoreni kljun (glad za vazduhom).



Slika 5. Posle četiri dana od veštačke infekcije uočava se disanje na otvoren kljun kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića O-2 grupe.



Slika 6. Izgled ćurića O-2 grupe, 14 dana od veštačkog inficiranja *A. fumigatus* i tretiranih deksametazonom. Slabljenje i izostajanje simptoma poremećene funkcije respiratornog sistema i poremećenog ponašanja.

Navedeni klinički simptomi zapaženi tokom prva četiri dana od infekcije postepeno su slabili ili nestajali tokom narednog perioda trajanja oglada kod ćurića obe ogleadne grupe (Slika 6).

Kod ćurića kontrolnih grupa, tokom oglada, nisu zapaženi bilo kakvi znaci koji bi ukazivali na promenjeno opšte zdravstveno stanje.

Za vreme petonedeljne opservacije ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*, i onih prethodno tretiranih deksametazonom nije ustanovljeno uginuće, kao ni kod ćurića kontrolnih grupa.

5.2. Rezultati patomorfološkog ispitivanja

5.2.1. Patoanatomske promene kod ćurića inficiranih *A. fumigatus*, kao i tretiranih deksametazonom posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od infekcije

5.2.1.1. Makroskopski nalaz kod ćurića inficiranih *A. fumigatus*

Prvog, trećeg, sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od veštačkog inficiranja nisu nađene bilo kakve vidljive patoanatomske promene na unutrašnjim organima (jetra, srce), kao ni na mozgu ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*.

Makroskopskim pregledom 6 žrtvovanih ćurića prvog dana od infekcije kod 3 ćureta je ustanovljena umerena hiperemija kaudalnog dela traheje, neposredno ispred

njene bifurkacije. Oba plućna krila su svetlocrvene boje i nešto jedrije konzistencije (Slika 7). Na kostalnoj površini pluća dobro se ističu otisci rebara. Na preseku pluća ističe malo krvavo - penušave tečnosti. Abdominalne vazdušne kese su bilateralno diskretno zamućene, naročito njihovi kaudalni delovi, ali su bez intraluminalnog sadržaja. Ostale vazdušne kese su sa tankim, sjajnim i prozirnim zidovima.

Trećeg dana od infekcije od 6 žrtvovanih ćurića kod 4 je ustanovljeno difuzno bilateralno zamućenje zidova abdominalne vazdušne kese (Slika 8).

Oba plućna krila su tamno – crvene boje i lako se ekstirpiraju iz interkostalnih prostora. Na kostalnoj površini uočavaju se ograničena područja crvene boje (Slika 9).

Sedmog dana nakon infekcije kod 3 od ukupno 6 žrtvovanih ćurića uočeno je zamućenje i umereno zadebljanje zidova abdominalnih i kaudalnih torakalnih kesa (Slika 10).



Slika 7. Pluća ćurića posle 1. dana od veštačke infekcije (O-1). Pluća su svetlo crvene boje i jedre konzistencije.



Slika 8. Vazdušne kese ćurića posle 3. dana od veštačke infekcije (O-1). Bilateralno zamućenje.



Slika 9. Pluća ćurića posle 3. dana od veštačke infekcije (O-1). Na kostalnoj površini uočavaju se ograničena područja crvene boje.



Slika 10. Vazdušne kese ćurića 7. dana od veštačke infekcije (O-1). Zamućenje i umereno zadebljanje zidova abdominalnih i kaudalnih torakalnih vazdušnih kesa.

Oba plućna krila su tamno - crvene boje i jedre konzistencije (Slika 11). Na preseku ovako promenjenih pluća isticao je krvavo – penušavi sadržaj.

Četnaestog dana od inficiranja nađene su makroskopski vidljive promene na vazдушnim kesama i plućima kod 3 od ukupno 6 žrtvovanih ćurića. Na zidovima abdominalnih, kaudalnih i kranijalnih torakalnih kesu zapažene su promene u vidu jasno lokalizovanih malih beličastih zadebljanja, bez prisustva intraluminalnog sadržaja (Slika 12).

Kod svih 6 ćurića, pluća su uvećana, tamno - crvene boje, zaobljenih rubova i čvrste konzistencije (Slika 13).

Pluća se lako ekstrahiraju iz interkostalnih prostora. Na visceralnoj površini pluća bilateralno kod 2 ćureta ističu se mnogobrojni solitarni ili konfluentni sivo - žuti milijarni noduli, a kod 1 ćureta unilateralno. Na kaudalnom delu kostalne površine pluća vidljiva su dva granuloma – aspergiloma (Slika 14).



Slika 11. Pluća ćurića posle 7. dana od veštačke infekcije (O-1). Plućna krila su tamno-crvene boje i jedre konzistencije.



Slika 12. Vazdušne kese ćurića 14. dana od veštačke infekcije (O-1). Lokalizovana fokalna zadebljanja, bele boje.



Slika 13. Pluća ćurića posle 14. dana od veštačke infekcije (O-1). Uvećanje pluća i hiperemija.



Slika 14. Pluća ćurića 14. dana od veštačke infekcije (O-1). Unilateralno na kaudalnom delu kostalne površine pluća vidljivi su granulomi.

Dvadesetprvog dana od infekcije kod 5 ćurića od ukupno 6 žrtvovanih uočene su makroskopske promene na vazдушnim kesama i plućima. Zidovi abdominalnih i torakalnih kesa su zadebljani, neprozirni sa intraluminalnim bledo – žutim kazeoznim sadržajem koji slepljuje njihove zidove (Slika 15, 16).

Pluća kod svih 6 žrtvovanih ćurića su uvećana, tamno – crvene boje i čvrste konzistencije. Teže se ekstirpiraju zbog adhezije sa torakalnim vazдушnim kesama. Na desnom plućnom krilu, svojom mnogobrojnošću ističu se sivo – žućkasti noduli uniformne veličine (Slika 17, 18, 19).



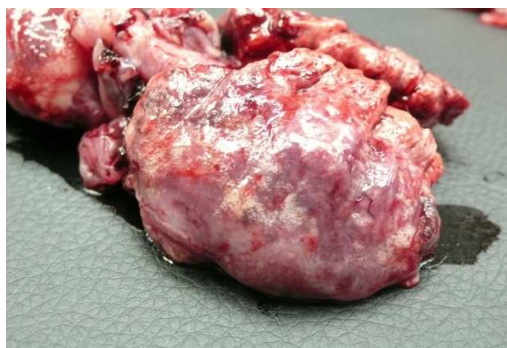
Slika 15. Vazdušne kese ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-1). Zidovi abdominalnih i torakalnih kesa su zadebljani, neprozirni sa intraluminalnim bledo-žutim kazeoznim sadržajem.



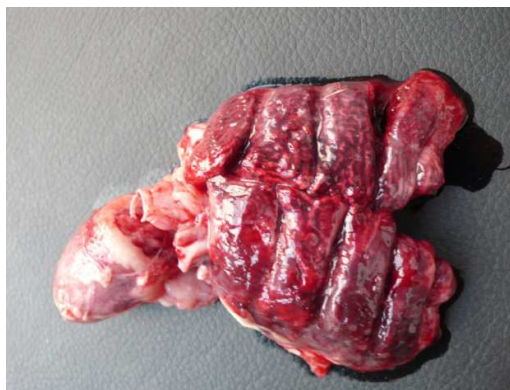
Slika 16. Vazdušne kese ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-1). Zidovi abdominalnih i torakalnih kesa su zadebljani, neprozirni sa intraluminalnim bledo - žutim kazeoznim sadržajem.



Slika 17. Pluća ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-1). Pluća su uvećana sa prisutnim difuzno raspoređenim granulomima.



Slika 18. Pluća ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-1). Pluća su uvećana sa prisutnim difuzno raspoređenim granulomima.



Slika 19. Pluća ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-1). Pluća su uvećana sa prisutnim difuzno raspoređenim granulomima.

5.2.1.2. Makroskopski nalaz kod ćurića inficiranih sa *A. fumigatus* koji su prethodno višekratno tretirani deksametazonom

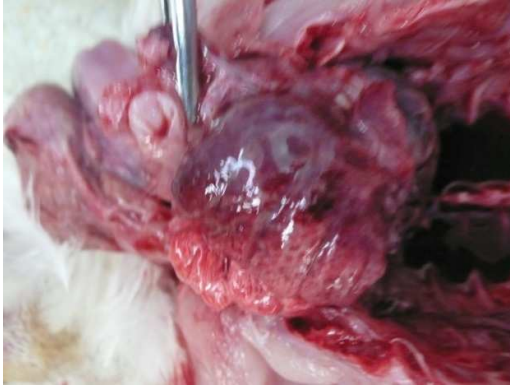
Prvog, trećeg, sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od veštačkog inficiranja nisu nađene bilo kakve vidljive patoanatomske promene na unutrašnjim organima (srce, jetra), kao ni na mozgu ćurića tretiranih deksametazonom tokom 6 uzastopnih dana, a zatim inficiranih sa *A. fumigatus*.

Prvog dana nakon infekcije kod 2 od 6 žrtvovanih ćurića ustanovljena je punokrvnost oba plućna krila. Pluća su bila tamno - crvene boje, zaobljenih rubova i umereno jedre konzistencije (Slika 20).

Abdominalne vazdušne kese su fokalno zamućene. Ostale vazdušne kese su nepromenjene tj. sjajne i prozirne (Slika 21).

Trećeg dana od inficiranja kod 3 od 6 žrtvovanih ćurića ustanovljeno je difuzno zamućenje abdominalnih i kaudalnih torakalnih vazdušnih kesa. Uočena je i slaba punokrvnost njihovih krvnih sudova (Slika 22).

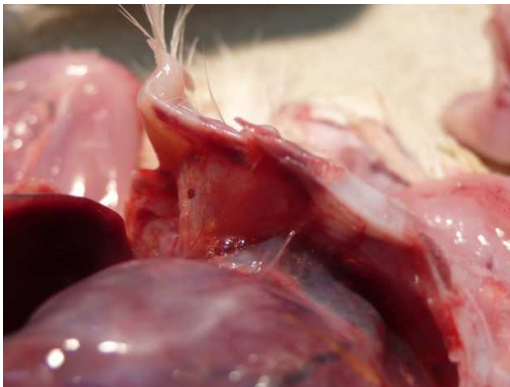
Oba plućna krila su tamno crvene boje i čvrste konzistencije. Na preseku desnog plućnog krila vidljivi su mnogobrojni granulomi - aspergilomi, ujednačene veličine, a na jednom mestu međusobno konfluiraju čineći konglomerat granuloma (Slika 23).



Slika 20. Pluća ćurića 1. dana od veštačke infekcije (O-2). Pluća su tamno - crvene boje, zaobljenih rubova i umereno jedre konzistencije.



Slika 21. Abdominalne vazdušne kese ćurića 1. dana od veštačke infekcije (O-2). Vazdušne kese su fokalno zamućene.



Slika 22. Vazdušne kese ćurića 3. dana od veštačke infekcije (O-2). Difuzno zamućenje abdominalnih i kaudalnih torakalnih vazdušnih kesa. Punokrvnost krvnih sudova na vazдушnim kesama.



Slika 23. Pluća ćurića 3. dana od veštačke infekcije (O-2). Presek desnog plućnog krila, vidljivi su mnogobrojni granulomi – aspergilomi.

Sedmog dana nakon infekcije kod 3 od 6 žrtvovanih ćurića uočeno je zadebljanje i difuzno zamućenje zidova kranijalnih i kaudalnih torakalnih, kao i abdominalnih vazdušnih kesa. Kod 4 od 6 žrtvovanih ćurića pluća su uvećana, tamno - crvene boje. U oba plućna krila na njihovoj kostalnoj površini zapažaju se beličasti milijarni granulomi (Slika 24).

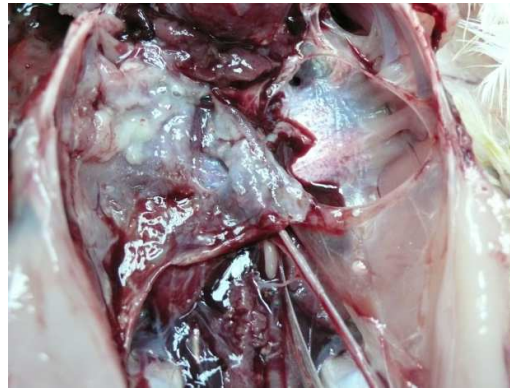
Četrnaestog dana nakon infekcije makroskopski vidljive promene nađene su na zidovima torakalnih i abdominalnih vazdušnih kesa i plućima kod 5 od 6 žrtvovanih ćurića. Zidovi vazdušnih kesa su zadebljani, a kod jednog ćureta intraluminalno u kaudalnoj desnoj torakalnoj kesi vidljiv je mlečno - beli kazeozni sadržaj, dok u

zamućenom zidu leve abdominalne kese prominira solitarni granulom - aspergilom (Slika 25).

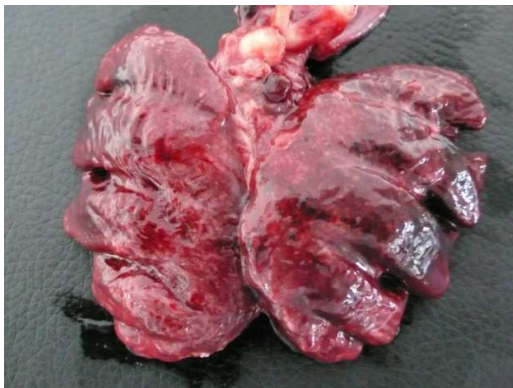
Pluća su uvećana, impresije rebara se jasno ističu, a na površini prosijavaju milijarni i supermilijarni granulomi (Slika 26).



Slika 24. Pluća ćurića 7. dana od veštačke infekcije (O-2). Zapažaju se beličasti milijarni granulomi.



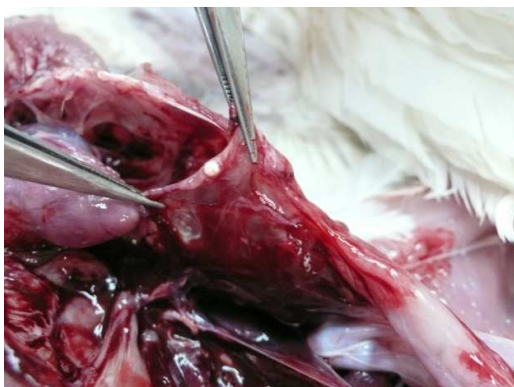
Slika 25. Važdušne kese ćurića 14. dana od veštačke infekcije (O-2). U kaudalnoj desnoj torakalnoj kesi vidljiv je mlečno-beli kazeozni sadržaj, a u zamućenom zidu leve abdominalne kese prominira solitarni granulom - aspergilom.



Slika 26. Pluća ćurića 14. dana od veštačke infekcije (O-2). Pluća su uvećana, prosijavaju milijarni i supermilijarni granulomi.

Dvadesetprvog dana posle infekcije kod 5 od ukupno 6 žrtvovanih ćurića nađene su promene na torakalnim i abdominalnim vazдушnim kesama, i manifestovale su se u vidu difuznog zamućenja i zadebljanja. Kod 2 od 5 ćurića na kranijalnom delu kaudalne kese isticao se jedan okrugli granulom, bele boje (Slika 27, 28).

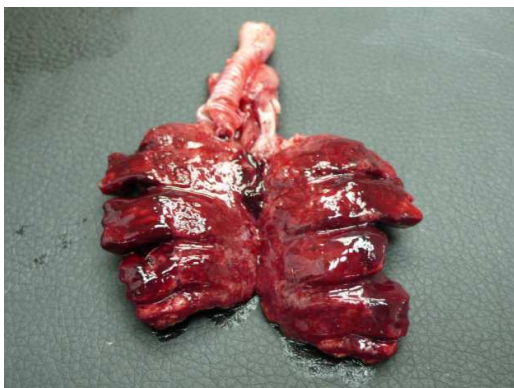
Pluća kod 5 jedinki su umereno povećana, zaobljenih rubova i konsolidovana. Na kostalnoj površini oba plućna krila prosijavaju mnogobrojni granulomi veličine 2×2 mm, a ravnomerno su raspoređeni po svim delovima pluća (Slika 29, 30).



Slika 27. Vazdušne kese ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-2). Na kranijalnom delu kaudalne vazdušne kese isticao se jedan okrugli granulom, bele boje.



Slika 28. Vazdušne kese ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-2). Na kranijalnom delu kaudalne vazdušne kese isticao se jedan okrugli granulom, bele boje.



Slika 29. Izgled pluća ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-2). Na oba krila prosijavaju mnogobrojni granulomi.



Slika 30. Pluća ćurića 21. dana od veštačke infekcije (O-2). Na oba krila prosijavaju mnogobrojni granulomi.

5.2.2. Mikroskopski nalaz

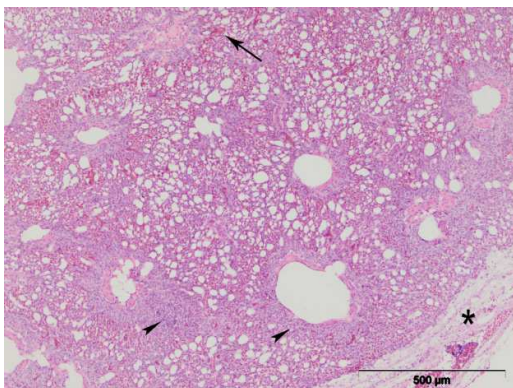
5.2.2.1. Histopatološke promene respiratornog sistema kod ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*

Prvog dana (24 sata) posle infekcije na plućima se uočava zadebljanje pleure usled subpleuralnog nakupljanja serozne tečnosti u kojoj se nalazi manji broj ćelija uglavnom heterofila. Na plućnom parenhimu uočena je difuzna hiperemija i fokalna infiltracija ćelijama u vidu prstena oko parabronhiola oko kojih se infiltrat, u manjoj meri, zrakasto širi u okolni plućni parenhim (Slika 31). Ćelijski infiltrat su sačinjavali: heterofili, makrofage i limfociti (Slika 32). Lumen bronhiola i terminalnih alveola je bio bez stranog sadržaja.

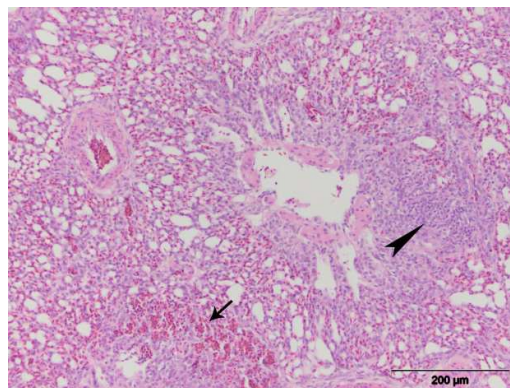
Bronhijalni epitel bio je edematozan sa početnim degenerativnim promenama u vidu vakuolizacije, a subepitelno limfatično tkivo hiperplastično.

Trećeg dana posle infekcije, ćelijski infiltrati u plućima nisu samo ograničeni na parabronhiole već su i u drugim delovima parenhima, formirali jasne noduse, granulome od mononuklearnih ćelija, makrofaga i limfocita. U samim nodusima ili njihovoj neposrednoj okolini mogle su se uočiti 1 do 2 sitnije multinuklearne džinovske ćelije (Slika 33). U ovoj fazi na granulomima nisu zapažene regresivne promene.

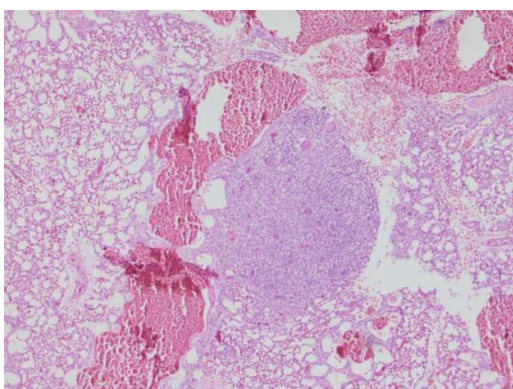
U istom periodu u bronhiolama u propriji mukoze zapaža se nakupljanje heterofila, makrofaga i limfocita koji formiraju čvoriće koji u potpunosti potiskuju žlezdane elemente i prominiraju u lumen bronhiola. U ovom periodu u ćelijskom infiltratu ne zapaža se još uvek jasno prisustvo multijedarnih džinovskih ćelija. Epitel koji prekriva nastale čvoriće je atrofičan i mestimično nedostaje (Slika 34).



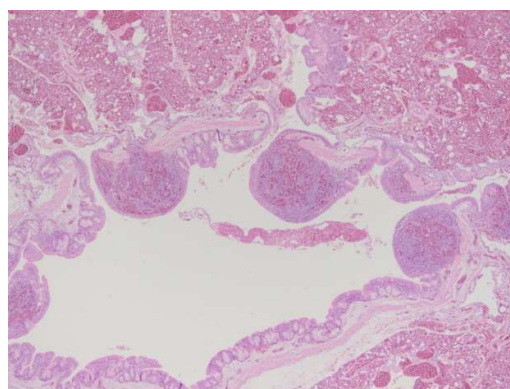
Slika 31. Pluća, O-1, 1. dan p.i. Subpleuralni edem (zvezdica), hiperemija (strelica) i peribronhiolarno nakupljanje ćelija (vrh strelice). (HE).



Slika 32. Pluća, O-1, 1. dan p.i. Detalj sa slike 31. Hiperemija (strelica) i fokalni ćelijski infiltrat (vrh strelice). (HE)



Slika 33. Pluća, O-1, 3. dan p.i. Hiperemija i granulom u parenhimu pluća. Regresivne promene nedostaju. (HE).

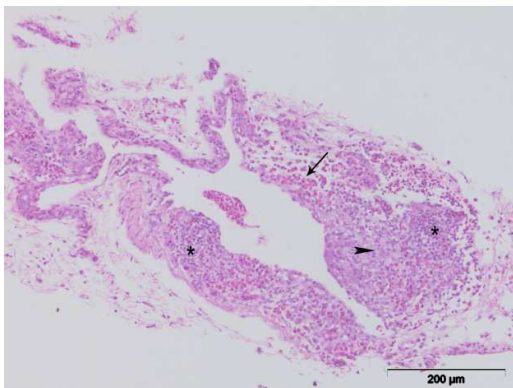


Slika 34. Bronhiola, O-1, 3. dan p.i. Fokalno nakupljanje ćelija u mukozi bronhiola. (HE).

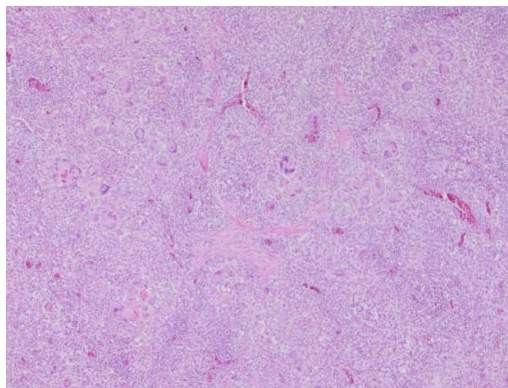
Vazdušne kese su bile zadebljane usled edema i infiltracije heterofilima, makrofagima i limfocitima. Uočava se tendencija infiltriranih ćelija da formiraju noduse, odnosno granulome, ali se u ovoj fazi prisustvo multinuklearnih džinovskih ćelija jasno ne uočava (slika 35). Na mestima intenzivnije infiltracije ćelijama epitel vazdušnih kesa nedostaje.

Sedmog dana posle infekcije u plućima su se zapažali mnogobrojni granulomi koji se u pojedinim područjima i stapaju - konflušu zahvatajući široka područja plućnog parenhima (Slika 36). Centralni deo granuloma čine epiteloidne i džinovske ćelije dok se na periferiji nalaze više limfociti i heterofili. Izuzev pojedinačnih slučajeva, nekrotične promene se u ovoj fazi razvoja oboljenja kod ove grupe životinja

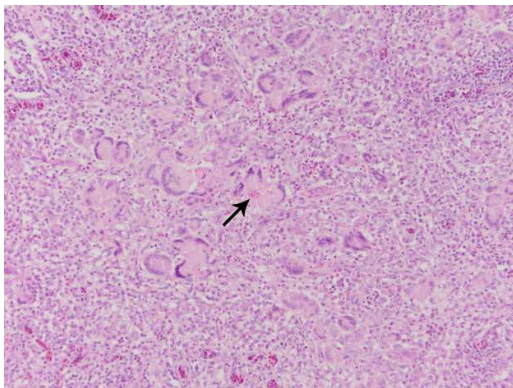
ne uočavaju (Slika 37). Granulomi istovetne građe uočeni su u mukozi bronhiola i na vazдушnim kesama (Slika 38).



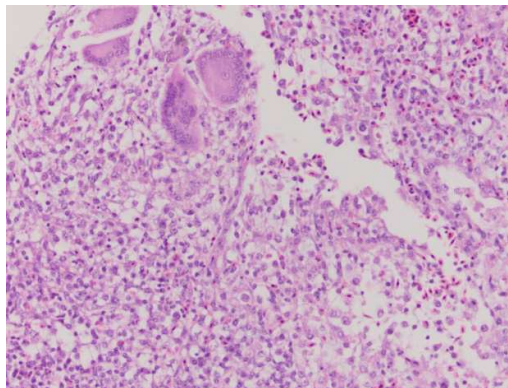
Slika 35. Vazdušne kese, O-1, 3. dan p.i. Zadebljanje vazдушnih kesu usled nakupljanja heterofila (strelica), makrofaga (vrh strelice) i limfocita (zvezdica) - početak formiranja granuloma (HE).



Slika 36. Pluća, O-1, 7. dan p.i. Konfluisani granulomi u plućima. Multijedarne džinovske ćelije prisutne u velikom broju. (HE).



Slika 37. Pluća, O-1, 7. dan p.i. Detalj sa prethodne slike, veliki broj multijedarnih ćelija i početne nekrotične promene (strelica). (HE).

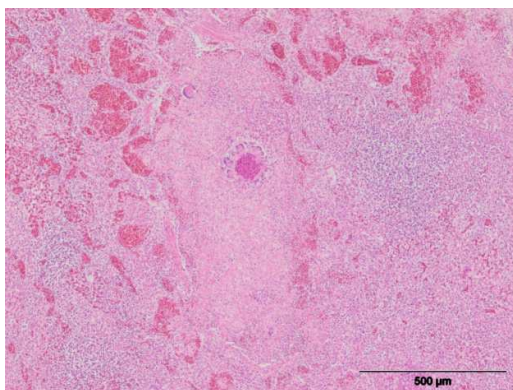


Slika 38. Vazдушna kesa, O-1, 7. dan p.i. Granulom na vazdušnoj kesi. (HE).

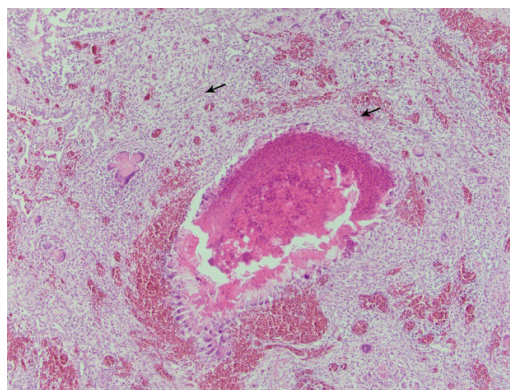
Četrnaestog dana u plućima je zapažen veći broj granuloma kao i difuzna infiltracija makrofagama, limfocitima i heterofilima. Na većini granuloma došlo je do nekrotičnih promena koje zauzimaju centralni deo granuloma homogenog eozinofilnog izgleda u čijem središtu su se mogli zapaziti i ostaci ćelijskih jedara. Nekrotična područja bila su opasana vencem od multinuklearnih višejedarnih ćelija, a prema periferiji širio se intenzivan infiltrat sačinjen od makrofaga, heterofila i limfocita (Slika 39). U neposrednoj blizini ovakvih promena zapaženo je područje intenzivne hiperemije.

Regresivne promene uočene su i na granulomima koji su se nalazili na vazдушnim kesama.

Dvadesetprvog dana promene u plućima i vazдушnim kesama bile su po intenzitetu i karakteru slične već prethodno opisanim, izuzev nekrotičnih promena koje su u većini slučajeva bile intenzivnije. Nekrotična područja zauzimala su veći deo granuloma, takođe su bila centralno postavljena i po pravilu oivičena mnogobrojnim multijedarnim džinovskim ćelijama poređanim u vidu venca. Na periferiji granuloma bilo je moguće uočiti formiranje, odnosno prisustvo mreže vezivnotkivnih vlakana (Slika 40).



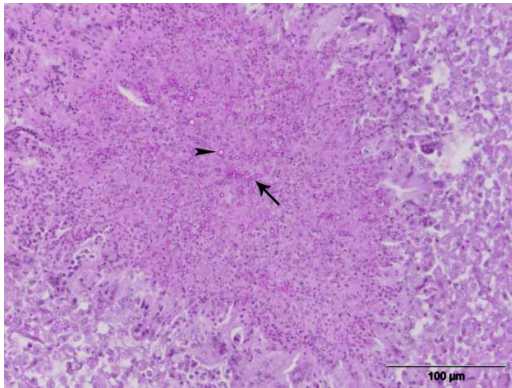
Slika 39. Pluća, O-1, 14. dan p.i.
Nekrotične promene na granulomu (HE).



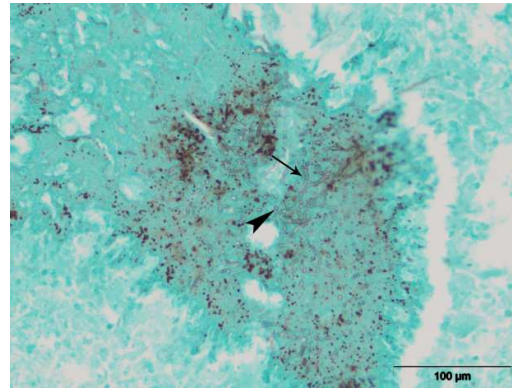
Slika 40. Pluća, O-1, 21. dan p.i. Opsežna nekroza u mikotičnom granulomu. Na periferiji granuloma formiranje fibroznih vlakana (strelica) (HE).

