

Infekcija bakterijom *Gallibacterium anatis* u kokoši nesilica



Gallibacterium anatis infection in laying hens

Lozica*, L., M. A. Liyemo., D. Horvatek Tomić, Ž. Gottstein

Sažetak

G*allibacterium anatis* jedan je od najčešćih uzročnika infekcije gornjih dišnih puteva i donjega reproduktivnog sustava kokoši. Premda je dio fiziološke mikroflore, u nepovoljnim uvjetima može uzrokovati infekciju te posljedično smanjenje proizvodnje i porast mortaliteta. Klinička slika i patomorfološke promjene vrlo su nespecifične, što otežava postavljanje etiološke dijagnoze. Najčešće uzrokuje probleme na farmama kokoši nesilica, iako je dokazan i na roditeljskim farmama te farmama tovnih pilića. Infekcija bakterijom *G. anatis* potencijalna je opasnost za peradarsku industriju zbog velikih ekonomskih gubitaka koje može uzrokovati u kratkom razdoblju. S obzirom na to da se radi o oportunističkom patogenu, za kontrolu bolesti najvažnija je primjena biosigurnosnih mjera te načela *svi unutra – svi van*. Zbog vrlo brzog razvoja rezistencije na antimikrobne pripravke, u slučaju infekcije preporučuje se primjena cjepiva te prilagodba programa imunoprofilakse svakoj pojedinoj farmi.

Ključne riječi: *Gallibacterium anatis*, perad, kokoši nesilice

Abstract

Gallibacterium anatis is one of the most common causative agents of upper respiratory and lower reproductive tract infections. Although it is a part of the physiological microflora, it can cause an infection in unfavorable conditions that leads to a decrease in production and an increase in mortality rates. The clinical symptoms and pathomorphological changes are not specific, which complicates diagnosis. It is most often found on layer farms, although it has been detected on breeder and broiler farms as well. Infection with *G. anatis* represents a potential threat for production because of its economic impact on the poultry industry. It can cause major losses in a short period of time. Since it is an opportunistic pathogen, the most useful methods for