Gljivični elementi u vidu hifa i konidija bili su prisutni i uočljivi u promenjenim područjima pluća i vazдушnih kesa. Prisustvo gljivica, naročito hifa, moglo se uočiti i rutinskim bojenjem sa HE, ali je još očiglednije bilo u isečcima bojenim PAS i Grocott metodom. Najveći broj gljivica, kako hifa, tako i konidija bilo je locirano u plućima ćurića žrtvovanih 7. i 14. dana od inficiranja. One su zauzimala centralni deo granuloma, a naročito su bile prisutne u području nekroze (Slike 41, 42). Takođe, bile su prisutne i u multinuklearnim džinovskim ćelijama. U citoplazmi ovih ćelija gljivice se vide kao filamentozne izdužene strukture ili kao zrnasti do prašnasti ostaci posle razlaganja. Zastupljenost gljivica u makrofagama naročito je bila izražena u starijim opsežnim granulomima kod jedinki žrtvovanih 21. dana (Slike 43, 44).

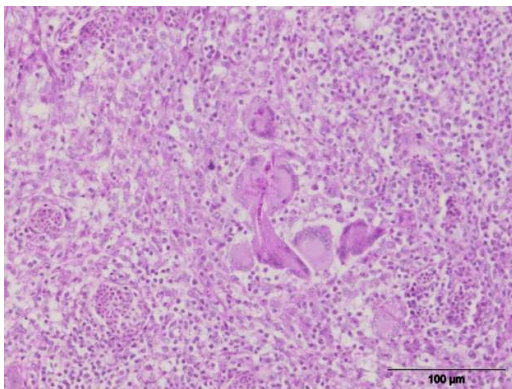
U ostalim ispitivanim organima, kod ove grupe ćurića nisu nađene patohistološke promene.



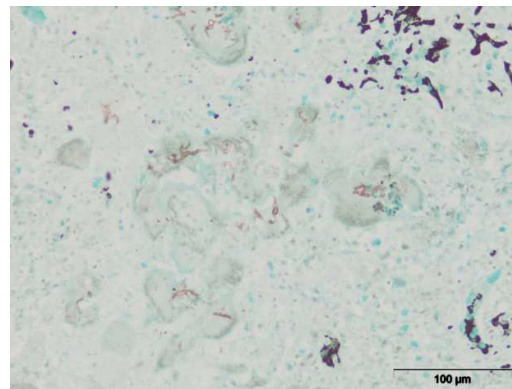
Slika 41. Pluća, O-1, 14. dan p.i. Hife (strelica) i konidije (vrh strelice) u nekrotičnoj masi granuloma. (PAS).



Slika 42. Pluća, O-1, 14. dan p.i. Hife (strelica) i konidije (vrh strelice) u nekrotičnoj masi granuloma. (Grocott).



Slika 43. Pluća, O-1, 21. dan p.i. Hife i konidije u multijedarnim džinovskim ćelijama (PAS).



Slika 44. Pluća, O-1, 21. dan p.i. Hife i konidije u multijedarnim džinovskim ćelijama (Grocott).

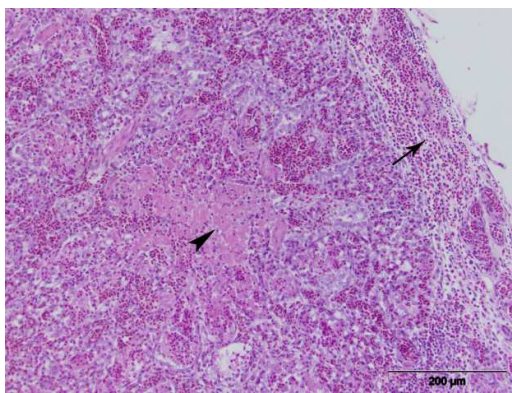
5.3.1.1. Mikroskopski nalaz kod ćurića inficiranih sa *A. fumigatus* koji su prethodno tretirani deksametazonom (O-2 grupa)

Prvog dana posle infekcije kod ove grupe ćurića uočeno je zadebljanje pleure usled edema i infiltracije velikim brojem heterofila i manjim brojem makrofaga i limfocita. Plućni parenhim je bio hiperemičan, takođe infiltrovan heterofilima, makrofagama i limfocitima. U alveolama pojedinih područja moglo se zapaziti nakupljanje homogenog, eozinofilnog supstrata (Slika 45).

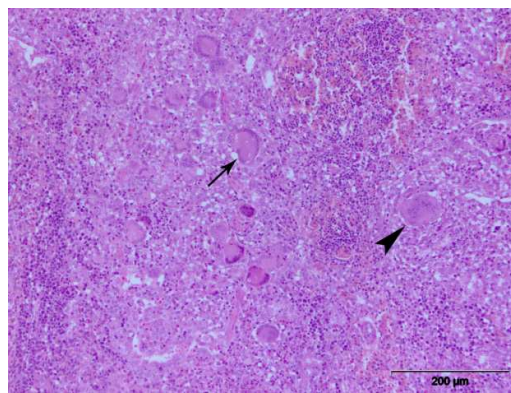
Trećeg dana nakon infekcije, u plućima ćurića mogli su se uočiti jasno formirani granulomi izgrađeni od većeg broja jasno definisanih multijedarnih džinovskih ćelija, epiteloidnih ćelija, makrofaga, limfocita i heterofila. Multijedarne džinovske ćelije bile

su različite veličine i oblika, tako da su se u istom granulomu mogle zapaziti ćelije tipa Langhans i ćelije tipa stranog tela (Slika 46). Na manjem broju granuloma uočene su početne (diskretne) regresivne promene sa središnjom nekrozom koju su najčešće radijalno okruživale multijedarne džinovske ćelije stvarajući ćelijski venac (Slika 47).

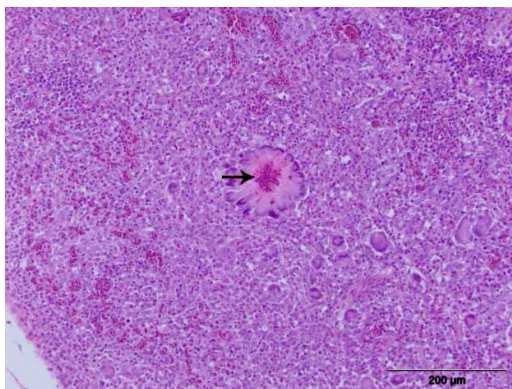
U istom periodu u mukozi bronha i bronhiola uočeni su granulomi istovetne građe kao oni u parenhimu pluća, sa jasno formiranim multijedarnim džinovskim ćelijama (Slika 48). Lumen bronhiola bio je ispunjen homogenim sluzavim sadržajem u kome su se nalazile brojne ćelije, pretežno heterofili i manji broj limfocita.



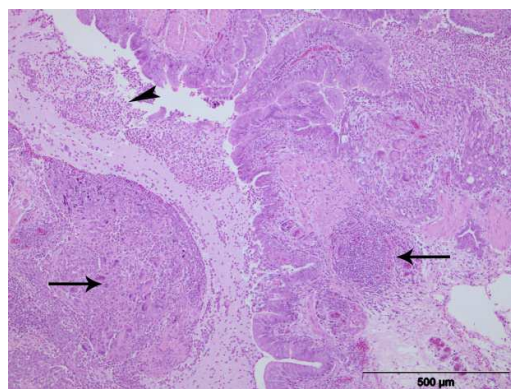
Slika 45. Pluća, O-2, 1. dan p. i. Edem i ćelijska infiltracija pleure (strelica). Infiltracija parenhima pluća i homogeni sadržaj u alveolama (vrh strelice) (HE).



Slika 46. Pluća, O-2, 3. dan p.i., formirani granulomi od multijedarnih džinovskih ćelija, epitelioidnih ćelija i limfocita. Džinovska ćelija tipa Langhans (strelica) i džinovska ćelija tipa stranog tela (vrh strelice). (HE).



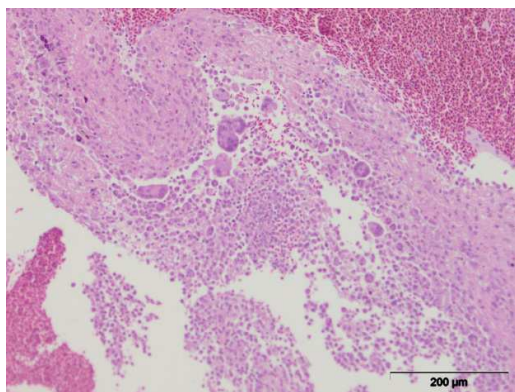
Slika 47. Pluća, O-2. 3. dan p.i. Malo nekrotično područje (strelica) sa vencem od multijedarnih džinovskih ćelija. (HE).



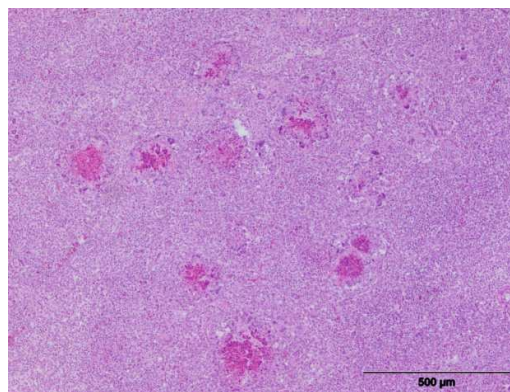
Slika 48. Bronhus, O-2. 3. Dan p.i. Granulomi (strelica) u mukozi (levo) i submukozi (desno), u lumenu homogeni sadržaj i veliki broj ćelija (vrh strelice). (HE).

Promene na vazдушnim kesama kod ove grupe žrtvovanih ćurića ispoljavale su se u vidu difuznog zadebljanja usled edema i intenzivne infiltracije heterofilima, makrofagama, epitelojdnim i multijedarnim džinovskim ćelijama (Slika 49). Granulomi nisu bili jasno ogranićeni, a ni nekrotićna područja nisu bila jasno ispoljena.

Sedmog dana posle infekcije ispitivani delovi pluća su bili konsolidovani gusto infiltrovani ćelijama koje su formirale konfluentne granulome. Centralne delove granuloma ispunjavala je eozinofilna nekrotićna masa u kojoj su se mogli zapaziti ostaci ćelijskog detritusa (Slika 50). Nekrotićna masa je takođe bila oivićena vencem multijedarnih džinovskih ćelija. Nekrotićne promene u ovom periodu takođe su bile izražene na granulomima smeštenim u mukozi i submukozi bronhusa i bronhiola.



Slika 49. Vazdušne kese, O-2, 3. dan p.i. Infiltracija heterofilima, makrofagama epitelojdnim i multijedarnim džinovskim ćelijama. (HE).

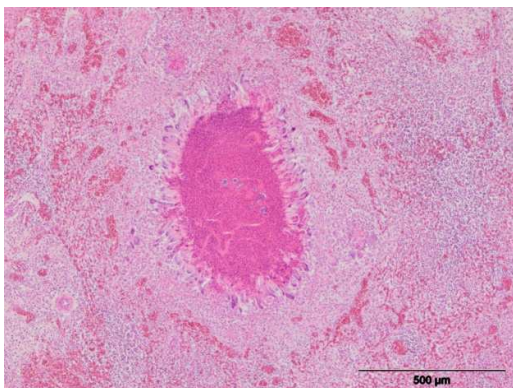


Slika 50. O-2, 7. dan p.i. Konfluentni granulomi sa nekrotićnim centrom. (HE).

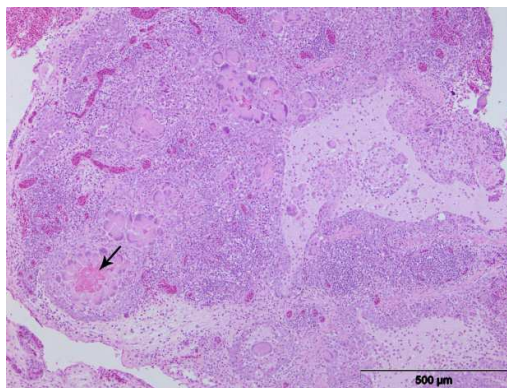
Ćetnaestog dana posle infekcije granulomi su bili slićne građe i izgleda kao i kod ćurića žrtvovanih u prethodnom vremenskom periodu. Primetna razlika je bila u velićini nekrotićnog područja koje je u ovom periodu zahvatalo veći deo granuloma. Eozinofilna nekrotićna masa je postajala skoro homogena, ostaci ćelijskih jedara bili su slabije uoćljivi (Slika 51).

Vazdušne kese bile su jako zadebljane, prožete granulomima koji su se stapali. U centralnim delovima granuloma nekrotićne promene bile su jasno uoćljive (Slika 52).

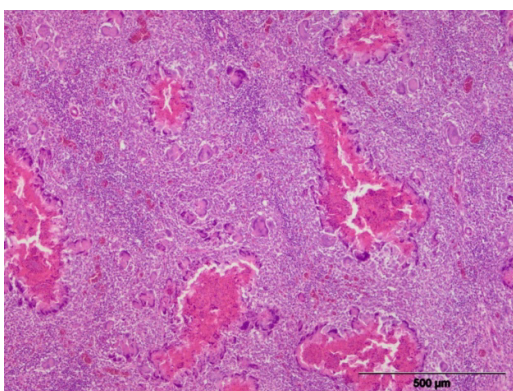
Dvadesetprvog dana posle infekcije promene u plućima i vazдушnim kesama su uznapredovale i po broju i po obimu. U žrtvovanih ćurića uoćen je veći broj konfluentnih granuloma sa opsežnim nekrozama (Slika 53).



Slika 51. Pluća, O-2, 14. dan p.i. Opsežna nekroza u centralnom delu granuloma. (HE).



Slika 52. Vazdušne kese, O-2, 14. dan p.i. Zadebljanje vazdušnih kesa usled infiltracije ćelijama i formiranja granuloma, na kojima se uočava nekroza (strelica). (HE).



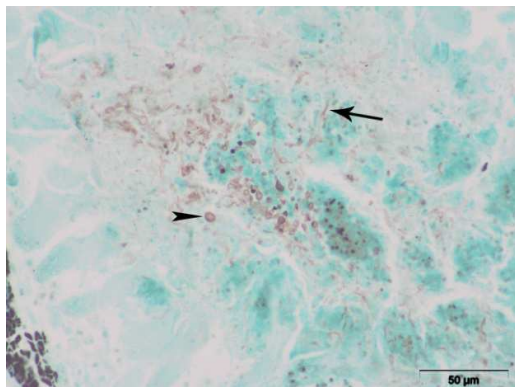
Slika 53. Pluća, O-2, 21. dan p.i. Konfluisani granulomi sa opsežnim centralnim nekrozama. (HE).

Gljivični elementi, hife i konidije, bile su uočljive od prvog dana posle infekcije. Gljivice su mogle biti uočene slobodno između infiltriranih ćelija, u nekrotičnim područjima granuloma, kao i u citoplazmi multijedrnih džinovskih ćelija (Slike 54, 55).

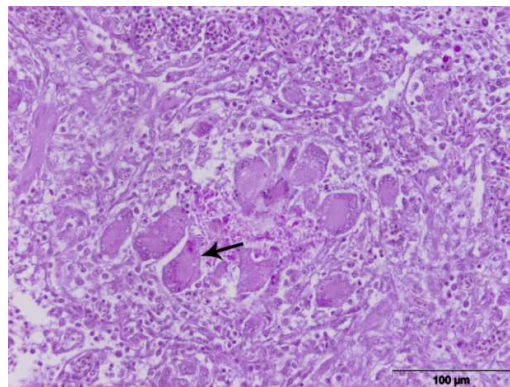
Na drugim ispitivanim organima i u ovoj grupi, kao i u prethodnoj, nisu uočene histopatološke promene.

Upoređujući histopatološki nalaz na respiratornim organima kod ćurića obe eksperimentalne grupe (O-1 i O-2) može se konstatovati da postoje razlike u evoluciji, karakteru i intenzitetu uočenih promena. Promene nastale u respiratornim organima kod inficiranih i dexametazonom tretiranih ćurića nastaju ranije, jačeg su intenziteta, tj.

obimnijeg su karaktera. Takođe, i regresivne promene su obimnije i ranije nastaju u poređenju sa promenama uočenim kod ćurića koji su samo inficirani sa *A. fumigatus*.



Slika 54. Pluća, O-2, 7. dan p.i. Veliki broj hifa (strelica), konidija (vrh strelice) u granulomu (Grocott).



Slika 55. Pluća, O-2, 14. dan, p.i. Ostaci gljivica u citoplazmi multijedarnih džinovskih ćelija (strelica) (PAS).

5.3. Rezultati mikoloških ispitivanja

5.3.1. Rezultati mikoloških ispitivanja delova unutrašnjih organa ćurića veštački inficiranih *A. fumigatus* posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije

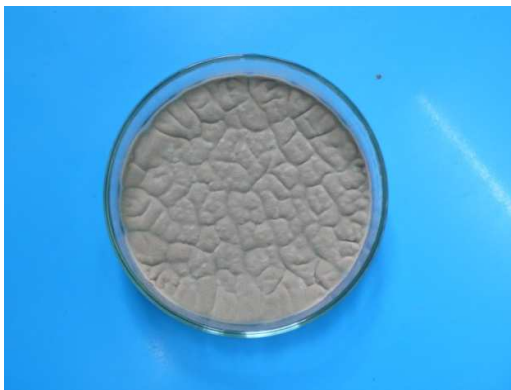
Uzorci delova unutrašnjih organa ispitivani su od svakog pojedinačnog ćureta. Istovremeno sa uzorkovanim organima ispitivan je i referentni soj *Aspergillus fumigatus* kojim je izazvana eksperimentalna infekcija, kako bi dobijeni rezultati mogli da se uporede. Referentni soj *A. fumigatus* ATCC 204305 i njegov rast na Sabouraud dekstroznom agaru prikazan je na slikama (Slika 56, 57, 58, 59).



Slika 56. Referentni soj, *A. fumigatus* 204305.



Slika 57. Referentni soj, izgled kolonija referentnog soja *A. fumigatus* 204305 na Sabouraud dekstroznom agaru posle inkubacije od 48h.



Slika 58. Referentni soj, izgled kolonija referentnog soja *A. fumigatus* 204305 na Sabouraud dekstroznom agaru posle inkubacije od 48h.



Slika 59. Izgled kolonija referentnog soja *A. fumigatus* 204305 na Sabouraud dekstroznom agaru posle inkubacije od 96h.

Uzorkovani delovi organa za mikološko ispitivanje su inokulisani na Sabouraud dekstrozni agar i inkubisani na temperaturi od 25 °C u aerobnim uslovima, a u svrhu izolacije infektivnog agensa. Nakon inkubacije od 72h očitavani su rezultati (Slika 60).

Kolonije *A. fumigatus* bile su najpre bele boje, a zatim plavičasto - zelene kada su konidije počinjale da sazrevaju, posebno u sredini kolonije. Daljim sazrevanjem kolonije su dobijale sivo - zelenu boju, dok su im rubovi ostajali beličasti. Njihov prečnik kretao se od 3-5cm (Slika 61).

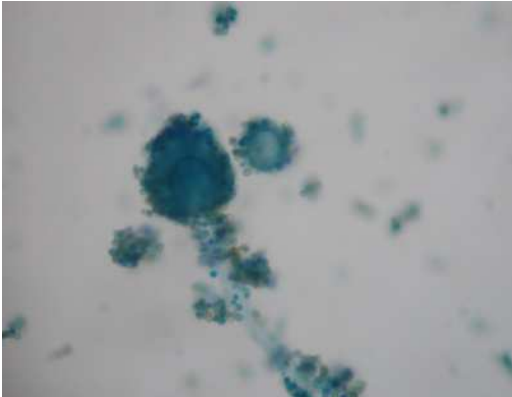
Mikološki nalaz dobijen posle zasejavanja uzoraka delova unutrašnjih organa (pluća i vazdušne kese, srce, jetra, mozak) ćurića žrtvovanih prvog, trećeg, sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od veštačke infekcije, proveravan je metodom bojenja Lactophenol cotton blue u cilju potvrde morfoloških karakteristika *Aspergillus fumigatus* (Slika 62).



Slika 60. Izgled kolonija *A. fumigatus* na Sabouraud dekstroznom agaru izraslih iz pluća, jetre i srca veštački inficiranih ćurića.



Slika 61. Tipičan izgled rasta kolonija *A. fumigatus* izolovanog iz pluća i vazdušnih kesa veštački inficiranih ćurića.



Slika 62. *Aspergillus fumigatus* bojen sa Lactophenol cotton blue

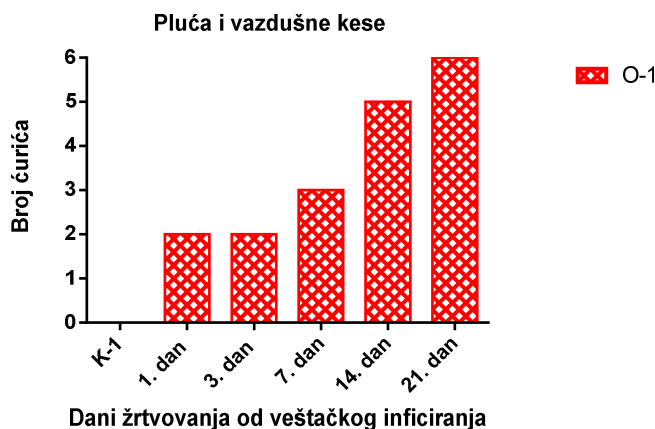
Mikološkim ispitivanjem obuhvaćeni su uzorci organa (pluća i vazdušne kese, srce, jetra, mozak) ćurića inficiranih (O-1; O-2) i kontrolnih (K-1; K-2) grupa. *Aspergillus fumigatus* nije izolovan ni iz jednog uzorka organa ćurića kontrolnih grupa, niti bilo koji drugi patogeni prouzrokovali.

Prvog dana od infekcije, kod 2 ćureta od ukupno 6 žrtvovanih (33,33%) izolovan je *A. fumigatus* iz uzoraka pluća i vazdušnih kesa.

Trećeg dana od infekcije prouzrokovač je izolovan takođe kod 2 od ukupno 6 ćurića (33,33%), sedmog dana *A. fumigatus* je izolovan kod 3 od ukupno 6 jedinki (50%) iz uzoraka pluća i vazdušnih kesaa, a četrnaestog dana kod 5 od 6 ćurića (83,33%).

Dvadesetprvog dana od infekcije, *A. fumigatus* je izolovan kod svih 6 žrtvovanih ćurića (100%). Iz pluća i vazdušnih kesaa ćurića kontrolne grupe 1 nije izolovan *A. fumigatus* posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana žrtvovanja.

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih uzorkovanjem pluća i vazdušnih kesaa od po 6 ćurića iz kontrolne i ogleadne grupe na svaki dan žrtvovanja, može se zaključiti da je izolacija uzročnika *A. fumigatus* bila već posle prvog do trećeg dana od inficiranja kod oko trećine inficiranih jedinki, a posle tri nedelje izolacija uzročnika bila je kod svih. Prouzrokovač nije bio izolovan iz uzoraka pluća i vazdušnih kesaa ni kod jedne jedinice kontrolne grupe žrtvovanih 1, 3, 7, 14 i 21 dana (Grafikon 3).

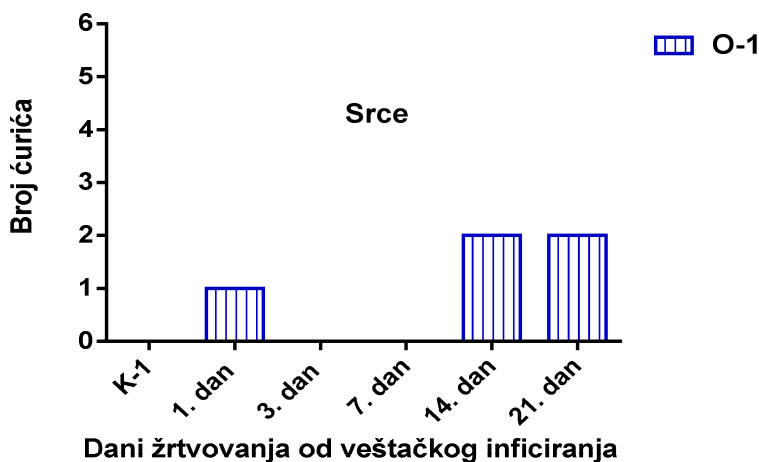


Grafikon 3. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih ćurića iz čijih je uzoraka pluća i vazdušnih kesaa izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja, grupa O-1, kao i rezultat izolacije prouzrokovača iz navedenih uzoraka organa ćurića kontrolne grupe (K-1).

Rezultati mikoloških ispitivanja pokazuju da je *A. fumigatus* izolovan iz srca već prvog dana od infekcije, ali samo kod 1 od 6 inficiranih žrtvovanih ćurića (16,66%) (Grafikon 4).

Trećeg i sedmog dana od infekcije uzročnik nije izolovan iz srca ni kod jednog ćureta od ukupno 6 žrtvovanih. Četrnaestog dana od infekcije iz uzoraka srca kod 2 ćureta od ukupno 6 žrtvovanih (33,33%), izolovan je *A. fumigatus*. Dvadesetprvog dana prouzrokovač je izolovan iz srca takođe kod 2 od ukupno 6 ćurića (33,33%).

Iz srca ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) nije izolovan *A. fumigatus*, niti bilo koji patogeni prouzrokovač u bilo kom vremenu žrtvovanja (1, 3, 7, 14 i 21 dan).



Grafikon 4. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih ćurića iz čijih je uzoraka srca izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja, grupa O-1, kao i rezultat izolacije prouzrokovača iz srca ćurića kontrolne grupe 1 (K-1).

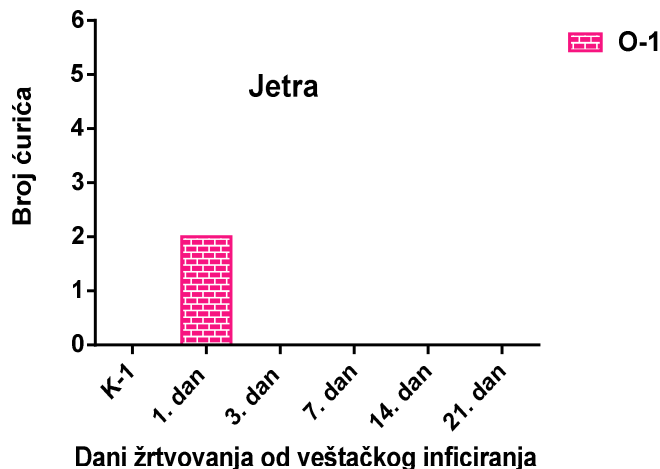
Prvog dana od infekcije, kod 2 od ukupno 6 (33,33%) žrtvovanih ćurića iz uzoraka jetre izolovan je *A. fumigatus*. Trećeg, sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od infekcije ni kod jednog ćureta iz uzoraka jetre nije izolovan *A. fumigatus*.

Kod ćurića kontrolne grupe iz uzoraka jetre nije izolovan *A. fumigatus*, niti bilo koji patogeni prouzrokovač u bilo kom vremenu žrtvovanja (1, 3, 7, 14 i 21 dan).

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih ispitivanjem jetre inficiranih ćurića može se zapaziti da je izolacija uzročnika *A. fumigatus* iz ovog organa moguća kod oko 30% jedinki već posle prvog dana od infekcije. U kasnijim periodima od infekcije iz uzoraka jetre nije bilo moguće izolovati *A. fumigatus* (Grafikon 5).

Na grafikonu 5 prikazani su rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka jetre ćurića inficirane ogledne grupe 1 (O-1) posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije, kao i

rezultati izolacije *A. fumigatus* iz navedenih uzoraka jetre kontrolne grupe 1 (K-1) posle 1, 3, 7, 14 i 21 dana žrtvovanja.



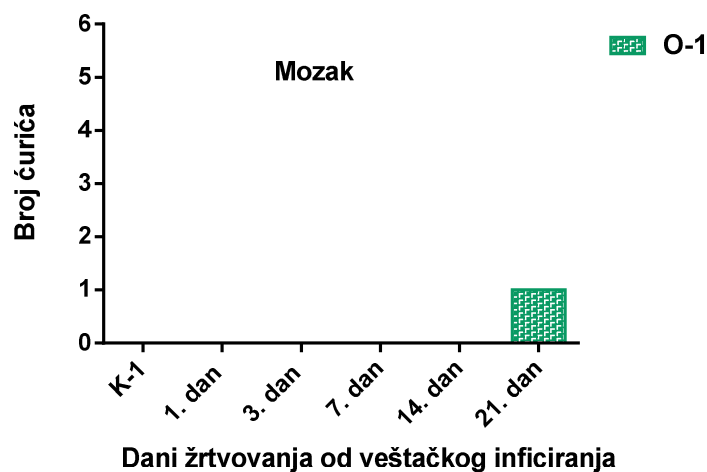
Grafikon 5. Stubićem je prikazan broj žrtvovanih ćurića iz čijih je uzoraka jetre izolovan *A. fumigatus* posle 1. dana od inficiranja. Prikazani su rezultati izolacije uzročnika posle 3., 7., 14. i 21. dana od inficiranja (ogledna grupa 1; O-1), kao i rezultati izolacije prouzrokovala iz uzoraka jetre ćurića kontrolne grupe 1 (K-1).

Rezultati mikoloških ispitivanja pokazuju da iz uzoraka mozga inficiranih ćurića uzetih prvog, trećeg, sedmog i četrnaestog dana od infekcije nije bilo moguće izolovati *A. fumigatus* ni kod jednog ćureta. Dvadesetprvog dana od infekcije iz uzoraka mozga kod jednog ćureta, od ukupno 6 (16,66%) izolovan je *A. fumigatus*.

Kod ćurića kontrolne grupe 1 iz uzoraka mozga nije izolovan *A. fumigatus* 1, 3, 7, 14 i 21 dana žrtvovanja.

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih uzorkovanjem mozga inficiranih ćurića može se zapaziti da je izolacija *A. fumigatus* iz ovog organa izostala u prve dve nedelje od infekcije, a kod oko 16% jedinki *A. fumigatus* je izolovan posle tri nedelje od infekcije (Grafikon 6).

Na grafikonu 6 prikazani su rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka mozga ćurića ogledne grupe 1 (O-1) posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije, kao i rezultati izolacije *A. fumigatus* iz navedenih uzoraka mozga ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) posle 1, 3, 7, 14 i 21 dana žrtvovanja.



Grafikon 6. Stubićem je prikazan broj žrtvovanih ćurića iz čijih je uzoraka mozga izolovan *A. fumigatus* posle 21. dana od inficiranja. Prikazani su rezultati izolacije uzročnika iz uzoraka delova mozga 1., 3., 7. i 14. dana od inficiranja (ogledna grupa 1; O-1), kao i rezultati izolacije uzročnika iz uzoraka mozga ćurića kontrolne grupe 1 (K-1).

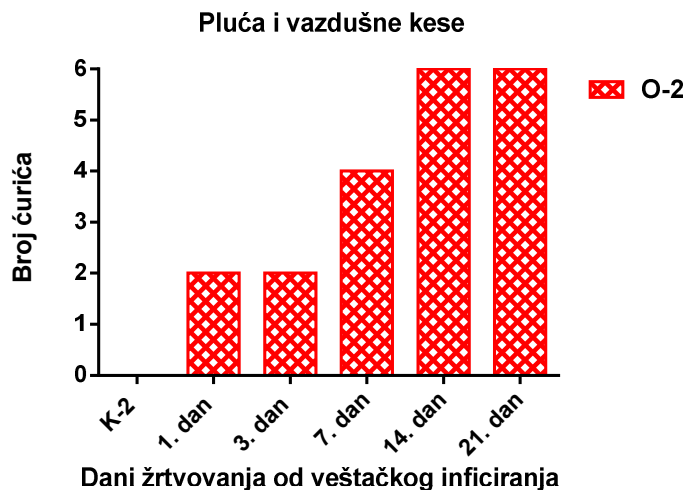
5.3.2. Rezultati mikoloških ispitivanja uzoraka delova unutrašnjih organa ćurića višekratno tretiranih deksametazonom dobijeni posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije sa *A. fumigatus*

Uzorci unutrašnjih organa (pluća i vazdušne kese, srce, jetra, mozak) ćurića kontrolne grupe 2 (K-2), koji su u starosti od osam dana tretirani deksametazonom, jednom dnevno, tokom narednih šest uzastopnih dana. Uzorci navedenih organa ispitivani su kod svakog pojedinačnog ćureta žrtvovanog 1., 3., 7., 14. i 21. dana.

Prvog dana od inficiranja, kod 2 ćureta (33,33%) od ukupno 6 žrtvovanih izolovan je *A. fumigatus* iz uzoraka pluća i vazdušnih kesa. Trećeg dana od inficiranja prouzrokovač je izolovan takođe kod 2 ćureta (33,33%) od ukupno 6 (Grafikon 7). Sedmog dana od inficiranja prouzrokovač *A. fumigatus* je izolovan iz pluća i vazdušnih kesa kod 4 (66,66%) od ukupno 6 jedinki, a četrnaestog dana kod svih 6 ćurića (100 %) od ukupno 6 žrtvovanih (Grafikon 7). Dvadesetprvog dana od infekcije, iz pluća i vazdušnih kesa *A. fumigatus* je izolovan takođe kod svih 6 žrtvovanih ćurića (100 %).

Na grafikonu 7 prikazani su rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka delova organa pluća i vazdušnih kesa kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2)

dobijeni nakon 1, 3, 7, 14. i 21. dana od inficiranja, kao i rezultati izolacije prouzrokovaca iz navedenih organa ćurića tretiranih samo deksametazonom (K-2).



Grafikon 7. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića iz čijih je uzoraka pluća i vazdušnih kesa izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (grupa O-2), kao i rezultat izolacije prouzrokovaca iz navedenih uzoraka organa ćurića kontrolne grupe (K-2), tretirane samo deksametazonom.

Iz pluća i vazdušnih kesa ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) nije izolovan *A. fumigatus* niti bilo koji drugi patogeni prouzrokovac u bilo kom vremenu žrtvovanja.

Na osnovu dobijenih rezultata mikoloških ispitivanja uzoraka delova pluća i vazdušnih kesa ćurića inficiranih i tretiranih deksametazonom, može se zaključiti da je izolacija uzročnika *A. fumigatus* iz ovih organa bila moguća posle prvog do trećeg dana od inficiranja, kod istog broja ćurića obe ogledne grupe (O-1, O-2). Zapaža se da se broj izolata *A. fumigatus* iz pluća i vazdušnih kesa neznatno povećavao kod inficiranih ćurića tretiranih deksametazonom (O-2), i to 7. dana od inficiranja (kod 4/6) i 14. dana (kod 6/6) u odnosu na broj izolata kod ćurića koji su samo inficiranih (O-1) u istom periodu od inficiranja (7. dana kod 3/6; a 14. dana kod 5/6) (Grafikon 3, 7). Broj izolata *A. fumigatus* iz pluća i vazdušnih kesa dobijen kod inficiranih i inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića raste sa protokom vremena od trenutka inficiranja. Kod neznatno većeg broja inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića uzročnik je posle prve i druge nedelje od inficiranja izolovan iz pluća i vazdušnih kesa, u poređenju

sa inficiranim ćurićima. Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja uzoraka pluća i vazdušnih kesica ćurića tretiranih deksametazonom i inficiranih *A. fumigatus* (O-2), kao i samo inficiranih (O-1) može se zapaziti da je izolacija *A. fumigatus* moguća već posle prvog do trećeg dana od inficiranja, a broj izolata iz pluća i vazdušnih kesica, u ovom periodu posmatranja, bio je isti (Grafikoni 3, 7).

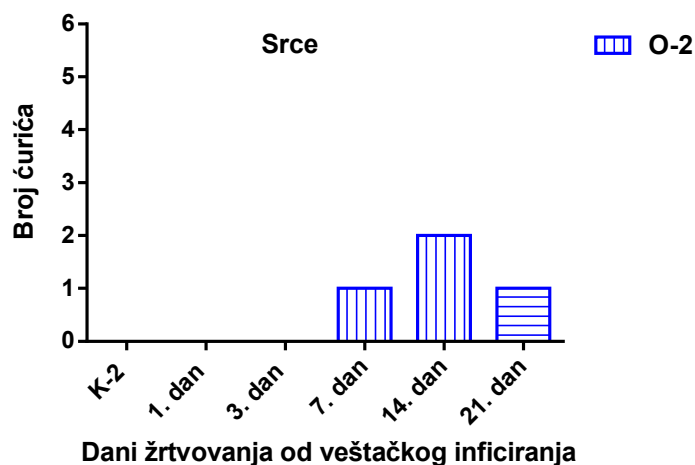
Prouzrokovatelj nije bio izolovan iz uzoraka pluća i vazdušnih kesica ni kod jednog ćureta višekratno tretiranog deksametazonom (kontrolna grupa 2), u bilo kom vremenu žrtvovanja (1, 3, 7, 14 i 21 dan).

Prvog i trećeg dana od infekcije, ni kod jednog ćureta nije izolovan *A. fumigatus* iz uzoraka srca. Sedmog dana, prouzrokovatelj je izolovan kod 1 ćureta (16,66%) od ukupno 6 žrtvovanih ćurića, a četrnaestog dana od infekcije kod 2 (33,33%) od 6 ćurića. Dvadesetprvog dana prouzrokovatelj je izolovan iz uzoraka srca samo kod 1 ćureta (16,66%) od ukupno 6.

Iz uzoraka srca ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) nije izolovan *A. fumigatus* niti bilo koji drugi patogeni mikroorganizam u bilo kom vremenu žrtvovanja.

Na grafikonu 8 su prikazani rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka delova srca kod ćurica višekratno tretiranih deksametazonom, a zatim inficiranih (O-2), dobijeni posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije, kao i rezultati izolacije prouzrokovatelja iz srca ćurića tretiranih samo deksametazonom (K-2).

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja uzoraka delova srca dobijenih kod ćurića tretiranih deksametazonom i inficiranih sa *A. fumigatus* (O-2) može se zapaziti da je izolacija uzročnika iz srca bila uspešna tek sedmog dana od infekcije, i to kod 1 od 6 ćurića, dok je izolacija *A. fumigatus* iz uzoraka srca inficiranih ćurića (O-1) bila uspešna već prvog dana od inficiranja, takođe kod 1 od 6 žrtvovanih ćurića (Grafikoni 4, 8). Četrnaestog dana od infekcije broj ćurića ogledne grupe 2 kod kojih je iz uzoraka srca izolovan *A. fumigatus* bio je jednak (2 od 6) broju ćurića ogledne grupe 1 (O-1) iz kojih je uzoraka srca izolovan prouzrokovatelj. Dvadesetprvog dana od infekcije broj ćurića ogledne grupe 2 (O-2), kod kojih je iz srca izolovan *A. fumigatus* bio je neznatno manji (1 od 6 tj. 16,66%) od broja ćurića ogledne grupe 1 (O-1) - 2 od 6 (33,33%) (Grafikoni 4, 8).



Grafikon 8. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića iz čijih je uzoraka srca izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (grupa O-2), kao i rezultat izolacije prouzrokovača iz uzoraka srca ćurića kontrolne grupe (K-2), tretirane samo deksametazonom.

Prouzrokovač nije bio izolovan iz uzoraka srca ni kod jednog ćureta višekratno tretiranog deksametazonom (K-2), u bilo kom periodu žrtvovanja, 1, 3, 7, 14 i 21 dan (Grafikon 8).

Može se zapaziti da tretman deksametazonom nije značajno uticao na broj izolata uzročnika, odnosno na broj ćurića kod kojih je izolovan *A. fumigatus*, u odnosu na broj izolata kod inficiranih ćurića koji nisu tretirani deksametazonom.

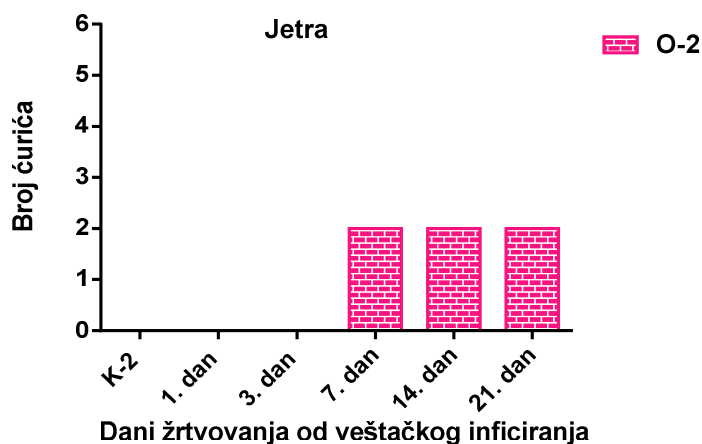
Deksametazon odlaže, odnosno produžava vreme inicijalne izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka srca (7. dan od inficiranja) u odnosu na inicijalno vreme izolacije uzročnika iz srca inficiranih ćurića koji nisu tretirani deksametazonom (1. dan od inficiranja) (Grafikoni 4, 8).

Prvog i trećeg dana od infekcije, ni kod jednog ćureta nije izolovan *A. fumigatus* iz uzoraka jetre. Sedmog dana od infekcije prouzrokovač je izolovan iz uzoraka delova jetre kod 2 ćureta od ukupno 6 ćurića (33,33%), a takođe četrnaestog (33,33%) i dvadesetprvog dana (33,33 %) od inficiranja (Grafikon 9).

Iz uzoraka jetre ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) nije izolovan *A. fumigatus* ni kod jednog ćureta u bilo kom vremenu žrtvovanja, niti bilo koji drugi patogen u bilo kom vremenu žrtvovanja (Grafikon 9).

Rezultati pokazuju da prethodno davanje deksametazona donekle povećava broj izolata i broj ćurića iz čijih se uzoraka jetre izoluje *A. fumigatus*, i to, kod 2 od 6 ćurića posle 7, 14. i 21. dana od infekcije, u poređenju sa brojem ćurića grupe (O-1) iz čijih uzoraka jetre ni kod jednog ćureta nije izolovan prouzrokovač (0 od 6 ćurića) posle 7, 14, i 21. dana od infekcije (Grafikoni 5, 9).

Na grafikonu 9 prikazani su rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka delova jetre kod ćurića tretiranih deksametazonom, a zatim inficiranih (O-2), dobijeni posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od infekcije, kao i rezultati izolacije prouzrokovača iz jetre ćurića kontrolne grupe (K-2).



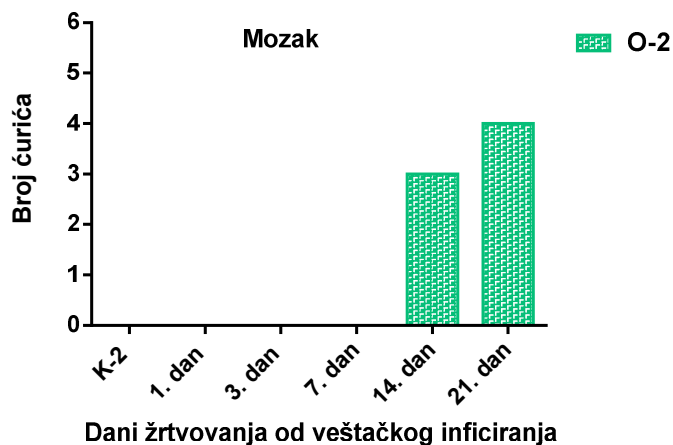
Grafikon 9. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića iz čijih je uzoraka jetre izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (grupa O-2), kao i rezultat izolacije prouzrokovača iz uzoraka jetre ćurića kontrolne grupe (K-2), tretirane samo deksametazonom.

Prvog, trećeg i sedmog dana od infekcije iz uzoraka delova mozga *A. fumigatus* nije izolovan ni kod jednog ćureta od ukupno 18 žrtvovanih inficiranih i deksametazonom tretiranih. Četrnaestog dana od infekcije prouzrokovač je izolovan iz uzoraka mozga kod 3 (50%) od ukupno 6 ćurića, a dvadesetprvog dana kod 4 (66,66%) od 6 ćurića (Grafikon 10).

Iz uzoraka mozga ćurića grupe K-2 nije izolovan *A. fumigatus* ni kod jednog ćureta u bilo kom vremenu žrtvovanja (Grafikon 10).

Na grafikonu 10 prikazani su rezultati izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka mozga kod ćurića višekратно tretiranih deksametazonom, a zatim inficiranih (O-2), dobijeni

posle 1, 3, 7, 14. i 21. dana od inficiranja, kao i rezultati izolacije prouzrokovača iz uzoraka mozga ćurića tretiranih samo deksametazonom, kontrolna grupa 2 (K-2).



Grafikon 10. Stubićima je prikazan broj žrtvovanih inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića iz čijih je uzoraka mozga izolovan *A. fumigatus* posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (grupa O-2), kao i rezultat izolacije prouzrokovača iz uzoraka mozga ćurića kontrolne grupe (K-2), tretirane samo deksametazonom.

Rezultati ispitivanja pokazuju da prethodno davanje deksametazona povećava broj ćurića iz čijih se uzoraka mozga izoluje *A. fumigatus*, i to: kod 3 od 6 ćurića posle 14. dana i kod 4 od 6 posle 21. dana od inficiranja, u poređenju sa brojem ćurića ogledne grupe 1 (O-1) kod koje je *A. fumigatus* izolovan samo kod 1 ćureta od 6 posle 21. dana od infekcije (Grafikoni 6, 10).

5.4. Rezultati molekularnih ispitivanja

Rezultati kvalitativne molekularne detekcije *A.fumigatus* iz uzoraka pluća i vazdušnih kes, srca, jetre, bubrega, mozga i kostne srži ćurića posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja, kao i kod ćurića tretiranih deksametazonom dobijeni su korišćenjem dvostepene (Nested) lančane reakcije polimeraze (PCR).

Za izvođenje PCR reakcije korišćena su dva para prajmera prikazanih u tabeli (Tabela 4).

Tabela 4. Oligonukleotidni prajmeri, DNK sekvenca, mesto i specifičnost za *A. fumigatus*.

Oligonukleotidni prajmeri	DNK sekvenca (5'-3')	Mesto	Vrsta specifičnost
AFU5S	AGG GCC AGC GAG TAC ATC ACC TTG	1436-1459	<i>A. fumigatus</i>
AFU5AS	GG G (AG)GT CGT TGC CAA C(CT)C (CT)CC TGA	1648-1771	<i>A. fumigatus</i>
AFU7S	CGG CCC TTA AAT AGC CCG	1296-1313	<i>A. fumigatus</i>
AFU7AS	CGG CCC TTA AAT AGC CCG	1681-1700	<i>A. fumigatus</i>

Prvog dana od veštačkog inficiranja u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kes, kao i jetre (po 6 ćurića) detektovana je DNK *A. fumigatus*. U zbirnom uzorku srca, mozga, kostne srži i bubrega prvog dana od veštačkog inficiranja nije detektovan genom *A. fumigatus* (Tabela 5).

Trećeg dana od veštačkog inficiranja u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kes i bubrega detektovana je pozitivna reakcija na prisustvo *A. fumigatus*, a negativan nalaz je ustanovljen u zbirnom uzorku srca, jetre, mozga i kostne srži.

Sedmog dana od veštačkog inficiranja pozitivan PCR produkt je vizuelizovan u zbirnom uzorku delova pluća i vazdušnih kes, srca i mozga, a u zbirnom uzorku jetre, bubrega i kostne srži nije detektovan PCR produkt na gel elektroforezi.

Ćetnaestog dana od veštačkog inficiranja u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kes, srca, jetre i mozga detektovana je pozitivna reakcija na prisustvo *A. fumigatus*, a negativna u zbirnom uzorku bubrega i kostne srži (Tabela 5).

Tabela 5. Rezultati detekcije *A. fumigatus* iz zbirnih uzoraka delova ispitivanih organa ćurića posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja.

Dani od inficiranja/žrtvovanja n (6)	Detekcija <i>A. fumigatus</i> iz organa ćurića ogledne grupe (O-1) PCR metodom					
	Pluća i vazdušne kese	Srce	Jetra	Mozak	K. srž	Bubreg
1.	+	-	+	-	-	-
3.	+	-	-	-	-	+
7.	+	+	-	+	-	-
14.	+	+	+	+	-	-
21.	+	+	+	+	+	+
Dani žrtvovanja	Kontrolna grupa ćurića (K-1) (n =3)					
1.	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-
7.	-	-	-	-	-	-
14.	-	-	-	-	-	-
21.	-	-	-	-	-	-

+, pozitivna reakcija

-, negativna reakcija

n, broj ćurića po danu žrtvovanja

Dvadesetprvog dana od veštačkog inficiranja ćurića kod svih ispitivanih zbirnih uzoraka organa (pluća i vazdušne kese, srce, jetra, mozak, bubreg i kostna srž) vizuelizovana je pozitivna PCR reakcija na prisustvo genoma *A. fumigatus*.

U zbirnim uzorcima (od po 3 ćureta) ispitivanih delova organa ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) nije bio vidljiv proizvod PCR reakcije, odnosno reakcija je bila negativna posle bilo kog vremena žrtvovanja (Tabela 5).

Kod ćurića koji su višekratno parenteralno dobijali deksametazon, a zatim veštački inficirani *A. fumigatus* (grupa O-2), prvog dana od infekcije detektovana je pozitivna reakcija na prisustvo *A. fumigatus* u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kesa (zbirni uzorak od 6 žrtvovanih ćurića), kao i mozga. U zbirnom uzorku srca, jetre, kostne srži i bubrega, prvog dana od veštačkog inficiranja metodom PCR nije detektovan *A. fumigatus* (Tabela 6).

Tabela 6. Rezultati detekcije *A. fumigatus* iz zbirnih uzoraka delova ispitivanih organa ćurića tretiranih deksametazonom i veštački inficiranih, dobijeni posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od inficiranja.

Dani od inficiranja/žrtvovanja n (6)	Detekcija <i>A. fumigatus</i> iz organa ćurića ogledne grupe (O-2) PCR metodom					
	Pluća i vazdušne kese	Srce	Jetra	Mozak	K. srž	Bubreg
1.	+	-	-	+	-	-
3.	+	-	-	+	-	-
7.	+	+	+	+	-	+
14.	+	+	+	+	+	+
21.	+	+	+	+	+	+
Dani žrtvovanja	Kontrolna grupa ćurića 2 (K-2) (n=3)					
1.	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-
7.	-	-	-	-	-	-
14.	-	-	-	-	-	-
21.	-	-	-	-	-	-

+, pozitivna reakcija

-, negativna reakcija

n, broj ćurića po danu žrtvovanja

Trećeg dana od veštačkog inficiranja u zbirnom uzorku pluća i mozga detektovana je pozitivna reakcija na prisustvo *A. fumigatus*, a negativna reakcija je očitana u zbirnom uzorku srca, jetre, kostne srži i bubrega.

Sedmog dana od veštačkog inficiranja pozitivan PCR produkt je vizuelizovan u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kesa, srca, jetre i mozga, a u zbirnom uzorku kostne srži i bubrega nije detektovan PCR produkt na gel elektroforezi.

Četnaestog i dvadesetprvog dana od veštačkog inficiranja ćurića u zbirnim uzorcima svih ispitivanih organa (pluća i vazdušne kese, srce, jetra, mozak, kostna srž i bubreg) detektovana je pozitivna reakcija na prisustvo genoma *A. fumigatus* (Tabela 6).

U zbirnim uzorcima ispitivanih organa ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) u svim vremenima žrtvovanja nije bio vidljiv proizvod PCR reakcije, odnosno reakcija je bila negativna (Tabela 6).

5.5. Rezultati ispitivanja kožne bazofilne preosetljivosti (CBH) izazvane fitohemaglutininom kod ćurića kontrolnih i oglednih grupa

Ispitivanje kožne bazofilne preosetljivosti sa fitohemaglutininom je izvedeno na 40 ćurića oba pola, starosti 28 dana, koji su sa sedam dana bili vakcinisani La sota sojem protiv virusa atipične kuge živine. Ćurići su podeljeni u četiri jednake grupe (kontrolna 1 i 2 i ogledna 1 i 2). Svakom ćuretu u kožni nabor između 3. i 4. prsta desne noge intradermalno, jednokratno je aplikovan fitohemaglutinin u pojediničnoj dozi od 100 µg (Slika 63).

Istovremeno sa fitohemaglutininom, u levu nogu je aplikovan sterilan fiziološki rastvor NaCl (SFR) u istoj zapremini i na istom mestu primene. Debljina kože između trećeg i četvrtog prsta obe noge merena je kod svih ćurića pre aplikacije ovih ispitujućih supstanci (nulti sat posmatranja – 0 h) (Slika 63).

Reakcija na obe supstance, u vidu zadebljanja kože (DK) merena je u milimetrima digitalnim kutinometrom posle 6, 12 i 24 sata od aplikacije (Slika 64).



Slika 63. Aplikacija fitohemaglutinina u kožni nabor između 3. i 4. prsta.



Slika 64. Merenje debljine kožnog nabora digitalnim kutinometrom.

Dobijene vrednosti merenja DK kod ćurića oglednih grupa 1 i 2 upoređivane su sa vrednostima DK kod ćurića kontrolnih grupa 1 i 2, i vrednostima između oglednih grupa u cilju procene odgovora reakcije organizma na fitohemaglutinin (Tabela 7).

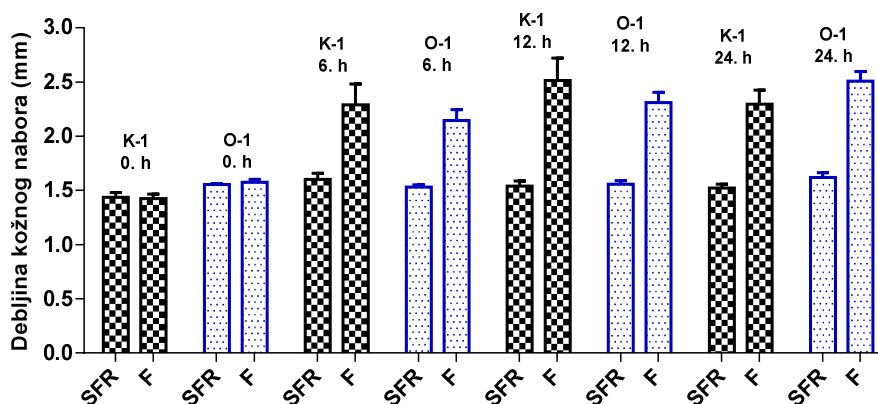
Tabela 7. Prosečne vrednosti debljine kože (DK) dobijene kod ćurića ogledne i kontrolne grupe 1 pre (0h) i posle 6, 12 i 24h od i. d. aplikacije fitohemaglutinina (F) i sterilnog fiziološkog rastvora NaCl (SFR).

Prosečne vrednosti DK kod ćurića tretiranih F i SFR				
Vreme (h)	Kontrolna grupa 1 (K-1) X±SD		Ogledna grupa 1 (O-1) X±SD	
	SFR (mm)	F (mm)	SFR (mm)	F (mm)
0	1,44±0,14	1,42±0,13	1,55±0,02	1,58±0,08
6	1,60±0,18	2,29±0,61	1,53±0,07	2,45±0,32
12	1,54±0,15	2,51±0,65	1,56±0,11	2,31±0,30
24	1,52±0,12	2,29±0,41	1,62±0,15	2,50±0,28

Kontrolna grupa 1 (K-1) - ćurići tretirani fitohemaglutininom (F) i sterilnim fiziološkim rastvorom NaCl (SFR), intradermalno (i.d.)

Ogledna grupa 1 (O-1) - ćurići veštački inficirani sa *A. fumigatus* i tretirani fitohemaglutininom (F) i sterilnim fiziološkim rastvorom NaCl (SFR), intradermalno (i.d.)

Prosečna vrednost debljine kože između 3. i 4. prsta kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) posle 6 časova od aplikacije F iznosila je 2,45±0,32 mm, a kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) bila je 2,29±0,61 mm. Prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe 1 bila je neznatno veća u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1). (Tabela 7; Grafikon 11).



Grafikon 11. Stubićima su prikazane prosečne vrednosti DK nabora kod ćurića grupe K-1 i ćurića grupe O-1 posle 6, 12 i 24h od i.d. aplikacije F i SFR.

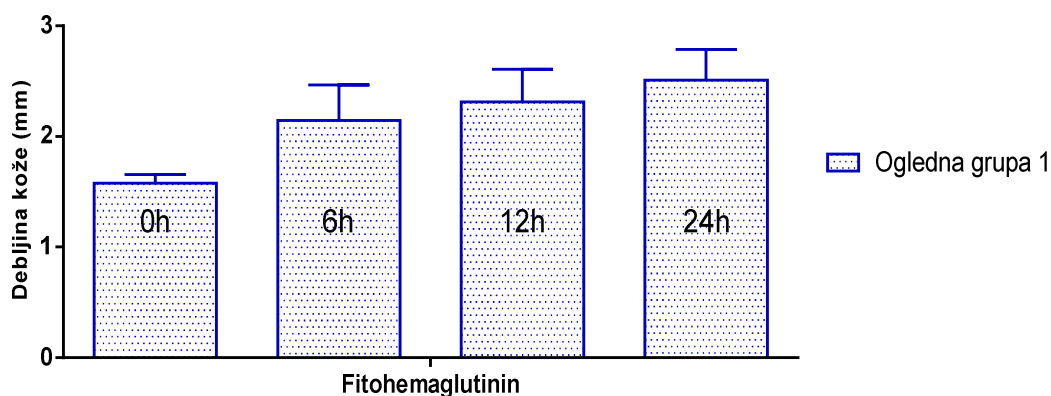
Prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) ustanovljena posle 12 sati od aplikacije F iznosila je $2,31 \pm 0,30$ mm, a kod ćurića grupe (K-1) bila je $2,51 \pm 0,65$ mm. Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe (O-1) bila je neznatno manja u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića grupe (K-1) (Tabela 7; Grafikon 11).

Dobijena prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) posle 24 časa od aplikacije F iznosila je $2,50 \pm 0,28$ mm, a kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) $2,29 \pm 0,41$ mm. Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe (O-1) bila je neznatno veća u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića kontrolne grupe 1.

Dobijeni rezultati prosečne vrednosti DK ćurića ogledne grupe 1 i ćurića kontrolne grupe 1 posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije SFR nisu bili statistički značajni u funkciji vremena (Tabela 7; Grafikon 11).

Prosečne vrednosti zadebljanja kože ćurića ogledne grupe 1 praćene u funkciji vremena (6 do 24h) od aplikacije F (vrednosti upoređivane između 6 i 12; 12 i 24 časa) se značajno ne menjaju i ne pokazuju statistički značajno povećanje vrednosti zadebljanja kože u praćenom periodu od 6 do 24h (Grafikon 12).

Najveća prosečna vrednost zadebljanja kože ustanovljena je posle 24 časa od aplikacije fitohemaglutinina ($2,50 \pm 0,28$ mm) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Stubićima su prikazane prosečne vrednosti DK nabora dobijene pre aplikacije (0h) i posle 6, 12 i 24h od i.d. aplikacije fitohemaglutinina kod ćurića veštački inficiranih sa *A. fumigatus* (ogledna grupa 1).

U tabeli 8. su prikazane prosečne vrednosti DK kod ćurića kontrolne grupe 2 i ogledne grupe 2 dobijene posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije SFR i F.

Tabela 8. Prosečne vrednosti debljine kože (DK) kod ćurića ogledne i kontrolne grupe 2 pre (0h) i posle 6, 12 i 24h od i.d. aplikacije fitohemaglutinina (F) i sterilnog fiziološkog rastvora NaCl (SFR)

Prosečne vrednosti DK kod ćurića tretiranih F i SFR				
Grupe Vreme (h)	Kontrolna grupa 2 (K-2) X±SD		Ogledna grupa 2 (O-2) X±SD	
	SFR (mm)	F (mm)	SFR (mm)	F (mm)
0	1,11±0,12	1,18±0,05	1,15±0,16	1,19±0,20
6	1,26±0,10	2,03±0,19**	1,24±0,09	1,82±0,16**
12	1,28±0,13	2,56±0,16*	1,32±0,16	2,39±0,17*
24	1,26±0,13	2,40±0,21**	1,32±0,13	2,12±0,18**

Kontrolna grupa 2 (K-2) - ćurići višekratno parenteralno tretirani deksametazonom, i i.d. sterilnim fiziološkim rastvorom (SFR) i fitohemaglutininom (F).

Ogledna grupa 2 (O-2) - ćurići višekratno parenteralno tretirani deksametazonom a zatim inficirani sa *A. fumigatus*. SFR i F aplikovani i.d.

**-statistički značajna razlika ($P<0,01$) između prosečnih vrednosti debljine kože ćurića grupe K-2 i O-2 posle 6 i 24h od aplikacije fitohemaglutinina

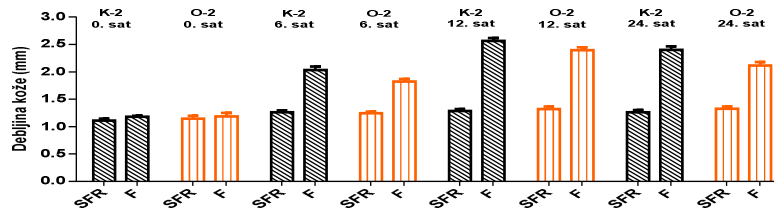
*-statistički značajna razlika ($P<0,05$) između prosečnih vrednosti debljine kože ćurića grupe K-2 i O-2 posle 12h od aplikacije fitohemaglutinina.

Prosečna vrednost debljine kože između 3. i 4. prsta kod ćurića ogledne grupe O-2, posle 6 sati od aplikacije F iznosila je $1,82\pm 0,16$ mm, a kod ćurića grupe K-2 ova vrednost bila je $2,03\pm 0,19$ mm.

Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe O-2, posle 6 sati od aplikacije F bila je statistički značajno manja ($P<0,01$) u odnosu na prosečnu vrednost debljine kože ćurića grupe K-2. (Tabela 8, Grafikon 13).

Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe O-2 izračunata posle 12 časova od aplikacije F iznosila je $2,39\pm 0,17$ mm, a kod ćurića grupe K-2 bila je nešto veća, $2,56\pm 0,16$ mm.

Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe O-2 posle 12 časova bila je statistički značajno manja ($P<0,05$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića grupe 2, K-2 (Tabela 8, Grafikon 13).



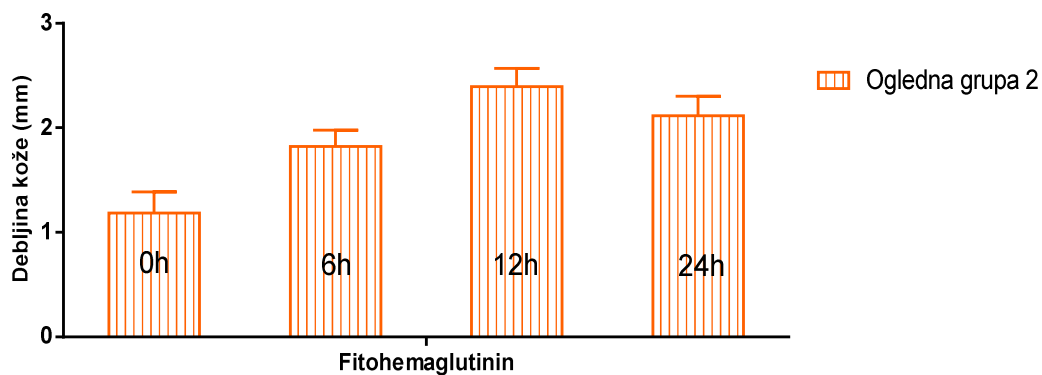
Grafikon 13. Stubićima su prikazane prosečne vrednosti DK nabora kod ćurića grupe K-2 i ćurića grupe O-2 posle 6, 12 i 24h od i.d. aplikacije F i SFR.

Dobijena prosečna vrednost DK ćurića grupe (O-2) posle 24 časa od aplikacije F iznosila je $2,12 \pm 0,18$ mm, a kod ćurića grupe (K-2) $2,40 \pm 0,21$ mm.

Prosečna vrednost DK ćurića ogledne grupe 2 (O-2) posle 24 časa je bila je takođe statistički veoma značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića kontrolne grupe 2 (K-2) posle 24h.

Dobijeni rezultati prosečne vrednosti DK ćurića ogledne grupe 2 (O-2) i kontrolne grupe 2 (K-2) posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije (SFR) nisu se značajno razlikovali (Tabela 8, Grafikon 13).

Vrednosti DK dobijene posle 6 i 12 i 12 i 24 časa od aplikacije F pokazuju statistički veoma značajno povećanje debljine kožnog nabora posle 6 h ($P < 0,001$) i 24 časa ($P < 0,001$) i značajno posle 12 časova ($P < 0,05$). Najveća prosečna vrednost debljine kože ustanovljena je posle 12 sati od aplikacije fitohemaglutinina i iznosila je $2,39 \pm 0,17$ mm (Tabela 8, Grafikon 14).



Grafikon 14. Stubići predstavljaju prosečne vrednosti debljine kože dobijene pre (0h) i posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije fitohemaglutina kod ćurića tretiranih deksametazonom i veštački inficiranih sa *A. fumigatus* (ogledna grupa 2)

U tabeli 9 su prikazane prosečne vrednosti DK kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) i ogledne grupe 2 (O-2) ustanovljene posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije F i SFR.

Tabela 9. Prosečne vrednosti debljine kože (DK) kod ćurića ogledne grupe 1 i ogledne grupe 2 pre (0h) i posle 6, 12 i 24 h od i.d. aplikacije fitohemaglutinina (F) i sterilnog fiziološkog rastvora NaCl (SFR)

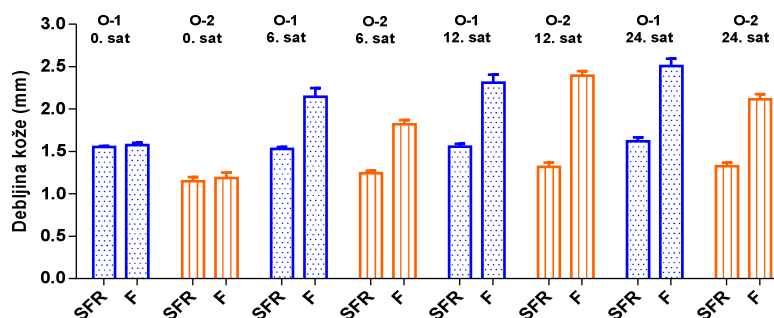
Prosečne vrednosti DK kod ćurića tretiranih F i SFR				
Grupe Vreme (h)	Ogledna grupa 1 (O-1) X ±SD		Ogledna grupa 2 (O-2) X ±SD	
	SFR (mm)	F (mm)	SFR (mm)	F (mm)
0	1,55±0,02	1,58±0,08	1,15±0,16	1,19±0,20
6	1,53±0,07	2,45±0,32***	1,24±0,09	1,82±0,16***
12	1,56±0,11	2,31±0,30	1,32±0,16	2,39±0,17
24	1,62±0,15	2,50±0,28***	1,32±0,13	2,12±0,18***

Ogledna grupa 1 (O-1) - ćurići veštački inficirani sa *A. fumigatus*. SFR i F aplikovani jednokratno i.d.

Ogledna grupa 2 (O-2) - ćurići višekratno parenteralno tretirani deksametazonom i inficirani sa *A. fumigatus*. SFR i F aplikovani jednokratno i.d.

***-statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između prosečnih vrednosti debljine kože ćurića grupe O-1 i O-2 posle 6 i 24h od aplikacije fitohemaglutinina.

Posle 6 sati od aplikacije F prosečna vrednost debljine kože kod ćurića grupe (O-1) iznosila je $2,452 \pm 0,32$ mm, a kod ćurića grupe (O-2) bila je $1,82 \pm 0,16$ mm. Prosečna vrednost DK kod ćurića grupe (O-2), u ovom periodu merenja, bila je statistički značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića grupe (O-1) (Tabela 9, Grafikon 15).



Grafikon 15. Stubićima su prikazane prosečne vrednosti DK kod ćurića grupe O-1 i grupe O-2 dobijene pre (0h) i posle 6, 12 i 24h od i.d. aplikacije fitohemaglutinina (F) i sterilnog fiziološkog rastvora NaCl (SFR).

Dvanaest sati nakon aplikacije fitohemaglutinina kod ćurića grupe (O-2) prosečna vrednost DK iznosila je $2,39 \pm 0,17$ mm, a kod ćurića grupe (O-1) bila je $2,31 \pm 0,30$ mm. Ustanovljena vrednost DK kod ćurića grupe (O-2) u ovom periodu posmatranja nije se značajno razlikovala od DK kod ćurića grupe (O-1) (Tabela 9).

Dvadesetčetiri sata od aplikacije F prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe 2 (O-2) bila je $2,12 \pm 0,18$ mm, a kod ćurića grupe (O-1) iznosila je $2,50 \pm 0,28$ mm.

Prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe 2 (O-2) bila je statistički veoma značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost debljine kože kod ćurića ogledne grupe 1 (O-1) (Tabela 9, Grafikon 15).

Prosečne vrednosti DK kod ćurića ogledne grupe 2 (O-2) u poređenju sa vrednostima DK ogledne grupe 1 (O-1), koje su dobijale sterilni fiziološki rastvor bile su statistički značajno manje posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije ovog rastvora (Tabela 9, Grafikon 15).

Rezultati prosečne vrednosti DK kod ćurića ogledne grupe 2 dobijeni u predviđenim vremenima od aplikacije fitohemaglutinina pokazuju statistički veoma značajno ($P < 0,001$) smanjenje vrednosti zadebljanja kože, odnosno lokalne bazofilne preosetljivosti (CBH) - imunosupresiju posle 6 i 24 časa ($P < 0,001$) u odnosu na prosečne vrednosti DK ćurića ogledne grupe O-1. Najizraženije smanjenje vrednosti DK kod ćurića ogledne grupe 2 zabeleženo je posle 6 sati od aplikacije F i iznosilo je $1,82 \pm 0,16$ mm (Tabela 9, Grafikon 15).

5.6. Rezultati imunskog odgovora na vakcinu protiv atipične kuge živine

Za vakcinaciju protiv atipične kuge živine (AKŽ) korišćena je vakcina La Sota, živa liofilizovana, koja sadrži lentogeni soj La Sota virusa atipične kuge živine. Kod ćurića starosti 10 dana vakcina je aplikovana okulo – nazalno, prema uputstvu proizvođača.

Odmah nakon izleganja, ćurićima je uzorkovana krv u cilju procene titra maternalnih antitela protiv ovog oboljenja. Dobijene vrednosti titra bile su: 1:16 (4); 1:32 (6); 1:64 (5) i ove vrednosti su pokazale da su ćurići nasledili dovoljan nivo maternalnih antitela koja će ih štititi od infekcije do predviđenog vremena vakcinacije (10 dana starosti).

Dvadesetprvog dana nakon vakcinacije ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) titar antitela bio je: 1:16 (1); 1:32 (2); 1:128 (5); 1:256 (2), a kod ćurića kontrolne grupe 2 (K-2), koji su u starosti od 8 dana, šest uzastopnih dana dobijali deksametazon u cilju izazivanja imunosupresije titar antitela bio je značajno niži i iznosio je: 1:8 (2); 1:16 (5); 1:32 (3). Rezultati ispitivanja visine titra antitela dobijeni 21. dana od vakcinacije protiv atipične kuge živine kod ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*, ogledna grupa 1 (O-1) bili su: 1:4 (3); 1:8 (7), a kod deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića, ogledna grupa 2 (O-2) titar antitela iznosio je: 1:2 (6); 1:4 (4).

5.7. Rezultati hematoloških ispitivanja

Ispitivanje uticaja eksperimentalne intratrahealne infekcije izazvane sa *A. fumigatus* na neke hematološke parametare (broj eritrocita, leukocita, heterofila, limfocita i bazofila, koncentracija hemoglobina i hematokritna vrednost) obavljeno je kod ćurića posle 14. i 21. dana od inficiranja (28 i 35 dana starosti) (Tabela 10), kao i kod inficiranih ćurića prethodno višekratno parenteralno tretiranih deksametazonom (Tabela 12). Takođe, navedena hematološka ispitivanja su obavljena i kod ćurića kontrolnih grupa (K-1) (Tabela 11) i ćurića kontrolne grupe (K-2) (Tabela 13) starosti 28 i 35 dana.

Tabela 10. Prosečne vrednosti hematoloških parametara dobijene kod ćurića posle 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (O-1), starosti 28 i 35 dana.

Dani od inficiranja	Starost (dani)	Grupa	X±SD Er ×10 ¹² /l	X±SD Le ×10 ⁹ /l	X±SD Heterofili ×10 ⁹ /l	X±SD Lym ×10 ⁹ /l	X±SD Bazofili ×10 ⁹ /l	X±SD Hbg g/dl	X±SD Hct %
14.	28	O-1	1,93±0,16	15,66±4,14**	6,58±2,2	8,83±2,98	0,91±0,44	9,08±0,41*	31,70±2,70*
21.	35	O-1	1,87±0,07	25,91±8,59**	15,25±56***	9,90±4,0**	0,76±0,60	9,36±0,45	30,60±1,17

Er – eritrociti; Le – leukociti; Hbg – hemoglobin; Hct – hematokrit; Lym - limfociti

O-1, ogledna grupa ćurića veštački inficirana sa *A. fumigatus*

K-1, kontrolna (neinficirana) grupa ćurića starosti 28 i 35 dana.

* Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između prosečne vrednosti koncentracije hemoglobina i prosečne vrednosti hematokrita ustanovljenih kod ćurića grupe O-1 posle 14. dana od inficiranja (starost 28 dana) u odnosu na iste hematološke parametre dobijene kod ćurića grupe K-1, starosti 28 dana.

** Statistički značajna razlika ($p < 0,01$) između prosečne vrednosti ukupnog broja leukocita dobijene kod ćurića grupe O-1, posle 14. i 21. dana od infekcije (starost 28 i 35 dana) i prosečne vrednosti ukupnog broja leukocita kod ćurića grupe K-1 starosti 28 i 35 dana.

** Statistički značajna razlika ($p < 0,01$) između i prosečne vrednosti broja limfocita dobijene kod ćurića grupe O-1, posle 21. dana od infekcije (starost 35 dana) i prosečne vrednosti broja limfocita dobijene kod ćurića grupe K-1 starosti 35 dana.

***Statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između prosečne vrednosti broja heterofila kod ćurića grupe O-1 posle 21. dana od infekcije (starost 35 dana) i prosečne vrednosti broja heterofila kod ćurića grupe K-1 (starost 35 dana).

Rezultati ispitivanja uticaja infekcije izazvane *A. fumigatus* na broj eritrocita kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja (starost 28 dana) pokazuju da infekcija ne utiče značajno na ovaj parametar ($1,93 \pm 0,04 \times 10^{12}/l$), u poređenju sa prosečnim brojem eritrocita ustanovljenim kod ćurića kontrolne grupe 1 ($2,05 \pm 0,13 \times 10^{12}/l$) u starosti od 28 dana (Tabele 10, 11). Prosečan broj eritrocita se i dalje neznatno smanjivao kod inficiranih ćurića, pa je treće nedelje od infekcije iznosio ($1,87 \pm 0,07 \times 10^{12}/l$), i bio je neznatno manji, kako u odnosu na prosečan broj eritrocita ustanovljen kod ćurića posle druge nedelje od infekcije, tako i u odnosu na broj eritrocita dobijen kod ćurića kontrolne grupe 1 ($1,98 \pm 0,11 \times 10^{12}/l$) u starosti od 35 dana (Tabele 10, 11).

Tabela 11. Prosečne vrednosti hematoloških parametara dobijene kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1) starosti 28 i 35 dana.

Starost (dani)	Grupa	X±SD Er ×10 ¹² /l	X±SD Le ×10 ⁹ /l	X±SD Heterofili ×10 ⁹ /l	X±SD Lym ×10 ⁹ /l	X±SD Bazofili ×10 ⁹ /l	X±SD Hbg g/dl	X±SD Hct %±SD
28	K-1	2,05±0,13	6,71±0,96**	6,49±2,25	8,45±3,60	0,81±0,51	10,03±0,8*	33,70±2,1*
35	K-1	1,98±0,11	11,22±3,22**	4,76±1,71***	5,77±2,01**	0,63±0,24	9,98±0,54	32,50±1,84

Er – eritrociti; Le – leukociti; Hbg – hemoglobin; Hct – hematokrit; Lym - limfociti

O-1, ogleđna grupa ćurića veštaćki inficirana sa *A. fumigatus*

K-1, kontrolna (neinficirana) grupa ćurića starosti 28 i 35 dana.

*Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,05$) između prosećne vrednosti koncentracije hemoglobina i prosećne vrednosti hematokrita ustanovljenih kod ćurića grupe O-1 posle 14. dana od inficiranja (starost 28 dana) u odnosu na iste hematološke parametre dobijene kod ćurića grupe K-1, starosti 28 dana.

**Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,01$) između prosećne vrednosti ukupnog broja leukocita dobijene kod ćurića grupe O-1, posle 14. i 21. dana od infekcije (starost 28 i 35 dana) i prosećne vrednosti ukupnog broja leukocita kod ćurića grupe K-1 starosti 28 i 35 dana.

** Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,01$) između i prosećne vrednosti broja limfocita dobijene kod ćurića grupe O-1, posle 21. dana od infekcije (starost 35 dana) i prosećne vrednosti broja limfocita dobijene kod ćurića grupe K-1 starosti 35 dana.

*** Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,001$) između prosećne vrednosti broja heterofila kod ćurića grupe O-1 posle 21. dana od infekcije (starost 35 dana) i prosećne vrednosti broja heterofila kod ćurića grupe K-1 (starost 35 dana).

Posle dve nedelje od infekcije ustanovljeno je znaćajno smanjenje ($p < 0,05$) prosećne vrednosti koncentracije hemoglobina ($9,08 \pm 0,41$ g/dl) kod inficiranih ćurića (O-1) u odnosu na prosećnu vrednost ovog parametra kod ćurića kontrolne grupe 1 ($10,03 \pm 0,82$ g/dl), kao i smanjenje prosećne vrednosti hematokrita ($31,70 \pm 2,70\%$) u odnosu na vrednost hematokrita ustanovljenu kod ćurića kontrolne grupe 1 ($33,70 \pm 2,10\%$) u starosti od 28 dana (Tabele 10, 11).

Prosećne vrednosti hematokrita ustanovljene kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja linearno su opadale u funkciji vremena (Tabela 10).

U istom periodu uzorkovanja krvi (posle dve nedelje od inficiranja) prosećan broj leukocita bio je statistićki znaćajno veći ($p < 0,01$) kod inficiranih ćurića ($15,66 \pm 4,14 \times 10^9/l$) u odnosu na vrednost ovog parametra dobijenog kod ćurića kontrolne grupe 1 ($6,71 \pm 0,96 \times 10^9/l$) starosti 28 dana (Tabele 10, 11).

Posle dve nedelje od infekcije prosećne vrednosti broja ćelija bele krvne loze (heterofili, bazofili, limfociti) kod inficiranih ćurića (grupa O-1) nisu se statistićki

razlikovale u poređenju sa vrednostima ovih hematoloških parametara dobijenih kod ćurića kontrolne grupe 1 (K-1), posmatrane u ovom vremenskom periodu (Tabele 10, 11). Tako, prosečna vrednost broja bazofila kod inficiranih ćurića posle dve nedelje od infekcije bila je $0,91 \pm 0,44 \times 10^9/l$ i nije se značajno razlikovala od prosečne vrednosti ovog parametra kod ćurića kontrolne grupe 1 ($0,81 \pm 0,51 \times 10^9/l$). U posmatranom vremenu od inficiranja ni vrednost prosečnog broja limfocita ($8,83 \pm 2,98 \times 10^9/l$) ustanovljena kod inficiranih ćurića nije se značajno razlikovala od vrednosti ovog parametra kod ćurića kontrolne grupe 1 ($8,45 \pm 3,60 \times 10^9/l$) (Tabele 10, 11).

Dvadesetprvog dana od inficiranja prosečan broj eritrocita kod ćurića grupe O-1, starosti 35 dana, neznatno se smanjivao ($1,87 \pm 0,07 \times 10^{12}/l$) u odnosu na prosečan broj eritrocita ustanovljen kod ćurića iste grupe, posle četrnaest dana od inficiranja ($1,93 \pm 0,16 \times 10^{12}/l$), kao i u odnosu na prosečan broj eritrocita dobijen kod ćurića kontrolne grupe 1 ($1,98 \pm 0,11 \times 10^{12}/l$) starosti 35 dana (Tabele 10, 11).

Posle tri nedelje od inficiranja, i starosti 35 dana, prosečna vrednost koncentracije hemoglobina kod ćurića iznosila je ($9,36 \pm 0,45g/dl$) i bila je neznatno manja od prosečne vrednosti ovog parametra kod ćurića kontrolne grupe 1 ($9,98 \pm 0,54g/dl$), starosti 35 dana (Tabela 10, 11). U istom periodu uzorkovanja krvi od infekcije, vrednost hematokrita iznosila je $30,60 \pm 1,17\%$ i bila je neznatno manja od prosečne vrednosti hematokrita dobijene posle druge nedelje od infekcije ($31,70 \pm 2,70\%$), i takođe neznatno manja od vrednosti ustanovljene kod ćurića kontrolne grupe 1 ($32,50 \pm 1,84\%$), starosti 35 dana (Tabele 10, 11).

Posle tri nedelje od inficiranja i starosti od 35 dana, vrednost prosečnog ukupnog broja leukocita ($25,91 \pm 8,59 \times 10^9/l$) bila je statistički značajno veća ($p < 0,01$) u odnosu na prosečan ukupan broj leukocita dobijen kod ćurića kontrolne grupe 1 ($11,22 \pm 3,22 \times 10^9/l$), kao i statistički značajno veća ($p < 0,01$) od vrednosti ukupnog broja leukocita ustanovljene kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja ($15,66 \pm 4,14 \times 10^9/l$) i starosti od 28 dana (Tabele 10, 11).

Prosečna vrednost broja heterofila kod ćurića posle tri nedelje od inficiranja iznosila je ($15,25 \pm 5,26 \times 10^9/l$) i bila je statistički veoma značajno veća ($p < 0,001$) u odnosu na vrednost dobijenu posle dve nedelje od inficiranja ($6,58 \pm 2,32 \times 10^9/l$), kao i statistički veoma značajno veća ($p < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost heterofila

dobijenu kod ćurića kontrolne grupe 1 ($4,76 \pm 1,71 \times 10^9/l$) starosti 35 dana (Tabele 10, 11).

Prosečan broj limfocita posle tri nedelje od inficiranja ćurića, uzrasta 35 dana iznosio je ($9,90 \pm 4,0 \times 10^9/l$) i bio je statistički značajno veći ($p < 0,01$) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja limfocita kod ćurića kontrolne grupe 1 ($5,77 \pm 2,01 \times 10^9/l$) iste starosne dobi, kao i neznatno veći u odnosu na vrednost prosečnog broja limfocita dobijenu kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja ($8,83 \pm 2,98 \times 10^9/l$) (Tabele 10, 11).

Vrednost prosečnog broja bazofila kod ćurića posle tri nedelje od inficiranja *A. fumigatus* bila je neznatno veća ($0,76 \pm 0,60 \times 10^9/l$) od vrednosti prosečnog broja bazofilnih granulocita dobijene kod ćurića kontrolne grupe 1 ($0,63 \pm 0,24 \times 10^9/l$), starosti 35 dana, a nešto manja u poređenju sa prosečnim brojem bazofila dobijenim kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja ($0,91 \pm 0,44 \times 10^9/l$) (Tabele 10, 11).

Rezultati ispitivanja uticaja infekcije izazvane sa *A. fumigatus* na broj eritrocita kod ćurića tretiranih deksametazonom, posle dve nedelje od veštačkog inficiranja pokazuju da infekcija i primena leka ne utiču značajno na broj eritrocita ($2,21 \pm 0,60 \times 10^{12}/l$), u poređenju sa vrednošću prosečnog broja eritrocita ustanovljenom kod ćurića kontrolne grupe 2, tretirane samo deksametazonom ($2,51 \pm 0,46 \times 10^{12}/l$). Vrednost prosečnog broja eritrocita ustanovljena posle tri nedelje od infekcije ćurića starih 35 dana, bila je neznatno manja ($1,97 \pm 0,14 \times 10^{12}/l$) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja eritrocita dobijenoj kod ćurića kontrolne grupe 2, tretirane samo deksametazonom ($2,02 \pm 0,17 \times 10^{12}/l$), starosti 35 dana (Tabele 12, 13).

Tabela 12. Prosečne vrednosti hematoloških parametara dobijene kod ćurića tretiranih deksametazonom posle 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja (O-2), starosti 28 i 35 dana.

Dani od inficiranja	Starost (dani)	Grupa	X±SD Er ×10 ¹² /l	X±SD Le ×10 ⁹ /l	X±SD Heterofili ×10 ⁹ /l	X±SD Lym ×10 ⁹ /l	X±SD Bazofili ×10 ⁹ /l	X±SD Hbg g/dl	X±SD Hct %
14.	28	O-2	2,21±0,60	20,2±3,4 **	9,22±4,26 *	4,14±0,98	0,71±0,31	8,18±0,44	32,78±2,54
21.	35	O-2	1,97±0,14	25,77±6,80 **	22,16±6,01 ***	4,64±1,21	0,52±0,24	8,26±1,12	31,30±2,84

Tabela 13. Prosečne vrednosti hematoloških parametara dobijene kod ćurića kontrolne grupe (K-2) tretiranih deksametazonom, starosti 28 i 35 dana.

Starost (dani)	Grupa	X±SD Er ×10 ¹² /l	X±SD Le ×10 ⁹ /l	X±SD Heterofili ×10 ⁹ /l	X±SD Lym ×10 ⁹ /l	X±SD Bazofili ×10 ⁹ /l	X±SD Hbg g/dl	X±SD Hct %±SD
28	K-2	2,51±0,46	9,34±1,1 **	6,68±1,81 *	5,54±2,36	0,69±0,27	8,94±0,36	32,43±1,66
35	K-2	2,02±0,17	10,38±1,17 **	3,80±0,40 ***	2,07±0,06 *	0,47±0,08	8,77±0,32	30,8±2,20

Er – eritrociti; Le - leukociti; Hbg – hemoglobin; Hkt- hematokrit; Lym - limfociti

O-2, ogleđna grupa ćurića višekratno tretirana deksametazonom i veštaćki inficirana sa *A. fumigatus*

K-2, kontrolna grupa ćurića (neinficirana) višekratno tretirana deksametazonom

*Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,05$) između vrednosti prosećnog broja heterofila ustanovljene kod ćurća grupe O-2 posle 14. dana od inficiranja (starost 28 dana) i vrednosti prosećnog broja heterofila dobijene kod ćurića grupe K-2, starosti 28 dana.

**Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,01$) između vrednosti prosećnog ukupnog broja leukocita dobijene kod ćurića grupe O-2, posle 14. i 21. dana od inficiranja (starost 28 i 35 dana) i vrednosti prosećnog ukupnog broja leukocita kod ćurića grupe K-2 starosti 28 i 35 dana.

*** Statistićki znaćajna razlika ($p < 0,001$) između vrednosti prosećnog broja heterofila kod ćurića grupe O-2 posle 21. dana od infekcije (starost 35 dana) i vrednosti prosećnog broja heterofila kod ćurića grupe K-2 (starost 35 dana).

Vrednost prosećne koncentracije hemoglobina kod ćurića tretiranih deksametazonom i inficiranih *A. fumigatus* (O-2) posle dve nedelje od inficiranja iznosila je 8,18±0,44g/dl, i bila je neznatno manja od prosećne koncentracije hemoglobina dobijene kod ćurića kontrolne grupe (K-2), 8,94±0,36g/dl (Tabele 12, 13).

Posle tri nedelje od inficiranja, vrednost prosećne koncentracije hemoglobina kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2) bila je skoro nepromenjena (8,26±1,12g/dl) u odnosu na prosećnu koncentraciju ustanovljenu posle dve nedelje 8,18±0,44g/dl, i neznatno niža od vrednosti prosećne koncentracije hemoglobina dobijene kod ćurića kontrolne grupe (K-2), tretiranih samo deksametazonom (8,77±0,32g/dl), (Tabele 12, 13).

Prosećna vrednost hematokrita ustanovljena kod ćurića ogleđne grupe O-2 (32,78±2,54%), posle dve nedelje od inficiranja i uzrasta od 28 dana, neznatno se razlikovala od vrednosti dobijene kod ćurića kontrolne grupe K-2 (32,43±1,66%) u posmatranom periodu. Takođe, dobijena prosećna vrednost hematokrita kod ćurića grupe O-2 posle dve nedelje od inficiranja, neznatno se razlikovala od vrednosti hematokrita ustanovljene posle tri nedelje od infekcije (31,30±2,84%), kao i od

prosečne vrednosti dobijene kod ćurića kontrolne grupe (K-2) ($30,8 \pm 2,20\%$), starosti 35 dana (Tabele 12, 13).

Vrednost prosečnog ukupnog broja leukocita ustanovljena kod ćurića grupe O-2, posle dve nedelje od inficiranja iznosila je $20,2 \pm 3,4 \times 10^9/l$, i bila je statistički značajno veća ($p < 0,01$) u poređenju sa vrednošću prosečnog ukupnog broja leukocita dobijenom kod ćurića kontrolne grupe 2 ($9,34 \pm 1,12 \times 10^9/l$), a značajno manja ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednošću dobijenom kod ćurića posle tri nedelje od infekcije ($25,77 \pm 6,80 \times 10^9/l$). (Tabele 12, 13).

Ukupan broj leukocita dobijen kod ćurića tretiranih deksametazonom nakon tri nedelje od inficiranja bio je statistički značajno veći ($p < 0,01$) ($25,77 \pm 6,80 \times 10^9/l$) u poređenju sa ukupnim brojem leukocita dobijenim kod ćurića kontrolne grupe (K-2) ($10,38 \pm 1,17 \times 10^9/l$) tretirane deksametazonom, starosti 35 dana (Tabele 12, 13).

Kod ćurića tretiranih deksametazonom, dve nedelje od infekcije sa *A. fumigatus* vrednost prosečnog broja heterofila kod ćurića starosti 28 dana iznosila je $9,22 \pm 4,26 \times 10^9/l$, i bila je statistički značajno veća ($p < 0,01$) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila kod ćurića kontrolne grupe 2 ($6,68 \pm 1,81 \times 10^9/l$), iste starosti (Tabele 12, 13). Takođe, prosečan broj heterofila se značajno povećao kod ćurića grupe O-2 posle tri nedelje od inficiranja i iznosio je $22,16 \pm 6,01 \times 10^9/l$. Ustanovljena vrednost prosečnog broja heterofila kod ćurića grupe O-2, posle tri nedelje od inficiranja, i starosti 35 dana, bila je statistički veoma značajno veća ($p < 0,001$) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila ($3,80 \pm 0,40 \times 10^9/l$) ustanovljenom kod ćurića grupe K-2, starosti 35 dana.

Vrednosti prosečnog broja bazofila kod ćurića tretiranih deksametazonom i inficiranih *A. fumigatus* ustanovljene posle druge ($0,71 \pm 0,31 \times 10^9/l$) i treće nedelje od inficiranja ($0,52 \pm 0,24 \times 10^9/l$) nisu se međusobno značajno razlikovale. Ustanovljene prosečne vrednosti ovog hematološkog parametra kod ćurića grupe O-2 nisu bile značajno različite u poređenju sa vrednostima dobijenim kod ćurića kontrolne grupe (K-2) starosti 28 dana ($0,69 \pm 0,27 \times 10^9/l$), i ćurića starosti 35 dana ($0,47 \pm 0,08 \times 10^9/l$) (Tabele 12, 13).

Vrednost prosečnog broja limfocita ustanovljena kod ćurića grupe O-2, posle dve nedelje od inficiranja i starosti od 28 dana iznosila je $4,14 \pm 0,98 \times 10^9/l$, i nije se značajno razlikovala od vrednosti ovog parametra dobijenog kod ćurića grupe K-2

($5,54 \pm 2,36 \times 10^9/l$) u starosti od 28 dana (Tabela 12, 13). Međutim, vrednost prosečnog broja limfocita kod ćurića grupe O-2 ustanovljena posle dve nedelje od inficiranja i 28 dana starosti bila je značajno manja ($p < 0,05$) u poređenju sa vrednošću ovog parametra dobijenog kod ćurića grupe K-1 ($8,45 \pm 3,60 \times 10^9/l$), starosti 28 dana.

Tri nedelje nakon infekcije kod ćurića tretiranih deksametazonom (O-2) prosečan broj limfocita iznosio je $4,64 \pm 1,21 \times 10^9/l$ i bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na prosečan broj limfocita ustanovljen kod ćurića grupe K-2, tretiranih samo deksametazonom ($2,07 \pm 0,06 \times 10^9/l$) (Tabele 12, 13). Vrednost prosečnog broja limfocita dobijena kod ćurića grupe O-2 posle tri nedelje od infekcije ($4,64 \pm 1,21 \times 10^9/l$) nije se značajno razlikovala od vrednosti prosečnog broja limfocita ustanovljene kod iste grupe ćurića (O-2) posle dve nedelje od infekcije ($4,14 \pm 0,98 \times 10^9/l$) (Tabela 12).

Vrednost prosečnog broja bazofilnih leukocita nađena kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2), posle dve nedelje od inficiranja, starosti od 28 dana iznosila je $0,71 \pm 0,31 \times 10^9/l$. Ustanovljena vrednost prosečnog broja bazofila u drugoj nedelji od inficiranja ćurića tretiranih deksametazonom bila je neznatno veća od vrednosti ustanovljene u trećoj nedelji od inficiranja $0,52 \pm 0,24 \times 10^9/l$, kao i od vrednosti prosečnog broja bazofila dobijene kod ćurića tretiranih samo deksametazonom (K-2), starosti 28 ($0,69 \pm 0,27 \times 10^9/l$) i 35 dana ($0,47 \pm 0,08 \times 10^9/l$). Na osnovu dobijenih vrednosti prosečnog broja bazofila kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića posle dve i tri nedelje od inficiranja, i ćurića tretiranih samo deksametazonom, može da se zaključi da ni infekcija prouzrokovana sa *A. fumigatus* niti deksametazon ne utiču značajno na prosečan broj bazofilnih leukocita tokom posmatranog perioda trajanja oglada (Tabele 10, 12, 13).

Vrednost prosečne koncentracije hemoglobina ustanovljena kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2), posle dve nedelje od inficiranja, starosti od 28 dana iznosila je $8,18 \pm 0,44$ g/dl i posle tri nedelje se nije promenila ($8,26 \pm 1,12$ g/dl). Takođe, nije ustanovljena značajna razlika u dobijenim vrednostima prosečnih koncentracija hemoglobina kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića, kako posle dve, tako i posle tri nedelje od infekcije, odnosno starosti od 28 i 35 dana u poređenju sa dobijenim vrednostima prosečnih koncentracija hemoglobina kod ćurića tretiranih samo deksametazonom starosti 28 dana ($8,94 \pm 0,36$ g/dl) i starosti 35 dana

($8,77 \pm 0,32$ g/dl). Na osnovu dobijenih vrednosti prosečnih koncentracija hemoglobina kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića posle dve i tri nedelje od inficiranja, i ćurića tretiranih samo deksametazonom može da se zaključi da infekcija i deksametazon zajedno, u odnosu na primenu samo deksametazona ne utiču značajno na prosečnu koncentraciju hemoglobina kod ćurića tokom trajanja oglada. Takođe, ni sama infekcija izazvana *A. fumigatus* nije značajno uticala na prosečnu koncentraciju hemoglobina ustanovljenu kod ćurića posle dve i tri nedelje od inficiranja u poređenju sa dobijenom vrednošću prosečnih koncentracija hemoglobina kod intaktnih-neinficiranih ćurića (Tabele 10, 11).

6. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je veštačka intratrahealna infekcija ćurića sa suspenzijom spora *A. fumigatus* u koncentraciji od $5,056 \times 10^7$ po jedinki, u starosti od 14 dana. Eksperiment je izveden na ćurićima, jer je poznata njihova veća osetljivost na ovaj respiratorni patogen u poređenju sa ostalim vrstama živine, kao i u ovoj starosnoj dobi da bi se inokulum lakše i bezbednije aplikovao u traheju (Islam i sar., 2009; Kureljušić i sar., 2011; Kapetanov i sar., 2011). Glavni razlog povećane osetljivosti ćurića prema prirodnoj infekciji, pored prirodne sklonosti, je i viša ambijentalna temperatura koja je neophodna u prvim danima uzgoja ćurića. Ona značajno pogoduje razmnožavanju *A. fumigatus*, pre svega, u prostirci, ali i u drugim delovima objekta za uzgoj.

Za eksperiment su odabrani neinficirani ćurići, odnosno jedinke koje nisu bile u kontaktu sa *A. fumigatus* tokom inkubacije jaja, niti tokom njihovog boravka u inkubatorskoj stanici, što je pre formiranja ogleđa potvrđeno mikološkim ispitivanjem organa žrtvovanih ćurića.

Načini, odnosno putevi unošenja *A. fumigatus* u organizam eksperimentalne živine mogu da budu različiti: preko kontaminirane prostirke, intrapulmonalnom i intrasakularnom aplikacijom suspenzije spora prouzrokovalača, inhalacijom aerosola, odnosno nebulizacijom (Julian i Goryo 1990; Steinbach i sar., 2004; Beernaert i sar., 2008). Navedeni načini aplikacije suspenzije spora *A. fumigatus*, u cilju izazivanja veštačke infekcije imaju određene nedostatake koje navodi i Fedde, 1998. Pre svega, kod nekih od navedenih puteva inficiranja nije unapred definisana individualna infektivna doza *A. fumigatus*, odnosno koncentracija spora u tačno određenoj zapremini inokuluma. Takođe, nekim načinima izazivanja veštačke infekcije se zaobilazi prednji deo respiratornog sistema, pa se patogenezu infekcije, nastala u prirodnim uslovima ne može u potpunosti razjasniti. Zbog navedenih nedostataka napred opisanih načina izazivanja eksperimentalne infekcije opredelili smo se da infekciju izazovemo intratrahealnom aplikacijom definisanog broja spora *A. fumigatus*. Ovaj način aplikacije

spora prouzrokovača obezbeđuje identične uslove za sve jedinke za razvoj infekcije, i praćenje intenziteta i distribucije lezija u tkivima.

Imajući u vidu literaturne podatke o korišćenim koncentracijama spora *A. fumigatus* kojima su izazivane veštačke infekcije kod ćurića i pilića odlučili smo se da infekciju ćurića ove starosne kategorije izazovemo sa relativno visokom koncentracijom spora *A. fumigatus* (Steinbach i sar., 2008; Jezdimirović i sar., 2013).

Pored primene visoke koncentracije spora, i sama intratrahealna aplikacija favorizuje patogen u odnosu na domaćina, jer se njom izbegava uticaj nespecifičnih odbrambenih mehanizama prisutnih u nosu, laringsu i prednjem delu traheje. Favorizovanjem uzročnika i stvaranjem uslova za nastanak infekcije dokazali smo da sama gljivica *A. fumigatus* može da prouzrokuje aspergilozu sa kliničkom slikom i odgovarajućim patomorfološkim supstratom kod zdravih ćurića držanih pod optimalnim ambijentalnim uslovima, što je u skladu sa istraživanjima Dagenais i Keller (2009).

Takođe, Kapetanov i saradnici (2011) ustanovili su da zdrava živina izložena uticaju visoke koncentracije konidija *A. fumigatus* može da ispolji kliničku sliku aspergiloze. Međutim, istraživanja Tell-a (2005) pokazuju da je za nastanak aspergiloze kod zdrave živine neophodan uticaj jednog ili više stresora ili postojanje imunosupresije.

Prema nekim istraživanjima nastanak aspergiloze zavisi od patogenosti soja *A. fumigatus*, kao i njegovog porekla (Dyar i sar., 1984; Peden i Rhoades, 1992). Rezultati ovih autora pokazuju da živina može da oboli od teškog oblika aspergiloze ako *A. fumigatus* potiče iz prostirke od drvene strugotine. Prema mišljenju Rementeria i saradnika (2005) za razvoj bolesti i težinu kliničke slike veoma je bitna virulencija uzročnika koja je multifaktorijalna i kodirana sa više gena. Poznato je da konidije proizvode enzime značajne za sintezu melanina, pigmenta sa protektivnim dejstvom (Latge, 2001; Pihet i sar., 2009). Svakako, u patogenezi aspergiloze značajnu ulogu ima i gliotoksin - sekundarni metabolit plesni sa više bioloških dejstava. Međutim, dokazano je da svi sojevi *A. fumigatus* ne proizvode gliotoksin (Tsunawki i sar., 2004; Boudra i Morgavi, 2005; Lewis i sar., 2005; Orciuolo, 2007).

Imajući u vidu navedene podatke, želeli smo takođe da ispitamo da li, i u kojoj meri imunosupresija ćurića izazvana višekratnom parenteralnom primenom deksametazona povećava njihovu osetljivost na *A. fumigatus*, i utiče na intenzitet

razvoja patomorfološkog supstrata i distribuciju lezija u tkivima ćurića držanih u uobičajenim ambijentalnim uslovima. Eksperiment je koncipiran tako da bi u prirodnim uslovima infekcije izazvane samo *A. fumigatus*-om kod ćurića izloženih stresu (vakcinacija, prenaseljavanje, loš menadžment prostirke) ili smanjenom aktivnošću imunskog sistema (dugotrajna primena antibakterijskih lekova i drugih imunosupresora) mogle da se očekuju kliničke i patomorfološke promene kao kod ćurića eksperimentalno inficiranih. U tu svrhu deksametazon je primenjivan i.m. u dozi od 4 mg/kg telesne mase tokom šest uzastopnih dana pre izazivanja eksperimentalne infekcije sa *A. fumigatus*.

Model ponavljane trodnevne i.m. primene deksametazona u dozi od 2 do 5 mg/kg ili trokratne primene sa razmacima od po dva dana kod ćurića i pilića, u cilju izazivanja imunosupresije i/ili stresa koristili su Huff i saradnici (2001) i Le Loch i saradnici (2006). Imunosupresivno dejstvo deksametazona, u primenjenim dozama na modelu živine, potvrđivano je hematološkim ispitivanjem odnosa heterofila i limfocita. Imunosupresija i/ili stres izazvani deksametazonom praćeni su promenama u krvnoj slici, heterofilijom i limfopenijom, a ovaj odnos se značajno povećava upotrebom viših doza glikokortikoida (Aengwanich, 2007).

Osnovu za diskusiju čine dobijeni klinički znaci infekcije sa *A. fumigatus* kod imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića, makroskopski i mikroskopski nalaz na respiratornim organima, odnosno rezultati morfološkog ispitivanja organa obojenih pomoću tri histohemijske metode. Takođe, bilo je značajno razmotriti rezultate mikološkog i molekularnog ispitivanja uzoraka organa ćurića, imunskog odgovora na lokalno aplikovani antigen fitohemaglutinin, kao i rezultate hematološkog ispitivanja kod imunokompetentnih i imunosuprimiranih ćurića.

Inficirani ćurići su posmatrani svakodnevno tokom tri nedelje od inficiranja u cilju praćenja pojave kliničkih simptoma bolesti. Klinički simptomi infekcije uočeni su već nakon prvog dana od inficiranja kod dve trećine deksametazonom tretiranih (ogledna grupa 2) i netretiranih ćurića (ogledna grupa 1). Intenzitet kliničkih simptoma oboljenja bio je veći kod ćurića tretiranih deksametazonom u odnosu na netretirane. U prva tri dana od inficiranja kod ćurića obe ogledne grupe dominiraju opšti simptomi (depresija, somnolentnost, opuštenost krila, nakostrešenost perja, skupljanje u grupe i dr). Od četvrtog dana kod obe ogledne grupe ćurića uočavaju se respiratorni simptomi

koji su značajno intenzivniji kod ćurića tretiranih deksametazonom (ogledna grupa 2). Ovaj nalaz je verovatno posledica ekstenzivnih inflamatornih procesa u plućnom tkivu i vazдушnim kesama koji doprinose smanjenju respiratorne površine i protoka vazduha u vazдушnim kesama, što za posledicu ima disanje na „otvoreni kljun“. Promene na očima, blefarospazam, fotofobija, periorbitalni edem i zamućenje korneje ustanovljeni kod ćurića prirodno inficiranih sa *Aspergillus* spp. (Hope i sar., 2009; Beernaert, 2010) nisu uočene kod ćurića ni u jednoj oglednoj grupi inficirane sa *A. fumigatus*.

Ipak, uočeni znaci oboljenja kao što su: uvlačenje vrata i obaranje glave u ventralnom položaju sa zatvorenim očnim kaptcima ukazuju na postojanje fotofobije. Iz literature je poznato da intenzitet kliničkih manifestacija aspergiloze zavisi od veličine infektivne doze, imunskog statusa i starosti jedinki (Dahlhansen, 2006). Slično zapažanje imaju i Marr i saradnici (2004), i navode da su kliničke manifestacije aspergiloze rezultat stepena infekcije organizma, oštećenja tkiva i imunskog odgovora domaćina. Pored toga, simptomi bolesti zavise i od toga da li je infekcija lokalna ili sistemska, odnosno koji su organi ili organski sistemi zahvaćeni patološkim procesom.

Klinički simptomi aspergiloze ustanovljeni posle eksperimentalne infekcije kod ćurića u našem istraživanju vrlo su slični simptomima opisanim od strane drugih istraživača (Latge, 1999; Saif i sar., 2008; Zapra i sar., 2008), s tom razlikom da distenzija abdomena opisana od strane drugih istraživača nije bila viđena kod inficiranih ćurića u našem istraživanju. Prema navodima ovih autora distenzija je posledica ascitesa koji nastaje zbog insuficijencije plućne cirkulacije izazvane granulomatoznom inflamacijom. Tokom pet nedelja od inficiranja nisu uočeni neurološki simptomi ni kod ćurića tretiranih deksametazonom niti kod netretiranih, a koje opisuje grupa istraživača (Akan i sar., 2002; Kureljušić i sar., 2011, 2012). Ovaj nalaz je najverovatnije posledica izostajanja inflamatornih procesa u tkivu mozga ćurića. Realno je pretpostaviti da bi u daljoj evoluciji bolesti došlo do hematogene diseminacije gljivičnih elemenata i u ovo tkivo, a naročito u mali mozak. Verujemo da je za ostvarivanje ovog procesa neophodno da prođe duži vremenski period od infekcije ili je možda potrebna značajno veća pojedinačna infektivna koncentracija spora *A. fumigatus*.

U našem istraživanju, intratrahealna aplikacija spora *A. fumigatus* u koncentraciji od $(5,056 \times 10^7)$ i volumenu od 0,3 ml po jedinki sigurno prouzrokuje kliničke simptome akutne aspergiloze kod najmanje dve trećine tretiranih intaktnih

ćurića starosti četrnaest dana, bez pojave uginuća tokom pet nedelja trajanja eksperimenta.

Rezultati istraživanja uticaja infekcije izazvane *A. fumigatus* na prirast ćurića tokom tri nedelje od inficiranja pokazuju da infekcija neznatno smanjuje prosečnu telesnu masu ćurića u poređenju sa telesnom masom neinficiranih ćurića. Takođe, ustanovili smo da šestodnevna i.m. primena deksametazona ne utiče na telesnu masu neinficiranih ćurića.

Međutim, značajno smanjenje telesne mase ($p < 0,05$) ustanovljeno je kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića posle dve i tri nedelje od inficiranja u poređenju sa dobijenom vrednošću telesne mase kod samo inficiranih, neinficiranih i samo deksametazonom tretiranih ćurića.

Ovo smanjenje telesne mase izazvano deksametazonom i infekcijom je najverovatnije posledica produženog kataboličkog dejstava leka na metabolizam proteina i lipida udruženog sa toksičnim i stresogenim delovanjem produkata *A. fumigatus*. Poznato je da je kortikosteron glavni endogeni glikokortikoid kod živine, a da je kortizol neznatan produkt medulocita nadbubrežne žlezde (Carsia, 2015). Njihova duža egzogena primena, ili endogeno oslobađanje kortikosterona tokom dejstva stresora smanjuje telesnu masu pilića, a posebno masu grudne muskulature (Lin i sar., 2006).

Kortikosteron povećava razgradnju mišićnih proteina, smanjuje sintezu proteina skeletne muskulature i koncentraciju ukupnih aminokiselina kod pilića (Gao i sar., 2008), a povećava koncentraciju urata u krvi (Lin i sar., 2007). U našem ispitivanju korišćen je deksametazon u dozi od 4mg/kg. Ova, i niže doze deksametazona primenjivane su kod živine tokom tri i pet dana, trokratno – sa razmakom od dva dana u cilju izazivanja stresa ili imunosupresije. Ustanovljeno je da glukokortikoid - kortikosteron i sintetski glukokortikoid - deksametazon smanjuju relativnu masu primarnog imunološkog organa Fabricijeve burse i sekundarnog organa slezine (Shini i sar., 2008). Prouzrokuju inicijalnu prolaznu stimulaciju imunskog odgovora na infekciju virusom infektivnog bronhitisa, a zatim izrazitu inhibiciju (Shini i sar., 2008). Glukokortikoidi povećavaju odnos heterofila prema limfocitima u cirkulaciji (Shini i sar., 2009), i sve više se veruje da je ovaj odnos pravi indikator stresa (Vicuna i sar., 2015), a ne visoka koncentracija kortikosterona u krvi, kako se ranije tvrdilo (Resanović i Palić, 2009).

Kortikosteron povećava ekspresiju interleukina (IL): IL-1beta, IL-6, IL-10, IL-12 alfa i IL-18, a smanjuje koncentraciju hemokina i faktora rasta beta 4 u cirkulišućim heterofilima (Shini i sar., 2010). Deksametazon i kortikosteron suprimiraju rast pilića (Hu i sar., 2010; Song i sar., 2011), smanjuju masu skeletnih mišića i povećavaju degradaciju proteina, što se manifestuje povećanjem koncentracije 3-metil histidina u pektoralnoj i femoralnoj muskulaturi (Dong i sar., 2007).

Činjenica je da se primenjeni deksametazon - natrijum fosfat brzo eliminiše iz organizma tretiranih brojlera, i da mu je poluvreme eliminacije manje od 1 časa (Watteyn i sar., 2013). Međutim, njegova biološka i farmakološka dejstva traju mnogo duže, i posledica su mehanizma delovanja (Jezdimirović, 2010), dok infekcija sa *A. fumigatus* predstavlja kontinuirani stresorni faktor koji stimuliše oslobađanje kortikosterona i njegov negativan uticaj na telesnu masu ćurića (Ferguson i Hoenig, 2001).

U našem istraživanju, deksametazon primenjivan i.m. u toku šest uzastopnih dana u dozi od 4mg/kg smanjivao je nedeljni prirast i ukupnu telesnu masu postignutu tokom tri nedelje kod neinficiranih ćurića u poređenju sa telesnom masom netretiranih i inficiranih ćurića. Takođe, značajno smanjenje telesne mase pilića zabeleženo je posle sedmodnevne primene deksametazona u hrani u dozi od 2mg/kg (Song i sar., 2011).

Patomorfološki supstrat ustanovljen je prvog i trećeg dana od infekcije kod 58% inficiranih ćurića (grupa O-1) i kod 41% inficiranih i deksametazonom tretiranih (grupa O-2). Sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od veštačke infekcije patomorfološki supstrat nađen je kod 61% inficiranih i kod 78% inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića, i primarno je situiran u nižim delovima respiratornog sistema (pluća i vazdušne kese).

Patološke promene na plućima manifestovale su se jasno uočljivom bilateralnom kongestijom i edemom. Patološke promene na vazdušnim kesama karakterisale su se zamućenjem, difuznim ili nodoznim zadebljanjem zidova, a kod pojedinih uočavan je beli - mukoidni eksudat lokalizovan intraluminalno u samim vazdušnim kesama. Ovakav nalaz opisao je i Keymer (1982).

U ovoj eksperimentalnoj infekciji sa *A. fumigatus*, patološke promene lokalizovane su u abdominalnim vazdušnim kesama kako kod inficiranih, tako i kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića, a manifestovale su se u vidu zamućenja i

diskretnog zadebljanja njihovih zidova. Ono je kod inficiranih ćurića bilo prisutno i trećeg dana nakon inficiranja, a kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića pored abdominalnih zahvaćene su i kaudalne torakalne vazdušne kese.

Histopatološki nalaz dobijen kod inficiranih ćurića ukazuje da zadebljanje zidova vazdušnih kesa nastaje usled edema i celularne infiltracije heterofilima, makrofagima i limfocitima. Ovakav celularni infiltrat u zidu vazdušnih kesa kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (grupa O-2) ima tendenciju formiranja nodusa, odnosno granuloma. Ovi granulomi nisu jasno ograničeni, i regresivne promene se ne uočavaju na njima. Inicijalne promene na zidovima abdominalnih vazdušnih kesa najverovatnije su posledica njihove direktne anatomske povezanosti sa primarnim bronhusom.

Ustanovili smo da već sedmog dana od inficiranja dolazi do intenziviranja promena na zidovima vazdušnih kesa. Zidovi su zadebljani, a kod ćurića tretiranih deksametazonom u inflamatorni proces uvučeni su i kranijalni torakalni sakusi, što govori o ekstenziji procesa. Slične promene u vidu fulminantnog zapaljenja, opisane su četvrtog dana od inficiranja kod ćurića starih 9 i 19 dana (Kunkle i Rimler, 1996). Prema njihovom mišljenju, u početnoj fazi bolesti zahvaćen je intersticijum vazdušne kese, a ne njena površina.

U našem ispitivanju nije bilo moguće da se to potvrdi. U daljoj evoluciji bolesti, već 14 dana posle infekcije na zidovima abdominalnih, kranijalnih i kaudalnih torakalnih vazdušnih kesa zapažene su promene u vidu fokalnih beličastih zadebljanja. U istom periodu kod inficiranih ćurića tretiranih deksametazonom na levoj abdominalnoj kesi uočen je prominentni solitarni granulom - aspergilom, a u kaudalnoj torakalnoj vazdušnoj kesi mlečno - beli kazeozni sadržaj. Histopatološki nalaz ovih promena, kod inficiranih ćurića ukazuje da promene potiču od tek formiranih granuloma koga čine epiteloidne i multijedarne - džinovske ćelije, dok se na periferiji nalaze limfociti i heterofili. Kod inficiranih ćurića tretiranih deksametazonom zadebljanje vazdušnih kesa je posledica konfluiranja granuloma čiji su centralni delovi sa uznapredovalim regresivnim promenama. Dvadesetprvog dana od infekcije kod inficiranih ćurića (grupa O-1), uz difuzno zadebljanje zidova abdominalnih i torakalnih vazdušnih kesa, uočen je i intraluminalni bledo - žuti kazeozni sadržaj, a kod inficiranih i tretiranih deksametazonom (grupa O-2) na zidovima kesa uočavaju se i granulomi.

Ovakav nalaz u velikoj meri odgovara zapažanju i drugih autora (Keymer, 1982). Isti autor smatra da nalaz mlečno - beličastog mukoidnog eksudata u vazдушnim kesama ide u prilog nastajanja invazivne aspergiloze.

Analizirajući makroskopsku i mikroskopsku sliku plućnog tkiva kod inficiranih ćurića i inficiranih i deksametazonom tretiranih, a sve povezujući u jednu etiopatogenetsku celinu sa jedinstvenom patomorfološkom slikom nameće se zaključak da lezije na plućima pokazuju bivalentni morfološki karakter. Radi preciznijeg praćenja patoloških promena, u ovom ispitivanju su pored rutinskog HE bojenja korišćene i PAS i Grocott metode za dokazivanje elemenata *A. fumigatus* u tkivnim isečcima ispitujućih organa.

U prvom danu posle infekcije dominira hiperemija i edem pluća uz početnu fokalnu ili difuznu ćelijsku infiltraciju. Donekle, sličnu sliku u prvim danima aspergilozne infekcije opisuje Julian i Gory (1990), i opisuju dominaciju prisustva fibrina i fibrinozne pneumonije kao prvom nalazu u daljoj evoluciji patološkog procesa. Knežević i Matejić (1996) nalaze hepatizovane delove plućnog parenhima, najčešće na njihovim kaudalnim delovima.

Od 3. do 21. dana posle infekcije dominira granulomatozna pneumonija različitog obima i intenziteta, što je uslovljeno, pored ostalog, i proteklim vremenom od momenta inficiranja. U početku granulomi su solitarni, a kasnije postaju multipli da bi 14. i 21. dana posle infekcije konfluirali u veće granulome. U našem ispitivanju, prisutni granulomi u plućnom tkivu imaju tri različita oblika: solitarni, multipli i međusobno konfluisani bez regresivnih promena, sa diskretnim i opsežnim regresivnim promenama. Regresivne promene (nekroza) u centralnom delu granuloma detektuju se tek od sedmog dana inficiranja, a manifestne su 14. i 21. dana. Međutim, Kunkle i Rimler (1996) nalaze granulomatozne promene sa nekrozom već 72 časa od infekcije.

U centru granuloma dokazuju se gljivični elementi kao razgranate septirane hife ponekad vrlo gusto međusobno isprepletane, a ponekad i kao slobodne spore, što se naročito ističe u uzorcima bojenim metodama PAS i Grocott. Elementi gljivica otkriveni su u citoplazmi multijedarnih džinovskih i epiteloidnih ćelija, što je u saglasnosti sa nalazom i drugih autora (Kunkle i Rimler, 1996). Nalaz germinativnih oblika plesni u krvnim sudovima je dokaz njihove hematogene diseminacije (Kunkle i Rimler 1998), što u našem ispitivanju nije ustanovljeno.

Slične granulomatozne formacije opisuju i drugi autori (Mullbacher i sar., 1985; Pal i sar., 1988; Sutton i sar., 1994; Sutton i sar., 1996; Richard i sar., 1997; Akan i sar., 2002). Sutton i saradnici (1996), navode mogućnost da plesni proliferišu unutar granuloma koji se postepeno povećava, a da toksini i enzimi plesni oštećuju tkivo. Prema mišljenju nekih istraživača (Mullbacher i sar., 1985; Monod i sar., 1993; Richard, 1997) za nastanak ekstenzivnih tkivnih nekroza odgovorne su elastaze *A. fumigatus* i gliotoksin koji inhibiraju fagocitozu ili remete saradnju B i T limfocita. Prema mišljenju Kwon-Chung, 1992 i Ben-Ami, 2010 antiangiogeni efekat gliotoksina je odgovoran za nastanak invazivne aspergiloze. Sličan antiangiogeni efekat ima i metabolit fumagilin koji inhibira proliferaciju endotelnih ćelija (Rementeria i sar., 2005). Poznato je da *A. fumigatus* proizvodi veći broj alergogenih molekula koji potiču iz ćelijskog zida, a sastoje se od proteina i polisaharida. Međutim, njihova uloga je nepoznata u patogenezi bolesti kod životinja (Latge i sar., 2007; Gastebois i sar., 2009).

Veći broj autora (Knežević i Matejić, 1996; Kunkle i Richard 1996; Akan i sar., 2002) objavljuje nalaz multijedarnih džinovskih ćelija tipa Langhans u sastavu granuloma. Međutim, njihov nalaz se ne odnosi na brojnost i raspored ovih ćelija, kako je opisano u ovom radu. U našem histopatološkom nalazu multijedarne džinovske ćelije su raspoređene u obliku venca oko nekrotizovanog centra granuloma, a ponekad imaju radijalni ili diseminirani raspored, što nije opisano u dostupnoj literaturi. Ovakva mnogobrojnost multijedarnih džinovskih ćelija tipa Langhans najverovatnije ukazuje na vrlo zastupljen primarni ćelijski infiltrat u samom granulomu, čijom transformacijom nastaju multijedarne džinovske ćelije. Po našem mišljenju, ovo je posledica nastojanja organizma za uspostavljanjem ravnoteže između uzročnika i njegovih efektorskih mehanizama. Sa druge strane, Kunkle i Rimler (1996) ovakav inflamatorni proces smatraju odgovornim za inhibiciju propagacije uzročnika u druga tkiva. Prepoznavanje *A. fumigatus* od strane mnogobrojnih makrofaga odvija se preko ćelijskih receptora PRR, *toll-like* receptora (TLR) i lektina tipa C (Latge i sar., 2007).

Histopatološki, trećeg dana nakon infekcije kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića ustanovljen je granulomatozni bronhitis. Granulomi su smešteni u mukozu i submukozu, i ne pokazuju regresivne promene. Granulomi dovode do stenoze, što se sigurno odrazilo na kliničku sliku bolesti. U ovom periodu, u propriji mukoze bronha inficiranih ćurića vide se samo nakupine heterofila i limfocita. Sličan nalaz,

opisan je i kod pilića uginulih 15 dana posle infekcije kod kojih je ustanovljeno 85% obturiranih parabronha sa fibrinom, nekrotičnim detritusom i granulomima (Julian i Goryo 1990). Ustanovljene promene u njihovom istraživanju se razlikuju od naših, jer je inflamacijom obuhvaćen tercijerni bronhus. Kada se kompletno analizira makroskopski i histopatološki nalaz u našem ispitivanju, može se konstatovati da se kod eksperimentalnih ćurića razvila invazivno nekrotična granulomatozna pneumonija.

Poređenjem nalaza dobijenog kod ćurića eksperimentalnih grupa (O-1; O-2) uočava se razlika u evoluciji, karakteru i intenzitetu patoloških promena. Patološke promene kod ćurića tretiranih deksametazonom pre infekcije *A. fumigatus* nastaju ranije, jačeg su intenziteta i obimnijeg karaktera, a i regresivne promene su obimnije i ranije nastaju. Verujemo da su razlike u intenzitetu i obimu lezija ustanovljene kod inficiranih ćurića i inficiranih i tretiranih deksametazonom posledica delovanja deksametazona.

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih uzorkovanjem delova pluća i vazdušnih kesa od po 6 inficiranih ćurića za svaki dan žrtvovanja, ustanovljeno je da je *A. fumigatus* izolovan iz respiratornih organa već prvog i trećeg dana od infekcije kod 4 od 12 inficiranih jedinki (33%). Sedmog dana, *A. fumigatus* je izolovan iz respiratornih organa kod 50% inficiranih jedinki, četrnaestog kod 83,33% ćurića i dvedesetprvog dana od infekcije prouzrokovač je izolovan kod 6 od 6 žrtvovanih ćurića (100%).

Ustanovili smo da se sedmog i četrnaestog dana od infekcije povećava broj izolovanih *A. fumigatus* iz respiratornih organa ćurića inficiranih i tretiranih deksametazonom u odnosu na broj netretiranih ćurića. Ovaj nalaz se objašnjava činjenicom da je deksametazon u prvim danima od infekcije poboljšavao alveolarnu fagocitnu aktivnost, zbog čega je broj izolovanog uzročnika iz pluća i vazdušnih kesa bio manji. Kasnije, kako se produžavalo vreme od završetka tretmana lekom, njegova koncentracija se smanjivala u krvi i tkivima i odbrambena aktivnost. To je dovelo do povećanja procenta ćurića kod kojih je izolovan *A. fumigatus* u odnosu na netretirane jedinke. Istraživači Matsuse i saradnici (2013) ukazuju da deksametazon poboljšava fagocitnu aktivnost i može da ima protektivno, ali i terapijsko delovanje kod nekih gljivičnih infekcija, pa se savetuje njegova istovremena primena sa antimikoticima u lečenju ovih infekcija. Femenia i saradnici (2007) navode da je izolacija *A. fumigatus* iz

vazdušnih kesu i pluća postignuta posle 1 do 5. dana od veštačke infekcije jednodnevnih ćurica.

Tretman deksametazonom značajno ne povećava broj ćurica iz čijih je uzoraka srca izolovan *A. fumigatus*, u odnosu na broj izolovanog prouzrokovača iz uzoraka srca netretiranih ćurica. Deksametazon odlaže, odnosno produžava vreme inicijalne izolacije *A. fumigatus* iz uzoraka srca (7. dana od inficiranja) u odnosu na inicijalno vreme izolacije uzročnika iz srca ćurica koji nisu tretirani deksametazonom (1. dan od infekcije). Slične rezultate, odnosno izolaciju prouzrokovača iz srca objavili su Martin i saradnici (2007) kod pilića, uzrasta pet nedelja i prirodno inficiranih sa *Aspergillus* spp. Mikološki nalaz u srcu potvrđuje hematogeno širenje *A. fumigatus*, posebno posle druge i treće nedelje od infekcije.

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja uzoraka jetre, već posle prvog dana od infekcije ustanovljena je izolacija *A. fumigatus* kod 30% jedinki. U kasnijim vremenskim periodima od infekcije, odnosno žrtvovanja (3, 7, 14. i 21. dan) *A. fumigatus* nije bio izolovan.

Nasuprot ovim rezultatima, kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurica prouzrokovač je izolovan kod 33% ćurica posle 7, 14 i 21. dana od infekcije.

Dobijeni rezultati pokazuju da tretman deksametazonom neznatno utiče na broj izolata *A. fumigatus* iz jetre, ali da je prisustvo uzročnika moguće dokazati i posle 7, 14. i 21. dana od infekcije. Sličan stepen izolacije *A. fumigatus* iz jetre eksperimentalno inficiranih ćurica posle 1. do 5. dana od inficiranja dobili su Femenia i saradnici (2007). Uzročnik je izolovan iz tkiva jetre 3. i 5. dana od inficiranja kod 2 od 15 inficiranih ćurica (oko 13 %).

Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih uzorkovanjem tkiva mozga inficiranih ćurica može da se zaključi da je izolacija *A. fumigatus* izostala tokom prve dve nedelje od infekcije, a posle tri nedelje uzročnik je izolovan kod 16% jedinki. Sa druge strane, broj izolata uzročnika iz tkiva mozga ćurica tretiranih deksametazonom bio je veći, kako posle dve (kod 3 ćureta od 6; 50%), tako i posle tri nedelje (kod 4 ćureta od 6; 67%) od infekcije u poređenju sa brojem izolata kod inficiranih i netretiranih ćurica, posle dve nedelje (0 od 6 ćurica) i tri nedelje od infekcije (kod 1 ćureta od 6; 16%). Rezultati su pokazali da deksametazon povećava broj izolata *A. fumigatus* iz mozga, ali je izolacija uzročnika moguća tek posle dve nedelje od

inficiranja. Ovim se dokazuje da je prisustvo *A. fumigatus* u mozgu ćurića moguće otkriti tek posle tri nedelje od infekcije, i to kod malog procenta inficiranih jedinki. Rezultati kvalitativne molekularne detekcije *A. fumigatus* iz uzoraka delova pluća i vazušnih kesaa, srca, jetre, bubrega, mozga i kostne srži ćurića posle 1., 3., 7., 14. i 21. dana od veštačkog inficiranja, kao i kod ćurića tretiranih deksametazonom dobijeni su korišćenjem dvostepene (nested) lančane reakcije polimeraze (PCR). Analizom rezultata i njihovim poređenjem između ogledne grupe 1 i ogledne grupe 2 ustanovljen je veći broj pozitivnih uzoraka na prisustvo DNK *A. fumigatus* u oglednoj grupi 2. Ovakav nalaz se može objasniti imunosupresivnim dejstvom deksametazona kojim su bili tretirani ćurići ogledne grupe 2. Shodno tome u ovoj grupi ćurića infekcija izazvana sa *A. fumigatus* bila je više stimulisana pa je inficiranje pojedinih tkiva i organa nastajalo brže.

Zbirni uzorci pluća i vazdušnih kesaa bili su kod obe ogledne grupe pozitivni u svim periodima žrtvovanja. Zbirni uzorci srca bili su pozitivni sedmog dana od momenta inficiranja kod obe ogledne grupe. Zbirni uzorci jetre bili su pozitivni prvog dana nakon infekcije kod ogledne grupe 1, dok su kod ogledne grupe 2 bili potvrđeni tek sedmog dana nakon žrtvovanja. Zbirni uzorci delova mozga kod ogledne grupe 1 bili su pozitivni tek 21. dana nakon infekcije dok je kod ogledne grupe 2 to bilo potvrđeno već prvog dana nakon žrtvovanja. Ovaj nalaz je najverovatnije posledica izostajanja inflamatornih procesaa u tkivu mozga ćurića, a u evoluciji bolesti je došlo do hematogene diseminacije gljivičnih elemenata i u ovo tkivo. Iz literature je poznato da je to najčešće mali mozak, međutim makroskopske i histološke lezije u ovom ispitivanju nisu ustanovljene. Može se pretpostaviti da je za evoluciju patoloških lezija neophodan duži vremenski period. Bubregr i kostna srž koji su uzorkovani samo za molekularno ispitivanje bili su pozitivni kod ogledne grupe 1 dvadesetprvog dana od infekcije, dok se kod ogledne grupe 2 detektovala DNK *A. fumigatus* 14 dana od veštačke infekcije, što se takođe može objasniti imunosupresivnim delovanjem deksametazona.

Za procenu ćelijskog imunskog odgovora, u ovom istraživanju, korišćen je test kožne bazofilne hipersenzitivnosti posle intradermalne aplikacije fitohemaglutinina (PHA). Iz literature je poznato da je kožna bazofilna ćelijski posredovana odložena preosetljivost izazvana intradermalnom aplikacijom PHA posebno korisna i jednostavna *in vivo* skrining metoda za procenu ćelijski posredovanog imunskog

odgovora i otkrivanje smanjene aktivnosti T limfocita (Stadecker i sar., 1977; Corkier i De Loach, 1990). Odgovor na intradermalnu aplikaciju PHA manifestuje se pojavom edema, a može da se čita posle 6 do 48 h od aplikacije (Martin i sar., 2006). U ovom ispitivanju reakcija na PHA, u vidu zadebljanja kože (DK) merena je posle 6, 12 i 24 sata od aplikacije antigena kod svih ćurića ispitivanih oglednih grupa, a ona je poređena sa DK kontrolnih ćurića kojima je intradermalno aplikovan sterilan fiziološki rastvor NaCl (SFR).

Prosečne vrednosti DK kod inficiranih (O-1) i ćurića kontrolne grupe dobijene posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije PHA i SFR nisu bile statistički značajne u funkciji vremena. Prosečne vrednosti DK inficiranih ćurića dobijene u funkciji vremena od aplikacije PHA (upoređivane između 6. i 12. i 12. i 24. časa) ne pokazuju statističku značajnost. Najveća prosečna vrednost DK ustanovljena je posle 24 časa od aplikacije PHA ($2,50 \pm 0,28$ mm). Ovakav nalaz može da se objasni činjenicom da edem kože, na mestu aplikacije PHA uglavnom nastaje zbog eksudacije plazme iz okolnih krvnih sudova, koja se odvija posle 6 do 12h od aplikacije. Druga faza edema obuhvata infiltraciju naknadno oslobođenih T limfocita osetljivih na PHA, i ona nastaje posle 24h od aplikacije antigena (Stadercker i sar., 1977; McCorkle i sar., 1980). Iz tih razloga, i u ovom slučaju zadebljanje kože je bilo najveće posle 24h od aplikacije.

Dobijeni rezultati prosečne vrednosti DK ćurića ogledne grupe 2 (O-2) i kontrolne grupe 2 (K-2) posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije SFR nisu bili statistički značajno različiti. Iako nije ustanovljena značajna razlika, kada se analiziraju apsolutne vrednosti DK, može da se zaključi da su vrednosti bile manje kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2). Ovaj nalaz ukazuje da su ćurići grupe O-2 imali slabiji imunski odgovor, kako zbog primene imunosupresivnog leka deksametazona, tako i zbog iscrpljenosti samog organizma i imunskog sistema izazvanog infekcijom sa *A. fumigatus* čiji toksini takođe mogu da prouzrokuju imunosupresiju.

Posle 6 sati od aplikacije PHA, prosečna vrednost DK kod ćurića ogledne grupe (O-2) u ovom periodu merenja, bila je statistički značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod inficiranih ćurića (O-1). Dvanaest sati nakon aplikacije PHA ustanovljena prosečna vrednost DK kod ćurića grupe (O-2) nije bila statistički značajna u poređenju sa vrednošću DK kod ćurića grupe O-1. Dvadesetčetiri sata od aplikacije

PHA prosečna vrednost DK kod ćurića ogleđne grupe 2 (O-2) bila je statistički veoma značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod ćurića ogleđne grupe 1 (O-1). I u ovom slućaju, značajno smanjenje DK kod ćurića grupe O-2 može se objasniti imunosupresivnim dejstvom deksametazona i toksina *A. fumigatus*.

Imunizacija je primarni metod za prevenciju bolesti. Roditeljska jata se vakcinišu inaktivisanim vakcinama i prenose antitela na potomstvo koja ih štite tokom prvih dana života. Usled serokonverzije antitela, ćurići se kasnije vakcinišu živim vakcinama, što im pruža dalju zaštitu tokom života. Na osnovu dobijenih vrednosti visine titra antitela prema atipičnoj kugi živine uočavamo bolji imunski odgovor kod ćurića kontrolne grupe (K-1) u odnosu na ćuriće kontrolne grupe tretirane deksametazonom (K-2). Dobijeni rezultati su posledica imunosupresivnog delovanja deksametazona. Inficirani ćurići (O-1) imali su bolji odgovor na inaktivisani virus atipične kuge živine i veći titar antitela u odnosu na inficirane i deksametazonom tretirane ćuriće (O-2). Ćurići obe ogleđne grupe imali su niži titar antitela u odnosu na titar antitela ustanovljen kod ćurića kontrolne grupe (K-1) i ćurića tretiranih deksametazonom (K-2).

Rezultati ispitivanja uticaja veštaćkog inficiranja ćurića *A. fumigatus* na prosećan broj eritrocita posle dve nedelje od inficiranja pokazuju da upotrebljena koncentracija spora *A. fumigatus* neznatno smanjuje njihov broj ($1,93 \pm 0,04 \times 10^{12}/l$) u poređenju sa vrednošću prosećnog broja eritrocita dobijenog kod ćurića kontrolne grupe ($2,05 \pm 0,13 \times 10^{12}/l$). Sličan stepen smanjenja prosećnog broja eritrocita kod inficiranih ćurića ($1,87 \pm 0,07 \times 10^{12}/l$) ustanovljen je i posle tri nedelje u poređenju sa istim kod ćurića kontrolne grupe ($1,98 \pm 0,11 \times 10^{12}/l$).

Značajno smanjenje broja eritrocita kod brojlerskih pilića prouzrokuju i *A. flavus* i *A. ochraceus* primenjivani u hrani (Tuzcu i sar., 2010; Anjorin i Cyriacus, 2014). Slično smanjenje broja eritrocita kod brojlerskih pilića ustanovljeno je posle šestonedelnog konzumiranja hrane kontaminirane sa *A. terreus* (Kiran i sar., 2015). Oćigledno je da je za razvoj anemije kod ćurića potrebna dugotrajnija kontinuirana infekcija sa *A. fumigatus* ili kraće izlaganje ćurića znaćajno većom koncentracijom konidija ovog prouzrokovaća od upotrebljene u našim istraživanjima. Takođe, dokazano je da su sekundarni metaboliti *A. flavus*, *A. ochraceus* i *A. terreus* znaćajno toksićniji za hematopoezu od mikotoksina koje produkuje *A. fumigatus* (Tuzcu i sar., 2010; Anjorin i

Cyriacus, 2014). Niži broj eritrocita, niži hematokrit i koncentracija hemoglobina ukazuju da se kod inficiranih ćurića i ćurića tretiranih deksametazonom ispoljavaju znaci anemije. Ovakav nalaz može biti posledica poremećaja hematopoeze ili pojačane razgradnje eritrocita.

Prosečan broj eritrocita kod inficiranih ćurića i tretiranih deksametazonom, ustanovljen posle dve nedelje od infekcije bio je neznatno veći ($2,21 \pm 0,60 \times 10^{12}/l$) u poređenju sa prosečnim brojem eritrocita ustanovljenim kod inficiranih ćurića ($1,93 \pm 0,04 \times 10^{12}/l$), i nešto manji u poređenju sa dobijenom vrednošću ispitivanog parametra kod ćurića tretiranih samo deksametazonom ($2,51 \pm 0,46 \times 10^{12}/l$) (pozitivna kontrola). Posle tri nedelje od infekcije kod ćurića tretiranih deksametazonom, prosečan broj eritrocita je bio smanjen ($1,97 \pm 0,14 \times 10^{12}/l$) u poređenju sa prosečnim brojem eritrocita ustanovljenim posle dve nedelje, i u odnosu na prosečan broj eritrocita ćurića tretiranih samo deksametazonom ($2,02 \pm 0,17 \times 10^{12}/l$), kontrolna grupa 2.

Poznato je da svi glikokortikoidi, pa i deksametazon, stimulišu hematopoezu i povećavaju broj eritrocita što je ustanovljeno i u našim ispitivanjima. Ovo neznatno povećanje vrednosti prosečnog broja eritrocita kod inficiranih ćurića tretiranih deksametazonom, u odnosu na vrednost prosečnog broj eritrocita dobijenu kod samo inficiranih ćurića bilo je izraženije posle dve u odnosu na tri nedelje od infekcije, i najverovatnije je posledica intenzivnijeg dejstva leka zbog održavanja nešto većih koncentracija deksametazona na mesto delovanja od onih koje bi se mogle ustanoviti posle tri nedelje.

Rezultati naših ispitivanja su pokazali da je vrednost prosečnog broja eritrocita bila manja kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2) od vrednosti prosečnog broja eritrocita dobijenog kod ćurića tretiranih samo deksametazonom (K-2). Ovo smanjenje broja eritrocita verovatno nastaje zbog inhibitornog hematopoeznog dejstva najznačajnijih mikotoksina (gliotoksin, fumagilin) koje je produkovao inokulisani referentni soj *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305. Poznato je da ovi mikotoksini mogu da inhibiraju sintezu DNK i RNK i izmene ćelijsku membranu, što za posledicu ima njeno značajno oštećenje i smrt ćelije (Dagenais i Keller, 2009).

Rezultati ispitivanja uticaja veštačkog inficiranja ćurića *A. fumigatus* na koncentraciju hemoglobina, posle dve nedelje od inficiranja pokazuju da infekcija značajno ($p < 0,05$) smanjuje prosečnu koncentraciju hemoglobina ($9,08 \pm 0,41g/dl$) u

poređenju sa vrednošću ovog parametra kod ćurića kontrolne grupe ($10,03 \pm 0,82$ g/dl). Posle tri nedelje od inficiranja ustanovljeno je neznatno povećanje prosečne koncentracije hemoglobina ($9,36 \pm 0,45$ g/dl) u poređenju sa vrednošću istog parametra kod inficiranih ćurića posle dve nedelje od infekcije.

Prosečna koncentracija hemoglobina, posle tri nedelje od infekcije bila je skoro nepromenjena u odnosu na prosečnu koncentraciju kod ćurića kontrolne grupe ($9,98 \pm 0,54$ g/dl) i neznatno veća od prosečne koncentracije hemoglobina ustanovljene kod ćurića posle dve nedelje od infekcije ($9,08 \pm 0,41$ g/dl).

Smanjenje koncentracije hemoglobina i vrednosti hematokrita ustanovljeni posle dve nedelje od infekcije ukazuju na razvoj anemije. Posle tri nedelje od infekcije ćurića delimično se uspostavlja homeostaza pa su koncentracija hemoglobina i vrednost hematokrita neznatno promenjeni u odnosu na vrednosti ovih parametara kod ćurića kontrolne grupe, starosti 35 dana.

Sličan nalaz pada koncentracije hemoglobina u krvi uočen je kod brojlerskih pilića posle konzumiranja hrane kontaminirane gliotoksinom (Reddy i sar., 1997). Anemija je uočena i kod brojlerskih pilića koji su tokom šest nedelja konzumirali hranu kontaminiranu *A. terreus* (Kiran i sar., 2015).

Vrednost prosečne koncentracije hemoglobina ustanovljena kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića (O-2), dobijena posle dve nedelje od inficiranja bila je neznatno niža ($8,18 \pm 0,44$ g/dl) od vrednosti prosečne koncentracije hemoglobina dobijene kod ćurića tretiranih samo deksametazonom ($8,94 \pm 0,36$ g/dl), odnosno ćurića kontrolne grupe (K-2), i znatno niža od prosečne vrednosti koncentracije hemoglobina ustanovljene kod ćurića posle dve nedelje od infekcije ($9,08 \pm 0,41$ g/dl) (grupa O-1).

Šestodnevna uzastopna aplikacija deksametazona znatno smanjuje koncentraciju hemoglobina kod tretiranih i inficiranih ćurića u odnosu na prosečnu vrednost koncentracije hemoglobina dobijenu kod ćurića tretiranih samo deksametazonom (grupa K-2), i vrednost koncentracije hemoglobina ustanovljene kod kontrolnih ćurića (grupa K-1), i to kako posle dve tako i posle tri nedelje eksperimenta (28 i 35 dana starosti).

Posle tri nedelje od inficiranja ćurića i tretiranih deksametazonom, prosečna koncentracija hemoglobina bila je skoro nepromenjena ($8,26 \pm 1,12$ g/dl) u odnosu na vrednost prosečne koncentracije Hbg ustanovljene posle dve nedelje, i neznatno niža od

vrednosti dobijene kod ćurića tretiranih samo deksametazonom ($8,77\pm 0,32\text{g/dl}$), odnosno ćurića grupe K-2.

U našim ispitivanjima uticaj deksametazona i infekcije sa *A. fumigatus* na koncentraciju hemoglobina ustanovljeno je da deksametazon neznatno smanjuje vrednost prosečne koncentracije hemoglobina u odnosu na vrednost prosečne koncentracije dobijene kod ćurića posle dve i tri nedelje od inficiranja i ćurića kontrolne grupe tretiranih samo deksametazonom (K-2), kao i ćurića kontrolne grupe 1 (K-1).

U ovom ispitivanju je dokazano je da šestodnevni predtretman deksametazonom ne utiče značajno na koncentraciju hemoglobina kod inficiranih ćurića posle dve i tri nedelje od infekcije, niti utiče na fiziološku koncentraciju hemoglobina. Slične rezultate ispitivanja uticaja deksametazona na hematološke parametre brojlerskih pilića starosti dvadeset dana dobio je i Aengvanich (2007). U ovom eksperimentu, deksametazon je primenjivan u hrani u dozama od 1, 2, 3, 4, 5 i 6 mg/kg tel. mase tokom tri nedelje, a hematološki parametri su praćeni posle prvog, sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od početka primene leka. Nije ustanovljen dozno - zavisani uticaj deksametazona. Deksametazon primenjivan u dozi od 1, 2 i 5 mg/kg značajno je povećavao prosečnu koncentraciju Hbg u odnosu na vrednost hemoglobina dobijenu kod brojlera kontrolne grupe, dok doza od 4 i 6 mg/kg deksametazona ne menja koncentraciju. Koncentracija hemoglobina od 1. do 14. dana eksperimenta se značajno smanjivala, a zatim značajno povećavala sve do 21. dana ogleda (Aengvanich, 2007).

Prosečna vrednost hematokrita ustanovljena posle dve nedelje od inficiranja iznosila je $31,70\pm 2,70\%$ i bila je manja od prosečne vrednosti hematokrita nađene kod ćurića kontrolne grupe ($33,70\pm 2,1\%$) starosti od 28 dana. Vrednost hematokrita dobijena posle tri nedelje od infekcije ćurića ($31,30\pm 2,84\%$) bila je nepromenjena u odnosu na vrednost hematokrita ustanovljene kod ćurića kontrolne grupe (K-2) ($30,8\pm 2,20\%$) starosti 35 dana. Ustanovili smo da deksametazon ne utiče značajno na vrednost hematokrita kod inficiranih ćurića niti menja njegovu fiziološku prosečnu vrednost kod ćurića kontrolne grupe 2. Međutim, rezultati ispitivanja uticaja deksametazona primenjivanog u hrani u dozama od 1, 2, 3, 4, 5 i 6 mg/kg telesne mase na fiziološku vrednost hematokrita kod brojlerskih pilića pokazuju da ovaj glikokortikoid samo u dozi od 2 mg/kg prouzrokuje statistički značajno ($p<0,05$) povećanje vrednosti hematokrita i to posle 7 i 21 dan od početka konzumiranja

medicirane hrane (Aengvanich, 2007). Nasuprot ovom nalazu Pyrrho i saradnici (2004) su ustanovili da deksametazon, nepoznatim mehanizmom, povećava volumen eritrocita.

U drugim ispitivanjima uticaja metabolita *A. flavus* i *A. ochraceus* kod brojlerskih pilića koji su tokom tri nedelje konzumirali hranu kontaminiranu mikotoksinima ovih gljivica nađeno je da mikotoksini značajno smanjuju prosečnu vrednost hematokrita (Tuzcu i sar., 2010; Anjorin i Cyriacus, 2014) što je u saglasnosti sa našim dobijenim rezultatima.

Rezultati ispitivanja uticaja infekcije sa *A. fumigatus* na ukupan broj leukocita posle dve nedelje od inficiranja ćurića pokazuju da infekcija, u ovom periodu posmatranja prouzrokuje statistički značajno povećanje broja leukocita ($15,66 \pm 4,14 \times 10^9/l$) ($p < 0,01$) u odnosu na vrednost prosečnog broja leukocita dobijenu kod ćurića kontrolne grupe ($6,71 \pm 0,96 \times 10^9/l$) u starosti od 28 dana.

Posle tri nedelje od inficiranja ukupan broj leukocita se povećavao i ustanovljena leukocitoza je bila statistički značajno veća ($25,91 \pm 8,59 \times 10^9$ ćelija/l; ($p < 0,001$) u poređenju sa prosečnom vrednošću ukupnog broja leukocita ustanovljenom posle tri nedelje starosti ćurića kontrolne grupe (K-1) ($11,22 \pm 3,22 \times 10^9$ ćelija/l). Posle tri nedelje od inficiranja ćurića ustanovljena vrednost prosečnog ukupnog broja leukocita bila je značajno veća ($p < 0,01$) od dobijene vrednosti prosečnog ukupnog broja leukocita kod ćurića posle dve nedelje od inficiranja ($15,66 \pm 4,14 \times 10^9$ ćelija /l).

Takođe, rezultati ispitivanja uticaja eksperimentalne intratrahealne infekcije sa *A. fumigatus* na ukupan broj leukocita kod japanske prepelice pokazuju da inokulacija *A. fumigatus* prouzrokuje leukocitozu koja je uočena posle dva do sedam dana od inokulacije (Chaudhary i Sadana, 1988) dok je u našim istraživanjima leukocitoza kod inficiranih ćurića bila najizraženija posle tri nedelje od inficiranja. Ovaj nalaz ukazuje na potpuni razvoj infekcije i borbe organizma protiv infekcije.

Rezultati ispitivanja uticaja *A. niger* na ukupan broj leukocita kod brojlerskih pilića koji su konzumirali hranu kontaminiranu ovom plesni tokom sedam nedelja pokazuju da *A. niger* značajno ($p < 0,05$) smanjuje ukupan broj leukocita, što je u suprotnosti sa našim nalazima. Ova leukopenija je posledica slabljenja odbrambenih sposobnosti organizma, odnosno supresije kostne srži nastale zbog duge izloženosti organizma uticaju mikotoksina ove gljivice (Muhammad i Oloyede, 2009). Takođe, pojedinačna i kombinovana primena *A. flavus* i *A. ochraceus* u hrani tokom tri nedelje

kod brojlera starosti jedan dan prouzrokuje značajnu leukopeniju, anemiju, i smanjenu vrednost hematokrita ustanovljeno na kraju eksperimenta. Mikotoksini ovih gljivica prouzrokuju neutrofiliju, bazofiliju i monocitozu (Anjorin i sar., 2014).

Deksametazon primenjivan kod ćurića pre infekcije prouzrokuje statistički značajno povećanje ($p < 0,01$) vrednosti ukupnog prosečnog broja leukocita, posle dve nedelje od inficiranja ($20,2 \pm 3,4 \times 10^9$ ćelija/l) u odnosu na vrednost broja leukocita dobijenu kod ćurića tretiranih samo deksametazonom ($9,34 \pm 1,12 \times 10^9$ ćelija/l). Prosečan broj leukocita kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića posle tri nedelje od inficiranja se značajno povećavao ($25,77 \pm 6,80 \times 10^9$ ćelija/l) ($p < 0,01$) u odnosu na vrednost prosečnog broja leukocita ustanovljenu posle dve nedelje od inficiranja i vrednost leukocita kod ćurića kontrolne grupe tretiranih samo deksametazonom ($10,38 \pm 1,17 \times 10^9$ ćelija/l) ($p < 0,01$) u starosti 35 dana (K-2).

Nasuprot našim nalazima, rezultati ispitivanja uticaja deksametazona dodavanog u hrani brojlera u dozama od 1 do 6 mg/kg tokom 21. dana eksperimenta pokazuju da ispitivane doze deksametazona ne utiču značajno na vrednost ukupnog broja leukocita. Međutim, značajno povećanje ukupnog broja leukocita zabeleženo je posle 7., 14. i 21. dana tretmana lekom u odnosu na prvi dan (Aengwanich, 2007).

U našim istraživanjima primena deksametazona pre inficiranja statistički je značajno povećala prosečnu vrednost leukocita posle dve nedelje od veštačke infekcije i još više posle tri nedelje. U dostupnoj literaturi nismo našli podatke o uticaju kombinovane parenteralne primene deksametazona i *A. fumigatus* na ukupan broj leukocita u krvi ćurića i pilića. Ustanovili smo da je šestodnevna i.m. aplikacija deksametazona značajno povećala vrednost broja leukocita posle dve nedelje od poslednje njegove aplikacije u odnosu na netretirane ćuriće kontrolne grupe 1.

Rezultati ispitivanja uticaja infekcije *A. fumigatus* na ukupan broj heterofila u krvi dobijeni posle dve nedelje od inficiranja ćurića pokazuju da infekcija, u ovom periodu posmatranja ne utiče na broj heterofila ($6,58 \pm 2,32 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila dobijenu kod ćurića kontrolne grupe ($6,49 \pm 2,25 \times 10^9$ ćelija/l) starosti 28 dana.

Posle tri nedelje od inficiranja ukupan broj heterofilnih granulocita se značajno povećavao i ustanovljena heterofilija bila je statistički značajno veća ($15,25 \pm 5,26 \times 10^9$ ćelija/l) ($p < 0,001$) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila dobijenom kod

ćurića kontrolne grupe (K-1) ($4,76 \pm 1,71 \times 10^9$ ćelija/l) 35 dana starosti. Poznato je da infekcija sa *A. fumigatus* prouzrokuje tešku do umerenu heterofiliju, limfocitozu i povećan broj bazofila kod brojlerskih pilića (Mitchell i Johns, 2008; Etim i sar., 2014), što je donekle u saglasnosti sa našim rezultatima. Povećanje broja heterofila (heterofilija) nastaje kao posledica opšte zapaljenske reakcije izazvane intoksikacijom (Anjorin i Cyriacus, 2014).

Ustanovili smo da prethodna primena deksametazona statistički značajno ($p < 0,01$) povećava vrednost prosečnog broja heterofila posle dve nedelje od inficiranja ($9,22 \pm 4,26 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa prosečnom vrednošću heterofila dobijenom kod ćurića kontrolne grupe, tretiranih samo deksametazonom ($6,68 \pm 1,81 \times 10^9$ ćelija/l) (K-2). Posle tri nedelje od infekcije i tretmana deksametazonom prosečan broj heterofila je bio statistički veoma značajno veći ($22,16 \pm 6,01 \times 10^9$ ćelija/l) ($p < 0,001$), a ovo povećanje u apsolutnim vrednostima bilo je čak sedam puta veće u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila dobijenom kod ćurića tretiranih samo deksametazonom ($3,8 \pm 0,40 \times 10^9$ ćelija/l) u starosti od 35 dana.

Ustanovili smo da infekcija ćurića sa *A. fumigatus* ne utiče na broj heterofila procenjivano posle dve nedelje od inficiranja, dok je prosečan broj heterofila značajno bio veći posle tri nedelje od inficiranja poređeno sa istim posmatranim parametrima kod ćurića kontrolne grupe. Međutim, primena deksametazona pre inficiranja značajno povećava broj heterofila u poređenju sa brojem heterofila ustanovljenim kod ćurića kontrolne grupe (K-2), tretiranih samo deksametazonom. Takođe, pokazano je da je ova heterofilija bila značajno veća kod inficiranih i deksametazonom tretiranih ćurića posle tri nedelje od inficiranja u poređenju sa vrednošću prosečnog broja heterofila dobijenom kod ćurića tretiranih samo deksametazonom, u starosti od 35 dana. Naši rezultati ispitivanja uticaja deksametazona na broj heterofila kod ćurića kontrolne grupe ukazuju da ovaj lek nije uticao na vrednost heterofila u poređenju sa fiziološkom vrednošću heterofila ustanovljenom kod ćurića kontrolne grupe 2.

Poznato je da glikokortikoidi smanjuju broj i procenat limfocita. Ovaj odnos nastaje kao odgovor organizma na prirodne stresore ili na egzogeno unošenje glikokortikoida. Ustanovljeno je da visoki odnos heterofila prema limfocitima (H : L) pouzdano ukazuje na visok nivo glikokortikoida u krvi. Ovaj odnos pruža pouzdanu procenu intenziteta stresa (Davis i sar., 2008). Deksametazon povećava broj granulocita,

a smanjuje broj limfocita i monocita (Aengwanich, 2007). Međutim, očigledno je da deksametazon može značajnije da povećava broj heterofila tek kada se primenjuje u dužem vremenskom periodu.

U našim ispitivanjima infekcija ćurića sa *A. fumigatus* prouzrokuje visok odnos heterofila i limfocita ($15,25 \pm 5,26 \times 10^9$ ćelija/l : $9,90 \pm 4,0 \times 10^9$ ćelija/l) posle tri nedelje od inficiranja u poređenju sa ovim odnosom kod intaktnih kontrolnih ćurića ($4,76 \pm 1,71 \times 10^9$ ćelija/l : $5,77 \pm 2,01 \times 10^9$ ćelija/l) starosti 35 dana, što ukazuje da i sam uzročnik izaziva intenzivan stres, koji se analizom odnosa heterofila/limfocita u krvi može dokazati posle tri nedelje od inficiranja.

Deksametazon primenjivan i.m. tokom šest dana u dozi od 4 mg/kg kod inficiranih ćurića potencira uticaj *A. fumigatus* na broj heterofila i limfocita tako što značajno ($p < 0,05$) povećava odnos heterofila i limfocita posle dve ($9,22 \pm 4,26$: $4,14 \pm 0,98 \times 10^9$ ćelija/l) i veoma statistički značajno povećava ($p < 0,001$) posle tri nedelje od inficiranja ($22,16 \pm 6,01$: $4,64 \pm 1,21 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa ovim odnosom heterofila/limfociti ustanovljenim kod ćurića tretiranih samo deksametazonom, starosti 28 dana ($6,68 \pm 1,81$: $5,54 \pm 2,36 \times 10^9$ ćelija/l) i 35 dana ($3,8 \pm 0,40$: $2,07 \pm 0,06 \times 10^9$ ćelija/l).

Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja infekcije *A. fumigatus* na prosečan ukupan broj limfocita u krvi, ustanovljen posle dve nedelje od inficiranja ćurića pokazuju da infekcija, u ovom periodu posmatranja, ne utiče na broj limfocita ($8,83 \pm 2,98 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja limfocita dobijenoj kod ćurića kontrolne grupe ($8,45 \pm 3,60 \times 10^9$ ćelija/l) u starosti od 28 dana.

Posle tri nedelje od inficiranja vrednost prosečnog broja limfocita bila je statistički značajno veća ($p < 0,01$) ($9,90 \pm 4,0 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa vrednošću prosečnog broja limfocita dobijenom kod ćurića kontrolne grupe (K-1) ($5,77 \pm 2,01 \times 10^9$ ćelija/l) 35 dana starosti. Prema oskudnim podacima iz literature prateći simptom aspergiloze kod brojlerskih pilića je limfocitoza (Mitchell i Johns, 2008; Etim i sar., 2014), što je u saglasnosti sa našim nalazom ustanovljenim posle tri nedelje od inokulacije *A. fumigatus* kod ćurića.

Ispitivanje uticaja deksametazona i infekcije na broj limfocita posle dve i tri nedelje od infekcije pokazuje da deksametazon zajedno sa *A. fumigatus* značajno ($p < 0,01$) smanjuje broj limfocita ($4,64 \pm 1,21 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa vrednošću

prosečnog broja limfocita ustanovljenog kod inficiranih ćurića ($9,90 \pm 4,0 \times 10^9$ ćelija/l) posle tri nedelje od inficiranja. Deksametazon statistički značajno ($p < 0,01$) smanjuje prosečan broj limfocita kod ćurića, naročito u 35 danu starosti ($2,07 \pm 0,06 \times 10^9$ ćelija/l) u poređenju sa brojem limfocita ustanovljenim kod kontrolnih ćurića iste starosti ($5,77 \pm 2,01 \times 10^9$ ćelija/l).

Rezultati ispitivanja uticaja infekcije *A. fumigatus* na ukupan broj bazofila u krvi pokazuju da infekcija neznatno povećava broj bazofila za sve vreme trajanja ogleda u poređenju sa vrednošću broja bazofilnih granulocita kod intaktnih, kontrolnih ćurića. Deksametazon neznatno smanjuje vrednost prosečnog broja bazofila kod inficiranih ćurića posle dve i tri nedelje u odnosu na vrednost prosečnog broja bazofila kod inficiranih ćurića.

Sumirajući rezultate ispitivanja uticaja *A. fumigatus* na hematološke parametre ćurića starosti 28 i 35 dana pokazano je da infekcija prouzrokuje anemiju i intenzivan inflamatorni odgovor. Slični hematološki nalazi dobijeni su i kod ćurića koji su prethodno višekratno tretirani deksametazonom, uz napomenu da su anemija i inflamatorni odgovor bili izraženiji.

7. ZAKLJUČCI

1. Intratrahealna aplikacija spora *A. fumigatus* u koncentraciji od $5,056 \times 10^7$ izazvala je plućnu aspergilozu kod 75% ćurića ogleadne inficirane grupe i ogleadne grupe deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića.
2. Tretman deksametazonom 6 dana pre inficiranja i infekcija sa *A. fumigatus* su statistički značajno ($P < 0,05$) smanjili prirast i prosečnu telesnu masu ćurića kako 14., tako i 21. dana od inficiranja u poređenju sa posmatranim parametrima kod ćurića inficiranih sa *A. fumigatus* i kontrolnih grupa.
3. Prethodno izazvana imunosupresija deksametazonom uticala je na intenziviranje kliničke slike i patomorfoloških promena u poređenju sa ogleadnom grupom ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*.
4. Klinički simptomi infekcije uočeni su već drugog dana od inficiranja kod dve trećine deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića i jedne trećine ćurića inficiranih sa *A. fumigatus*. U prva tri dana kod ćurića obe ogleadne grupe dominirali su opšti simptomi (somnolentnost, opuštenost krila, nakostrešenost perja, skupljanje u grupe), a od četvrtog dana kod obe ogleadne grupe ćurića nastupili su respiratorni simptomi.
5. Makroskopski, prvog dana posle infekcije u grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića ustanovljeni su hiperemija i edem pluća. Difuzna inflamacija vazdušnih kesa i granulomatozna pneumonija su najpre ustanovljeni u toj grupi trećeg dana od inficiranja, dok su iste promene ustanovljene u grupi inficiranih ćurića sa *A. fumigatus* nakon 14 dana od infekcije.
6. Histopatološki, zapažene su promene već prvog dana posle infekcije u obe ogleadne grupe u vidu hiperemije i edema pluća uz početnu fokalnu ili difuznu

ćelijsku infiltraciju. Od 3. pa do 21. dana posle infekcije dominirala je granulomatozna pneumonija različitog obima i intenziteta. Patološke promene u grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića jačeg su intenziteta i obima, a regresivne promene u patomorfološkom supstratu su takođe obimnije i ranije nastaju.

7. *Aspergillus fumigatus* je izolovan iz respiratornih organa već prvog i trećeg dana od infekcije kod 4 od 12 inficiranih jedinki (33%) u obe ogledne grupe. Sedmog i četrnaestog dana od infekcije povećava se broj respiratornih organa iz kojih je izolovan *A. fumigatus* u grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića u odnosu na oglednu grupu inficiranih ćurića.
8. Analizom rezultata dobijenih metodom nested PCR i njihovim poređenjem između oglednih grupa ustanovljen je veći broj pozitivnih uzoraka na prisustvo DNK *A. fumigatus* u oglednoj grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića.
9. Dvadesetčetiri sata od aplikacije fitohemaglutinina prosečna vrednost debljine kože kod ogledne grupe deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića bila je statistički veoma značajno manja ($p < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost debljine kože kod ogledne grupe inficiranih ćurića sa *A. fumigatus*.
10. Titar antitela 21. dana od vakcinacije protiv atipične kuge živine u oglednoj grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića bio je dvostruko niži u poređenju sa grupom inficiranih ćurića sa *A. fumigatus* i višestruko niži u poređenju sa kontrolnom grupom.
11. Rezultati hematoloških ispitivanja pokazali su da je infekcija sa *A. fumigatus* prouzrokovala slabu anemiju, leukocitozu, limfocitozu i heterofiliju, posle 14. i 21. dana od inficiranja ćurića kod oglednih grupa inficiranih i deksametazonom tretiranih i inficiranih ćurića.

8. LITERATURA

1. Abad, A., Fernandez-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J. et al. (2010): What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*, 27: 155-82.
2. Aboul-Nasr, M.B., Zohri, A.N., Amer, E.M. (2013): Enzymatic and toxigenic ability of opportunistic fungi contaminating intensive care units and operation rooms at Assiut University Hospitals, Egypt. *Springerplus*; 2: 347.
3. Aengwanich, W. (2007): Effects of dexamethasone on physiological changes and productive performance in broilers. *AJAVA*, 2 (3): 157-61.
4. Akan, M., Haziroglu, R., Ilhan, Z., Sareyyupoglu, B., Tunca, R. (2002): A case of Aspergillosis in broiler breeder flock. *Avian Diseases*, 46, 497-501.
5. Albert, B. (2005): Leukocyte functions and percentage breakdown. *Molecular Biology of the cell*, 6, 550-5.
6. Alp, S. and Arikan, S. (2008): Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. *J Basic Microbiol*, 48: 331-7.
7. Amitani, R., Taylor, G., Elezis, E.N., Llewellyn-Jones, C., Mitchell, J., Kuze, F., Cole, P.J., Wilson, R. (1995): Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun*, 63 (9): 3266-71.
8. Annaix, V., Bouchara, J.P., Larcher, G., Chabasse, D., Tronchin, G. (1992): Specific binding of human fibrinogen fragment D *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*, 60:1747-55.
9. Anjorin, S.T., Cyriacus, C.O. (2014): Haematological effect of *Aspergillus* species metabolites on broiler chicks. *Am J Res Com*, 2(1): 172-84.
10. Araujo, R., Pina-Vaz, C., Rodrigueus, G.A., Amorim, A.A., Gusmao, L. (2009): Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. *Clin Microbiol Infect*, (15), 260-66.
11. Ardia, D.R. (2005): Individual quality mediates trade-offs between reproductive effort and immune function in tree swallows. *J Animal Ecol*, 74, 517-24.
12. Arne, P., Thierry, S., Wang, D., Deville, M., Le Loch, G., Desoutter, A., Femenia, F., Nieguitsila, A., Haung, W., Chermettle, R., Guillot, J. (2011): *Aspergillus fumigatus* in Poultry. *Int J Microb*, 2011, 14 pp.
13. Aron, D.C. and Tyrrell, J.B. (1994): Glucocorticoids and adrenal androgens. In: Greenspan, F.S. and Baxter, J.D. eds. *Basic and clinical endocrinology*, 307-46. Norwalk, Appleton and Lange.
14. Balajee, S.A., Houbraken, J., Verweij, P.E., Hong, S.B., Yaghuchi, T., Varga, J. Samson, R.A. (2007): *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol*, 59: 39-46.
15. Bansod, S., Gupta, I., Rai, M. (2008): Specific detection of *Aspergillus fumigatus* in sputum sample of pulmonary tuberculosis patients by two-step PCR. *Afric J Biotech*, 7 (1): 016-21.
16. Barton, J.T., Daft, B.M., Read, D.H., Kinde, H., Bickford, A.A. (1992): Tracheal aspergillosis in 6½-week old chickens caused by *Aspergillus flavus*. *Avian Dis*, 36, 1081-5.
17. Barton, R.C. (2013): Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica*, (Cairo). 459405.

18. Beernaert, L.A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Martel, A. (2008): Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol*, 37(5): 545-9.
19. Beernaert, L.A., Pasmans, F., Van Waeyenberghe, L., Haesebrouck, F., Martel, A. (2010): *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol*, 39: 325-31.
20. Ben-Ami, R., Lewis, R.E., Leventakos, K., Latgé, J.P., and Kontoyiannis, D.P. (2010): Cutaneous model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 1848-54.
21. Bennett, J.W., Klich, M. (2003): Mycotoxins Review. *Clin Microbiol Rev*, 16(3): 497-516.
22. Bernard, M., Latgé, J.P. (2001): *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol.*; 39 Suppl 1: 9-17.
23. Beytut, E. (2007): Immunohistochemical diagnosis of aspergillosis in adult turkeys. *Turkish J Vet Animal Sci*, 31: 99-104.
24. Beytut, E., Ozcan, K., Erginsoy, S. (2004): Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. *Acta Vet Hung*, 52(1): 71-84.
25. Bhabhra, R., Miley, M. D., Mylonakis, E., Boettner, D., Fortwendel, J., Panepinto, J.C., Postow, M., Rhodes, J.C., and Askew, D.S. (2004): Disruption of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding nucleolar protein CgrA impairs thermotolerant growth and reduces virulence. *Infect Immun*, 72: 4731-40.
26. Bhatnagar, I., Kim, S.K. (2015): Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* reverses epithelial to mesenchymal transition: implications in renal fibrosis. *Int J Med Microbiol*, 305(1): 11-9.
27. Birch, M., Denning, D.W., Robson, G.D. (2004): Comparison of extracellular phospholipase activities in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol*, 42(1): 81-6.
28. Birch, M., Robson, G., Law, D., Denning, D. W. (1996): Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 64, 751-5.
29. Blanco, J.L., Hontecillas, R., Bouza, E., Blanco, I., Pelaez, T., Munoz, P. et al (2002): Correlation between the elastase activity index and invasiveness of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 40: 1811-3.
30. Bouchara, J. P., Sanchez, M. Chevailler, A., Marot-Leblond, A., Lissitzky, J.C., Tronchin, G., Chabasse, D. 1997. Sialic acid-dependent recognition of laminin and fibrinogen by *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*, 65, 2717-24.
31. Brake, N.P., Brake, J.P., Thaxton, P., Murray, D.L. (1988): Effect of cortisol on cutaneous basophil hypersensitivity to phytohemagglutinin in chickens. *Poult Sci*, 67: 669-73.
32. Brakhage, A.A and Liebmann, B. (2005): *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology*, Supplement I, 43, 575-82.
33. Bromley, I.M.J., Donaldson, K. (1996): Binding of *Aspergillus fumigatus* spores to lung epithelial cells and basement membrane proteins: relevance to the asthmatic lung. *Thorax*, 51: 1203-9.
34. Calnek, B.W.: Diseases of poultry, 10 th Ed. Iowa State University Press, Ames, 1997.
35. Carsia, R. V. (2015). Adrenals. In: Sturkie's Avian Physiology, 6th edition, C.G. Scanes, ed. Academic Press, New York, pp 577-611.
36. Cenci, E., Mencacci, A., Spreca, A., Montagnoli, C., Bacci, A., Perruccio, K., Velardi, A., Magliani, W., Conti, S., Polonelli, L., Romani, L. (2002): Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect Immun*, 70 (5): 2375-82.
37. Chamanza, R., Toussaint, M.J.M., Van Ederen, A.M., Van Veen, L., Hulskamp-Koch, C., Fabri, T.H.F. (1999): Serum amyloid a and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet Quarterly*, 21: 37-41.
38. Chamanza, R., Van Veen, L., Tivapasi, M.T. and Toussaint, M.J.M. (1999a): Acute phase proteins in the domestic fowl. *World Poult Sci J*, 55, 61-71.

39. Chaudhary, S.K., Sadana, J.R. (1988): Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Clinical signs and haemathological changes. *Mycopath*, 102 (3): 179-90.
40. Cheng, S. and Lamont, S.J. (1988): Genetic analysis of immunocompetence measures in white leghorn chicken line. *Poult Sci*, 64: 989-95.
41. Chiller, T.M., Luque, J.C., Sobel, R.A., Farrokhshad, K., Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2002): Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J Infect Dis*, 186 (4): 574-7.
42. Chilvers, E.R., Spreadbury, C.L, Cohen, J. (1989): Bronchoalveolar lavage in an immunosuppressed rabbit model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycopathologia*, 108 (3): 163-71.
43. Chute, H.L. (1975): Characteristics of immunity in fungal infections. *Am J Vet Res.*; 36 (4 Pt 2): 601 2
44. Clemons, K.V., Stevens, D.A. (2005): The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Medical Mycology Supplement*, 43, S101-S110.
45. Corkier, D.E., DeLoach, J. (1990): Interdigital skin test for evaluation of delayed hypersensitivity and cutaneu basophilhypersensitivity. *Am J Vet Res*, 51-6: 950-4.
46. Corkish, J.D.(1982): Mycotic tracheitis in chickens. *Avian Pathol*, 11, 627-9.
47. Cortes, P.L., Shivaprasad, H.L., Kiupel, M., Senties-Cue, G. (2005): Omphalitis associated with *Aspergillus fumigatus* in poults. *Avian Diseases*, 49(2), 304-8.
48. Coulot, P., Bouchara, J.P., Renier, G., Annaix, V., Planchenault, C., Tronchin, G., Chabasse, D. (1994): Specific interactions of *Aspergillus fumigatus* with fibrinogen and its role in cell adhesion. *Infect Immun*, 62: 2169-77.
49. Coutinho, A.E. and Chapman, K. E. (2011): The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glicocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*, 15; 335 (1): 2-13.
50. Cramer, R.A., Rivera, A., Hohl, T.M. (2011): Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned? *Curr Opin Infect Dis*, 24 (4): 315-22.
51. Cray, C. (2011): Acute phase proteins in animals. *Prog Mol Biol Transl Sci*; 105, 113-50.
52. Cray, C. (2015): Diagnostic testing for aspergillosis in avian species. 21st FECAVA Euro Congress, October 15-17, Barcelona, Spain.
53. Cray, C., Reavill, D., Romagnano, A., Van Sant, F., Champagne, D., Stevenson, R., Rolfe, V., Griffin, C., Clubb, S. (2009): Galactomannan assay and electrophoresis findings in psitacine birds with aspergillosis. *J Avian Med Surg*, 23 (2), 125-35.
54. Cray, C., Watsson, T., Artheart, K.L. (2009a): Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. *Avian Diseases*, 53, 491-4.
55. Cvetnić, S. (2002): Bakterijske i gljivične bolesti životinja, medicinska najklada, Zagreb.
56. Dagenais, T.R., Keller, N.P. (2009): Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 22(3): 447-65.
57. Dahlhansen, R.D. Implications of mycoses clinical disorders In: *Clinical avian medicine*, Harrison GJ and Lightfoot TL (Eds). Spix Publishing, Inc., Palm Beach, FL., pp 691-704, 2006.
58. Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. (2008). The leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Functional Ecology*, 22: 760-72.
59. De Lucca, A. J. (2007): Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Rev. Iberoam Micol*, 24, 3-13.
60. Debe, M.C., Trampel, D.W., Richard, J.L. et al. (1995): Effect of enviromental variables in turkey confinement houses on airborne *Aspergillus* and mycoflora composition. *Poultry Science*, 74(3): 463-71.

61. Del Palacio, A., Alhambram, A., Cuétara, M.S., Pontón, J. (2007): Early diagnosis of invasive fungal infections caused by *Aspergillus* and other emerging mycelial fungi. *Reviberoam Micol*; 24 (3): 187-97.
62. Denning; D.W., Riniotis, K., Dobrashian, R., Sambatakou, H. (2003): Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis, Case series, proposed nomenclature and review. *Clin Infect Dis*, 37 (Suppl 3): S265-80.
63. Dhama, K., Chakraborty, S., Verma, A.K., Tiwari, R., Barathidasan, R., Kumar, A., Singh, S.D. (2013): Fungal/Mycotic diseases of poultry-diagnosis, treatment and control: A Review *Pakistan J Biol Sci*, 16 (23): 1626-40.
64. Dixon, D.M., Polak, A., Walsh, T.J. (1989): Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, 57(5): 1452-6.
65. Dong, H., Lin, H., Jiao, H.C., Song, Z.G., Zhao, J.P., Jiang, K.J. (2007). Altered development and protein metabolism in skeletal muscles of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) by corticosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology*, 147, (1): 189-95.
66. Duffy, D.L. and Ball, G.F. (2002): Song predicts immunocompetence in male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Proceedings of the Royal Society of London B – Biol Sci*, 269, 847-52.
67. Dyar, P.M., Fletcher, O.J., Page, R.K. (1984): Aspergillosis in turkeas associated with use of contaminated litter. *Avian Diseases*, 28 (1): 250-5.
68. Ecker, E.D., Kuypers, A.H., Counotte, G.H., Tielen, M.J. (1995): The phytohemagglutinin (PHA) skin test as an indicator of stress – induced changes in immune reactivity in pigs. *Vet Quarterly*, 17: 153-6.
69. Edelman, A.S., Sanchez, P.L., Robinson, M.E., Hochwald, G.M., Thorbecke, G.J. (1986): Primary and secondary wattle swelling response to phytohemagglutinin as measure of immunocompetence in chickens. *Avian Dis*, 30: 105-11.
70. Elgert, K. *Immunology: Understanding the Immune System*. Wiley & Liss, New York, USA, 1996.
71. Etim, N.A.N, Akpabio, U., Okpongete, O., Offiong, E.A. (2014): Do diet affect haematological parameters of poultry? *Br J Appl Sci Tech*, 4(13): 1952-65.
72. Fallon, J.P., Reeves, E.P., Kavanagh, K. (2010): Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin. *J Med Microbiol*, 59 (Pt 6): 625-33.
73. Fauble, V. and Boller, M. (1975): Rôle pathogène experimental d' *Aspergillus fumigates* chez le poulet. *Recueil de médecine Veterinaire*, 151: 481-9.
74. Fedde, M.R. (1998): Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Sci*, 77(8): 1130-8.
75. Féménia, F. Huet, D., Lair-Fullerenger, S., Wagner, M. C., Sarfati, J et al. (2009): Effects of conidia of various *Aspergillus* species on apoptosis of human pneumocytes and bronchial epithelial cells. *Mycopatho*, 167(5): 249-62.
76. Femenia, F., Fontaine, J.J, Lair-Fullerenger, Berkova, N., Huet, D., Towanou, N., Rakotovao, F., Grenet, O.I., Le-Loch, G., Arne, P., Guillot, J. (2007): Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*., *Avian Patho*, 36(3): 213-9.
77. Feng, X., Krishnan, K., Daryl, L., Richie, Vishukumar Amanianda, Lukas Hartl, Grahl, N., Margaret, V., Powers-Fletcher, Zhang, M., Fuller, K., Nierman, W. C., Lu, L.J., Latgé, J.P., Woollett, L., Newman, S.L., Cramer, R.A., Rhodes, J.C. and Askew, D.S. (2011): HacA-independent functions of the ER stress sensor ireA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. *PloS. Patholog*, 7(10): 1-18.

78. Ferguson, D.C. and Hoening, M. (2001): Glicocorticoids, mineralocorticoids, and steroid synthesis inhibitors. In: Veterinary pharmacology and therapeutics, 8 th edition, Adams, R.H. Iowa State University Press/Ames, 649-65.
79. Gao, J., Lin, H., Song, Z.G., Jiao, H.C. (2008). Corticosterone alters meat quality by changing pre-and postslaughter muscle metabolism. *Poult Sci*, 87 (8): 1609-17.
80. Gardiner, D.M., Howlett, B.J. (2005): Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett*, 15; 248 (2): 241-8.
81. Gastebois, A., Clavaud C., Aïmanianda V., Latgé, J.P. (2009): *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiol*, 4 (5): 583-95.
82. Ghorri, H.M., Edgar, S.A. (1973): Comparative susceptibility of chickens, turkeys and Coturnix quail to aspergillosis. *Poult Sci*; 52: 2311-5.
83. Ghorri, H.M., Edgar, S.A. (1979): Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens. *Poult Sci*, 58 (1): 14-7.
84. Gibbons, J.G. and Rokas, A. (2013): The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends Microbiol*, 21(1): 14-22.
85. Gigli, A.C.S., Baracho, M.S. Naas, I.A., Silva, R.S., Zago, R., Anese, D. (2005): Diagnosis and evaluation of fungi presence in the air of two different ventilation systems for broiler house in France. *Poult Sci*, 7 (4): 205-8.
86. Gil, M.L., Penalver, M.C., Lopez-Ribot, J.L., O'Connor, J.E., Martinez, J.P. (1996): Binding of extracellular matrix proteins to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*; 64: 5239-47.
87. Gonzalez, G., Sorci, G., Moller, A.P., Ninni, P., Haussy, C., De Lope, F. (1999): Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *J Animal Ecology*, 68, 1225-34.
88. Goto, N., Kodama, H., Okada, K., Fujimoto, Y. (1978): Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. *Poult Sci*, 57: 246-50.
89. Gross, W.B. And Siegel, H.S. (1983): Evaluation of heterophil/lymphocyte ration as measure of stress in chickens. *Avian Dis*, 27, 972-9.
90. Grosse, C., Heinekamp, T., Kniemeyer, O., Gehrke, A., Brakhage, A.A. (2008): Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*; 74(15): 4923-33.
91. Haines, J. (1995): *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. *Biocycle*, 6: 32-5.
92. Hamet, N., Seigle-Murandi, F., Steiman, R. (1991): Contribution to the prophylaxis of chicks aspergillosis: study of the contamination of a hatchery by *Aspergillus fumigatus*. *Zentralbl Veterinarmed B*, 38 (7):529-37.
93. Hamilton, A.J., Gomez, B.L. (2002): Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol*; 51: 189-91.
94. Hardy, M.P., Gao, H.B., Dong, Q., Ge, R., Wang, Q., Chai, W.R., Feng, X., Sottas, C. (2005): Stress hormone and male reproductive function. *Cell Tissue Res*, 322: 147-53.
95. Hearn, V.M., Wilson, E.V., Mackenzie, D.W. (1992): Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity. *J Med Microbiol*, 36 (1): 61-7.
96. Hensel, M., Arst, H.N., Aufauvre-Brown, A. and Holden, D.W. (1998): The role of the *Aspergillus fumigatus* areA gene in invasive pulmonary aspergillosis. *Mol Gen Genet*, 258: 553-7.
97. Hope, W.W., Petraitis, V., Petraitiene, R., Aghamolla, T., Bacher, J., Walsh, T.J. (2009): The initial 96 hours of invasive pulmonary aspergillosis: histopathology, comparative kinetics of galactomannan and (1->3) β -d-glucan and consequences of delayed antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (11): 4879-86.

98. Horn, B.W., Moore, G.G. and Carbone, I. (2009): Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Mycologia*, 101: 423-9.
99. Hotamisligil, G.S. (2006): Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444: 860-7.
100. Hu, X.F., Guo, Y.M., Huang, B.Y., Bun, S., Zhang, L.B., Li, J.H., Liu, D., Long, F.Y., Yang, X., Jiao, P. (2010). The effect of glucagon-like peptide 2 injection on performance, small intestinal morphology, and nutrient transporter expression of stressed broiler chickens. *Poult Sci*, 89(9): 1967-74.
101. Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M., Roth, N.C. (2001): Effect of early handling of turkey poults on later responses to multiple dexamethasone - *Escherichia coli* Challenge 2. Resistance to air sacculitis and turkey osteomyelitis complex. *Poltry Sci*, 80: 1314-22.
102. Huff, G.R., Huff, W.E., Balog, J.M., Rath, N.C. (1998): The effects of dexamethasone immunosuppression on turkey osteomyelitis complex in an experimental *Escherichia coli* respiratory infection. *Poult Sci*, 77: 654-61.
103. Ishibashi, K., Miura, N.N., Adachi, Y., Tamura, H., Tanaka, S., Ohno, N. (2004): The solubilization and biological activities of *Aspergillus* beta-(1 →3)-D-glucan. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 42 (2): 155-66.
104. Islam, S., Williams, D.M., Teitelbaum, D.H. (2005): Aortobronchial fistula from invasive *Aspergillus* infection of the lung: an endovascular approach to repair. *J Pediatr Surg*;40(12):e19-22.
105. Isobe, T., Lillehoj, H.S. (1992): Affects of corticosteroids on lymphocyte subpopulations and lymphokine secretion in chickens. *Avian Dis*, 36, 590-6.
106. Janeway, C.A., Travers P., Walpot, M., Shlomchik, M.J. *Immunobiology: In: The immune system in health and disease*. 6th ed. Garland Science Publishing, New York, NY, 2005.
107. Jezdimirović, M. *Veterinarska farmakologija, 4 dopunjeno i prerađeno izdanje*, Beograd, 2010.
108. Jezdimirović, N., Kureljušić, J., Jakić-Dimić, D., Ilić, Ž., Cvetojević, Đ., Jezdimirović, M. (2013): Micromorphological changes on the embryonic membranes of turkey eggs infected with *Aspergillus fumigatus* and their importance for embryonic survival, *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 124, 263-71.
109. Jorgensen, T.R., Nielson, K.F., Arentshorst, M., Park, J., van den Hondel, C.A., Frisvad, J.C., Ram, A.F. (2011): Submerged conidiation and product formation by *Aspergillus niger* at low specific growth rates are affected in aerial developmental mutants. *Appl Environ Microbiol*, 77: 5270-7.
110. Joseph, V. (2000): Aspergillosis in raptors. *Seminars in Avian and exotic pet medicine*, 9 (2), 66-74.
111. Julian, R.J. i Goryo, M. (1990): Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat-type chickens. *Avi Pathol*, 19 (4): 643-54.
112. Kahn, C.M.: *Aspergillosis In: The Merck Veterinary Manual*, 10 th edition. Edited by Kahan, C.M., Published by Merck and CO., INC. Whitehouse station, N. J., USA, 2000.
113. Kassirskii, I.A. (2010): *Hematology: The Great Soviet Encyclopedia*. 3rd Ed. The gale Group Incorporation, 4, 329-35.
114. Kaneko, J.J: *Serum proteins and the dysproteinemias*. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, San Diego, Academic Press, 1997; 117-38.
115. Kapetanov, M., Potkonjak, D., Milanov, D., Stojanov, I., Živkov-Balaš, M., Prunić, B. (2011): Investigation of dissemination of aspergillosis in poultry and possible control measures. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 120, 267-76.
116. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. (2009): Fungi pathogenic to humans molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*; 56 (2) :211-24.

117. Kauffman, H.F., Tomee, J.F., van de Riet, M.A., Timmerman, A.J and Borger, P. (2000): Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 1185-93.
118. Kerzaon, I., Grovel, O., Robiou Du Pont, T., Le Pape, P., Pouchus, Y.F. (2008): Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine strains of *Aspergillus fumigatus* Fres *Toxicon*, 51 (3): 398-405.
119. Keymer, I.F. *Mycosis In: Diseases of cage and aviary birds*, 2 nd, Ed. Petrak ML, Published Philadelphia, Lea and Febiger, pp. 599-605, 1982.
120. Khosravi, A.R., Mahdavi Omran, S., Shokri, H., Lotfi, A., Moosavi, Z. (2012): Importance of elastase production in development of invasive aspergillosis. *J Mycol Med*; 22 (2): 167-72.
121. Kirkpatrick, W.R., McAtee, R.K., Fothergillm A.W., Rinaldi, M.G., Patterson, T.F. (2000): Efficacy of voriconazole in a guinea pig model of disseminated invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 44 (10): 2865-8.
122. Kiran, S., Surekha, M., Benarjee G., Ram Reddy, S., Reddy, S.M. (2015): Haematological and biochemical changes in chicks fed with *Aspergillus terreus* infested. *Feed As J of Poultry Sci*, 9 (3): 172-8.
123. Klimes, B.N.Z. and Severa, K. (1964): Therapy of aspergillosis of chickens with fungicidin, *Zentralblatt für Veterinärmedizin reihe B*, 11, 151-60.
124. Knežević, M., Jovanović, M.: *Opšta patologija, za studente veterinarske medicine, II izdanje*, Beograd, 2008.
125. Knežević, N., Matejić, M: *Bolesti pernate živine*, Beograd, 1996.
126. Kobayashi, M., Miyoshi, I. (1993): Immunoblot analysis of *Aspergillus fumigatus* antigen with human antibodies and lectin probes. *Intern Med*; 32 (2): 98-105.
127. Kolattukudy, P.E., Lee, J.D., Rogers, L.M., Zimmerman, P., Ceselski, S., Fox, B., Stein, .B. and Copelan, E.A. (1993): Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis. *Infect Immun*, 61:2357-68.
128. Kothary, M.H., Chase, T.J., McMillan, J.D. (1984): Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun*, 43:320-9.
129. Kunkle, R.A. *Aspergillosis. In: Diseases of poultry*, 11 th ed. Saif, Barnes AJ, Glission JR, Fadly AM McDougald LR and Swaine DE, eds. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 883-95, 2003.
130. Kunkle, R.A., Rimler, R.B. (1996): Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Diseases*, 40(4): 875-86.
131. Kureljušić, B., Radanović, O., Kureljušić, J., Jezdimirović, N., Maslić-Strižak, D., Prodanović, R., Ivetić, V. (2012): The occurrence of aspergillosis in flock of turkey poults. *Biotech Animal Husbandry*, 28(1): 129-36.
132. Kureljušić, B., Savić, B., Prodanović, R., Đekić, J., Adamov, V., Jakić-Dimić, D., Miljković, B., Radanović, O., Ivetić, V. (2011): Primena različitih histohemijskih metoda u dijagnostici aspergiloze mozga kod čurića. *Vet glasnik*, 65(1-2): 43-9.
133. Kurup, V.P., Kumar, A. (1991): Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 4 (4): 439-56.
134. Kwon-Chung, K.J., and Bennett, J.E. (1992): *Medical mycology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
135. Lamont, S.J., Smyth, J.R. (1984): Effect of selection for delayed amelanosis on immune response in chickens: 2. Cell-mediated immunity. *Poult Sci*, 563: 440-2.
136. Langfelder, K., Philippe B., Jahn, B., Latge, J.P., Brachage, A.A. (2001): Differential expression of the *Aspergillus fumigatus* pksP gene detected *in vitro* and *in vivo* with green fluorescent protein. *Infect Immun*, 69 (10): 6411-8.

137. Latgé, J.P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microb Rev, 12 (2): 310-50.
138. Latgé, J.P. (2007): The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Mol Microbiol, 66:279-90.
139. Latgé, J.P., and Calderone, R. (2005): The fungal cell wall. In The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality. Kües U., and Fischer R. (eds). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, pp. 73-104.
140. Lazarević, M., Žikić, D., Ušćebrka, G. (2000): The influence of long term sound stress on the blood leukocyte count, heterophil/lymphocyte ratio and cutaneous basophil hypersensitive reaction to phytohemagglutinin in broiler chickens. Acta Vet, 50 (2-3): 63-75.
141. Le Loch, G., Arne, P., Bougerot, C., Risi, E., Pericard, J.M., Quinton, J.F., Bretagne, S., Guillot, J. (2006): Detection of circulating serum galactomannan for the diagnosis of avian aspergillosis 16th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), June 25-29 th, Paris.
142. Leslie, C.E., Flannigan, B., Milne, L.J.R. (1988): Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Med Vet Mycol, 26 :335-41.
143. Levinson, W. and Jawetz, E. (2001): Medical microbiology and immunology. 6 th ED. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 2001. Livingstone, 2000; p. 2674-85.
144. Lewis, R.E., Wiederhold, N.P., Lionakis, M.S., Prince, R.A., Kontoyiannis, D.P. (2005): Frequency and species distribution of gliotoxin-producing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. J Clin Microbiol, 43: 6120-2.
145. Liebmann, B., T.W. Muhleisen, M., Muller, M., Hecht, G., Weidner, A., Braun, M., Brock, A. and Brakhage, A. (2004): Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive aspergillosis. Arch Microbiol, 181: 378-83.
146. Lin, D.M, Lehmann, P.F., Hamory, B.H., Padhye, A.A., Durry, E., Pinner, R.W., Lasker, B.A. (1995): Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol; 33:1596-601.
147. Lin, H., Sui, S.J., Jiao, H.C., Buyse, J. & Decuypere, E. (2006). Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology, 143(3): 400-5.
148. Lin, H., Sui, S.J., Jiao, H.C., Jiang, K.J., Zhao, J.P., Dong, H . (2007). Effects of diet and stress mimicked by corticosterone administration on early postmortem muscle metabolism of broiler chickens. Poult Sci, 86(3): 545-54.
149. Loeffler, J., Hebart, H., Brauchle, U., Schumacher, U., Einsele, H. (2000): Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* DNA by PCR. J Clin Microbiol, 38 (10): 3830-3.
150. Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J.C., Yu, J., Nierman, W.C. (2009): Effect of competition on the and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. Med Mycol, 47 Suppl 1: S88-96.
151. Lugauskas, A., Krikštonis, A., Šveistyte, L. (2004): Airborne fungi in industrial environments-potential agents of respiratory diseases. Annals of Agriculture and Environmental Medicine, 11(1), 19-25.
152. Madan, T., Arora, N., Sarma, P.U. (1997): Identification and evaluation of a major cytotoxin of *A. fumigatus*. Mol Cell Biochem, 167:89-97.
153. Madan, T., Eggleton, P., Kishore, U., Strong, P., Aggrawal, S., Sarma, P.U., Reid, K.B.M. (1997a): Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. Infect Immun, 65: 3171-9.
154. Marić, D., Simonović, I. Uopredna fiziologija životinja, skripta, Novi Sad, p 111, 2009.

155. Marr, K.A., Balajee, S.A., McLaughlin, L., Tabouret, M., Bentsen, C., Walsh, T.J. (2004): Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive aspergillosis: variables that affect performance. *J Infect Dis*, 190 (3): 641-9.
156. Marr, K.A., Patterson, T., Denning, D.W. (2002): Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am*, 16, 875-94.
157. Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, K.C., Wikelski, M. (2006): Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funcional Ecology*, 20 (2): 290-9.
158. Martin, M.P., Bouck, K.P., Helm, J., Dykstra, M.J., Wages, D.P., Barnes, H.J. (2007): Disseminated *Aspergillus flavus* Infection in Broiler Breeder Pullets. *Avian Diseases*, 51: 626-31.
159. Martin, T.E., Martin, P., Olson, C., Heidinger, B., Fontaine, J. (2000): Parental care and clutch sizes in North and South American birds. *Science*, 287, 1482-5.
160. Matsuda, H., Kohno, S., Maesaki, S., Yamada, H., Koga, H., Tamura, M., Kuraishi, H., Sugiyama, J. (1992): Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. *J Clin Microbiol*, 30: 1999-2005.
161. Matsuse, H., Fukushima, C., Fukahori, S., Tsuchida, T., Kawano, T., Nishino, T., Kohno, S. (2013): Differential effects of Dexamethasone and Itraconazole on *Aspergillus fumigatus* – exacerbated allergic airway inflammation in a murine model of mite - sensitized asthma. *Basic Sci Invest*, 85:429-35.
162. McCorkle, F., Olah, I., Glick, B. (1980): The morphology of the phytohemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. *Poult Sci*, 59, 616-23.
163. McMilan, M.C. and Petrak, M.L. (1989): Retrospective study of aspergillosis in pet birds. *J Assoc of Avian Vet*, 3, 211-5.
164. Miljković, R., Perić, L., Velhner, M. (2007): Interdigital skin test for evaluation of delayed hypersensitivity and monitoring cell-mediated immune responses in chickens. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23(5-6): 22-8.
165. Mitchell, E.B., Johns, J. (2008): Avian haematology and related disorder. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, 11(3): 501-22.
166. Monod, M., Paris, S., Sanglard, D., Jaton-Ogay, K., Bille, J., Iatge, J.P. (1993): Isolation and characterisation of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 61, 4099-104.
167. Monod, M., Togni, G., Rahalison, L., Frenk, E. (1991): Isolation and characterisation of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol*, 35, 23-8.
168. Morgavi, D.P., Boudra, H., Jouany, J.P., Michalet-Doreau, B. (2004): Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on *in vitro* rumen fermentation. *Food Addit Contam*, 21(9):871-8.
169. Morris, M.P., Flecher, O.J. (1988): Disease prevalence in Georgia turkey flocks in 1986. *Avian Dis*, 32 (3), 404-6.
170. Moser, M., Cramer, R., Brust, E., Suter, M., Menz, G. (1994): Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology. *J Allergy Clin Immunol*, 93 (1 Pt 1):1-11.
171. Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmachl, M., Blaser, K., Suter, M. (1992): Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. *J Immunol*, 149(2): 454-60.
172. Mullbacher, A., Waring, P.; Eichner, R.D. (1985): Identification of agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *J. Gen Microbiol*, 131: 1251-8.

173. Muhammad, N.O. and Oloyede, O.B. (2009): Haematological Parameters of Broiler Chicks Fed *Aspergillus niger* - Fermented Terminalia catappa Seed Meal-Based Diet. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 4 (2): 179-183, 2009
174. Murray, D.L., Brake, J., Thaxton, J.P. (1987): Effect of adrenocorticotropin and dietary ascorbic acid on cutaneous basophil hypersensitivity to phytohemagglutinin in chickens. Poult Sci, 66: 1846 -52.
175. Naspitz, C.K., Richter, M. (1968): The action of phytohemagglutinin *in vivo* and *in vitro*: a review. Progress in Allergy, 12, 1-85.
176. Neiguitsila, A., Arne, P., Durand, Deville, M., Benoit, H., Rene Chermette, V., Latouch, S.c., Guillot, J. B. e (2011): Relative efficiencies of two air sampling methods and three culture conditions for the assessment of airborne culturable fungi in poultry farmhouse in France. Enviro Res, 111 (2): 248-53.
177. Nganpiep, L.N. and Maina, J.N. (2002): Composite cellular defence stratagem in the avian respiratory system: functional morphology of the free (surface) macrophages and specialized pulmonary epithelia, J Anatomy, 200(5), 499-516.
178. Nichita, I., Marcu, A., Seres, M., Tirziu, E., Mot, D., Gros, R.V. (2010): Evaluation of fungi presence in the air of two broiler houses with different ventilation systems. Animal Sci Biotech, 43(1), 415-8.
179. Nieminen, S.M., Kärki, R., Auriola, S., Toivola, M., Laatsch, H., Laatikainen, R., Hyvärinen, A., VonWright, A. (2002): Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials. Appl Environ Microbiol, 68 (10): 4871-5.
180. Oglesbee, B. L. (1997): Mycotic diseases. In: Altman, R., B. (Ed). Avian Medicine and Surgery 1 st edn., Philadelphia, P.A: W.B. Saunders Company, pp, 323-61.
181. O'Gorman CM; Fuller, H., Dyer, P. (2008): Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* . Nature, 457: 471-4.
182. Oguz, H., Kececi, T., Birdane, Y.O., Onder, F., Kurtoglu, V. (2000); Effect of clinoptilolite on serum haematological character of broiler chickens during aflatoxicosis. Res Vet Sci, 67: 89-93.
183. Olias, P., Gruber, A.D., Bohmer, W., Hafez, H.M., Lierz, M. (2010a): Fungal pneumonia as major cause of mortality in white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. Avian Disease, 54, 94-8.
184. Olias, P., Gruber, A.D., Hafez, G., Lierz, M., Slesiona, S., Brock, M., Jacobsen, I.D. (2011): Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolated from white stork chicks and their environment. Vet Microb, 148, 348-55.
185. Orciuolo, E., Stanzani, M., Canestraro, M., Galimberti, S., Carulli, G., Lewis, R., Petrini, M., Komanduri, K.V. (2007): Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. J Leukoc Biol; 82 (4): 839-48.
186. O'Reilly, E.L., Eckersall, P.D. (2014): Acute phase proteins: a review of their function, behavior and measurement in chickens. Worlds Poul Sci J, 70 (1): 27-44.
187. Ozmen, O., Dorrestein, M.G. (2004): Observations of aspergillosis in the brains of turkey poults using different histopathological staining techniques, Biotech and Histochem 79(2): 95-9
188. Pal, M, Prajapati, S., Gangopadhyay R.M. (1988): *Aspergillus fumigatus* as cause of mycotic tracheitis in a chicken. Mycoses, 33, 70-2.
189. Parmentier, H., Scharma, J.W. (1993): Cutaneous hypersensitivity responses in chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. Poult Sci, 72: 167-92.
190. Parta, M., Chang, Y., Rulong. S., Pinto-Da Silva, P., Kwon-Chung, K.J. (1994): *HYPI*, a hydrophobin gene from *Aspergillus fumigatus*, complements the *rodletless* in *Aspergillus nidulans*. Infect Immun, 62: 4389-95.
191. Pazos, C., Pontón, J., Palacio, A.D. (2005): Contribution of (1→3)-β-d-Glucan Chromogenic Assay to Diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult

- patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*, 43 (1): 299-305.
192. Peden, W.M., Rhoades, K.R. (1992): Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Diseases*; 36: 537-42.
 193. Penalver, M.C., Casanova, M., Martinez, J.P., Gil, M.L. (1996): Cell wall protein and glycoprotein constituents of *Aspergillus fumigatus* that bind to polystyrene may be responsible for the cell surface hydrophobicity of the mycelium. *Mycobiol*, 142, 1597-604.
 194. Pihet, M., Vandeputte, P., Tronchin, G., Renier, G., Saulnier, P., Georgeault, S., Mallet, R., Chabasse, D., Symoens, F., Bouchara, J.P. (2009): Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol*, 9: 177.
 195. Pinello, C.B., Richard, J.B., Tiffany, L.H. (1977): Mycoflora of a turkey confinement brooder house. *Poult Sci*, 56, 1920-6.
 196. Polak, A. (1998): Experimental models in antifungal chemotherapy. *Mycoses*, 41(1-2): 1-30.
 197. Prukner-Radovičić, E., Mazija, H. Odabrana poglavlja iz bolesti ptica kućnih ljubimaca. Veterinarski fakultet, Zagreb, 2006.
 198. Ptak, W., Geba, G.P., Askenase, P.W. (1991): Initiation of delayed type hypersensitivity by low doses of monoclonal IgE antibody. *J Immunol*, 146, 3929-36.
 199. Puvadolpirod, S. and Thaxton, J.P. (2000): Physiology stress in chickens. Response parameters. *Poult Sci*, 76, 363-9.
 200. Pyrrho, A.S., Lenzi, H.L., Ramos, J.A Moura-Neto R., Cachem, F.C. et al. (2004): Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. *Parasitol. Res.*, 92: 478-483.
 201. Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965): *Aspergillus fumigatus* group. In: K. B. Fennell, D. I. (ed). The genus *Aspergillus*. The William and Wilkins Co, Baltimore, Md. pp, 238-68.
 202. Reece, R.L., Taylor, T.K., Dickson, D.B. (1986): Mycosis of commercial Japanese quail, ducks and turkeys. *Aus Vet J*, 63, 196-7.
 203. Reese, S., Dalamani, G., Kaspers, B. (2006): The avian lung associated immune system: a review. *Vet Res*, 37(3): 311-24.
 204. Regnier, J.A., Kelly, J.W. (1981): Heat and cold stress suppresses in vivo and in vitro cellular immune responses in chickens. *Am J Vet Res*, 42: 294-9.
 205. Reddy, S.M., Kumari, D.R. and Reddy, V.K. (1997): Toxicological studies on gliotoxin produced by *Trichoderma viride*. *Indian J Poult Sci*, 32: 169-72.
 206. Reichard, U., Monod, M., Odds, F., Ruchel, R. (1997): Virulence of aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol*, 35, 189-96.
 207. Rementeria, A., López-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A.B., Bikandi, J., Pontón, J., Garaizar, J. (2005): Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*, 22 (1): 1-23.
 208. Resanović, R., Palić, T. (2009): Stres u savremenom industrijskom živinarstvu. Zbornik radova 18. Savetovanja živinara. Kopaonik, 13-17. X, 31-38.
 209. Resanović, R. (2015): Klinički aspekti imunosupresije živine. *Vet glasnik*, 69(1-2): 91-9.
 210. Rhodes, J.C. (2006): *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med Mycol*, 44 Suppl 1: S77-81.
 211. Richard J.L., Thurston JR. (1983): Rapid haematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure, *Avian Diseases*, 27, 1025-33.
 212. Richard, J.L. Aspergillosis, In: Diseases of poultry, 10th ed. Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. and Joder, H.W. Iowa State University Press, Ames, 351-60, 1997.

213. Richard, J.L. i Sacco, R. E. (1998): Susceptibility of convalescent turkeys to pulmonary aspergillosis. *Avian Diseases*, 42 (4): 787-90.
214. Richard, J.L., Cutlip, R.C., Thurston, J.R., Songer, J. (1981): Response of turkey poult to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian Diseases*, 25(1): 53-67.
215. Richard, J.L., Thurston, J.R., Peden, W.M., Pinello, C. (1984): Recent studies on aspergillosis in turkey poults. *Mycopathol*, 87, 3-11.
216. Richardson, M.D., Warnock, D.W. (2003): Fungal Infection. Diagnosis and management (3rd ed.) Blackwell Science, pp. 156-84.
217. Rodriguez, E., De Meeus, T., Mallié, M., Renaud, F., Symoens, F., Mondon, P., Piens, M.A., Lebeau, B., Viviani, M.A., Grillot, R., Nolard, N., Chapuis, F., Tortorano, A.M., Bastide, J.M. (1996): Multicentric epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 34: 2559-68.
218. Roilides, E., Uhlig, K., Venzon, D., Pizzo, P.A., Wolsh, T.J. (1993): Prevention of corticosteroid-induced suppression of human polymorphnuclear leukocytes-induced damage of *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and γ interferon. *Infect. Immunology*, 61:4870-7.
219. Rose, M.E. (1977): *Eimeria tenella*. Skin hypersensitivity to injected antigen in the fowl. *Exp Parasitol*, 42(1): 129-41.
220. Rusov, Č., Kovačević, S., Jojić-Malićević, L.J., Miljković, B. (1994): Analize ćelijskog infiltrata interdigitalne kože i leukograma pilića lakše i teške provenijence tretiranih PHA *Vet glas*, 1 (48): 739-44.
221. Sabino, M., Faisca, M., Caralino, E., Verissimo, C., Viegas, C., (2012): Occupational exposure to *Aspergillus* ba swine and poultry farm workers in Portugal. *J Toxicol Environ Health Part A*, 75 (22-23), 1381-91
222. Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R. Diseases of poultry. Twelfth ed, Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 2008.
223. Sarfati, J., Diaquin, M., Debeaupuis, J.P., Schmidt, A., Lecaque, D., Beauvais, A., Latge, J.P. (2002): A new experimental murine aspergillosis model to identify strains of *Aspergillus fumigatus* with reduced virulence. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 43(4): 203-13.
224. Schiefer, B. (1967): Pathomorphologie der Systemmycosen des Tieres. Veb ,Gustav Fischer Verlag, Jena.
225. Schmidt, A. (2002): Animal models of aspergillosis-also useful for vaccination strategies? *Mycoses*, 45(1-2): 38-40.
226. Schmidt, A., Wolff, M.H. (1997): Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patients samples. *Mycoses*, 40: 347-51.
227. Sheppard, D.C., Marr, K.A., Fredricks, D.N., Chiang, L.Y., Doedt, T., Filler, S.G. (2006): Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*, 12 (4): 376-80.
228. Shibuya, K., Paris, S., Ando, T., Nakayama, H., Hatori, T., Latgé, J.P. (2006): Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*;47 (4):249-55.
229. Shini, S., Kaiser, P., Shini, A., Bryden, W.L. (2008). Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2): 324-33.
230. Shini, S., Shini, A., Huff, G.R. (2009). Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. *Physiology & Behavior*, 98(1-2):73-7.

231. Shini, S., Shini, A., Kaiser, P. (2010). Cytokine and chemokine gene expression profiles in heterophils from chickens treated with corticosterone. *Stress*, 13 (3): 185-94.
232. Singh, S., Borahm M.K., Sharma, O.K., Joshi, G.D., Gogoi, R. (2009): Aspergillosis in turkey poults. *Indian J Vet Path*, 33(2), 220-1.
233. Singh, S.D., Tiwari, R., Dhama, K. (2012): Mycotoxins and mycotoxicosis impact on poultry health and production. An overview. *Poult Punch*, 28, 35-52.
234. Sinha, B. K., Vegad, J.L., Awadhya, R.P. (1988): Pathology of phytohemagglutinin-induced cutaneous reaction in the chicken. *Indian J Anim Sci*, 58: 28-35.
235. Smith, J.M., Tang, C.M., Van Noorden, S., Holden, D.W. (1994): Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restrictocin and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun*; 62:5247-54.
236. Soler, M., Martin-Vivaldi M., Marin J., Moller, A.P. (1999): Weight lifting and health status in the black wheatear. *Behavioral Ecology*, 10, 281-6.
237. Song, Z.G., Zhang X.H., Zhu, L.X., Jiao, H.C., Lin, H. (2011). Dexamethasone alters the expression of genes related to the growth of skeletal muscle in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J Mol Endocrinol*, 46, 217-25.
238. Staderker, M.J., Leskowitz, S. (1974): The cutaneous basophil response to mitogens. *J Immunol*, 113: 496-500.
239. Staderker, M.J., Lukic, M., Dvorak, A., Leskowitz, S. (1977): The cutaneous basophil response to phytohemagglutinin in chickens. *J Immunol*, 118: 1564-8.
240. Steinbach, W.J., Benjamin, D.K., Trasi, S.A., Miller, J.L., Schell, W.A., Zaas, A.K., Foster, W.M., Perfect, J.R. (2004): Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med Mycol*; 42 (5): 417-25.
241. Steinlage, S.J.T., Sander, J.E., Brown, T.P., Lobsinger, C.M., Thayer, S.G., Martinez, A. (2003): Disseminated mycosis in layer cockerels and pullets. *Avian Diseases*, 47 (1), 229-33.
242. Stephens-Romero, S.D., Mednick, A.J., Feldmesser, M. (2005): The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. *Infect Immun*; 73 (1) :114-25.
243. Stoute, S.T., Bickford, A.A., Walker, R.L., Charlton, B.R. (2009): Mycotic pododermatitis and mycotic pneumonia in commercial turkey poults in northern California. *J Vet Diagn Invest*; 21 (4):554-7.
244. Suleiman, M.M., Duncan, N., Eloff, J.N., Naidoo, V., (2012): A controlled study to determine the efficacy of *Loxostylisa alata* (Anacardiaceae) in the treatment of aspergillus in chicken (*Gallus domesticus*) model in comparison to ketoconazole. *Vet Res*, 8, 210.
245. Sutton, P., Newcombe, N.R., Waring, P., Mullbacher, A. (1994): In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect Immun*, 62: 1192-8.
246. Sutton, P., Waring P., Mullbacher, A. (1996): Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite. *Immunol Cell Biol*, 74: 318-22.
247. Swatek, F., Halde, C., Rinaldi, M.G., Shadomy, H.J. (1985): *Aspergillus* species and other opportunistic saprophytic hyaline hyphomycetes. In: Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, W.J.Jr, Shadomy, H.J., editors. *Manual of clinical microbiology*. 4th ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; pp. 584-94.
248. Taylor, J.J., Burroughs, E.J. (1973): Experimental avian aspergillosis. *Mycopath Mycol Appl*, 51 (2-3): 131-41.
249. Tekaia, F., and Latgé, J.P. (2005): *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol*, 8: 385-92.

250. Tell, L.A. (2005): Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycolo Supp*, 1:S7-S73.
251. Thau, N., Monod, M., Crestani, B., Rolland, C., Tronchin, G., Latgé, J.P., Paris S. *rodletless* mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 1994;62: 4380-8.
252. Tronchin, G., Esnault, K., Renier, G., Filmon, R., Chabasse, D., Bouchara, J.P. (1997): Expression and identification of laminin-binding protein in *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*; 65, 9-15.
253. Tsai, S.S., Park, J.H., Hirai, K. and Itakura, C. (1992): Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathol*, 21:699-709.
254. Tsui, C.K., Woodhall, J., Chen, W., Lévesque, C.A., Lau, A., Schoen, C.D., Baschien, C., Najafzadeh, M.J., de Hoog, G.S. (2011): Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*, 2(2): 177-89.
255. Tsunawaki, S., Yoshida, L.S., Nishida, S., Kobayashi, T., Shimoyama, T. (2004): Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun*, 72 (6): 3373-82.
256. Turk, J.L. (1967): *Delayed Hypersensitivity*. John Wiley and Sons, New York, USA.
257. Tuzcu, M., Sur, E., Celik, I., Oznurlu, Y., Ciftci, M.K. (2010): Effects of aflatoxin on the proportions of peripheral blood leukocyte and alpha naphthyl acetate esterase positive lymphocyte in the mouse. *Kafkas University Veterinary Fak Derg*, 16: 337-41.
258. Van Cutsem, J. (1983): Antifungal activity of enilconazole on experimental aspergillosis in chickens, *Avian Diseases*, 27(1): 36-42.
259. Vicuna, E.A., Kuttappan, V.A., Galarza-Seeber, R., Latorre, J.D., Faulkner, O.B., Hargis, B.M., Tellez, G., Bielke, L.R. (2015): Effect of dexamethasone in feed on intestinal permeability, differential white blood cell counts, and immune organs in broiler chicks. *Poult Sci*, 94: 2075-80.
260. Verstappen, F.A.L. and Dorrestein, G.M. (2005): Aspergillosis in Amazon parrots after corticosteroid therapy for smoke-inhalation injury. *J Avian Med Surg*, 19, 138-41.
261. Wagener, J., Echtenacher, B., Rohde, M., Kotz, A., Krappmann, S., Heesemann, J. and Ebel, F. (2008): The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryot Cell* 7: 1661-73.
262. Watteyn, A., Wyns, H., Plessers, E., Russo, E., DeBaere, S., DeBacker, P., Croubels, S. (2013): Pharmacokinetics of dexamethasone after intravenous and intramuscular administration in broiler chickens. *Vet J*, 195(2): 216-20.
263. Watteyn, A., Wyns, H., Plessers, E., Russo, E., DeBaere, S., DeBacker, P., Croubels, S. (2013). Pharmacokinetics of dexamethasone after intravenous and intramuscular administration in broiler chickens. *Vet J*, 195(2): 216-20.
264. Wicher, K.B. and Fries, E. (2010): Evolutionary aspects of hemoglobin scavengers. *Antioxidants and Redox signaling*, 12, 249-59.
265. Zafra, R., Perez, J., Perez-Ecija, R.A., Borge, C., Bustamante, R., Carbonero, A., Tarradas, C. (2008): Concurrent aspergillosis and ascites with high mortality in farm of growing broiler chickens. *Avian Diseases*, 52(4), 711-3.

Biografija autora

Nemanja V. Jezdimirović, po zanimanju diplomirani veterinar, rođen je 01.01.1981. godine u Beogradu. Osnovnu školu, a potom i gimnaziju završio je u Beogradu. Školske 2000/2001 upisao je prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Tokom 2007. godine, proveo je jedan semestar na Veterinarskom fakultetu u Solunu na internoj klinici za male životinje. Diplomirao je 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,27. Školske 2010/2011 upisao je doktorske akademske studije na istom fakultetu. Od 01. septembra 2010. godine počeo je da obavlja pripravnički staž u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije. Januara 2012. godine položio je stručni ispit za diplomirane veterinare. Od marta meseca 2012. godine raspoređen je na Odeljenje za patološku morfologiju u Zavodu za zdravstvenu zaštitu Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije. Od 2011. godine prijavljen je na projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“. Učestvovao je na više nacionalnih i međunarodnih naučnih skupova i ima objavljene radove u međunarodnim i nacionalnim časopisima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Немања Јездимировић

број уписа 2010/5013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Патоморфолошка, миколошка и молекуларна испитивања органа ћурића
различитог имунолошког статуса након вештачке инфекције спорама *Aspergillus*
fumigatus

- 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, 08.05.2019.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Немања Јездимировић

Број уписа 2010/5013 _____

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Патоморфолошка, миколошка и молекуларна испитивања органа
Ћурића различитог имунолошког статуса након вештачке инфекције спорама
Aspergillus fumigatus

Ментор: проф. Др Милијан Јовановић

Потписани ____Немања Јездимировић

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, 08.05.2019

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Патоморфолошка, миколошка и молекуларна испитивања органа ћурића различитог имунолошког статуса након вештачке инфекције спорама *Aspergillus fumigatus*

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, 08.05.2019.

1. **Ауторство** - Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.** Дозвољава 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.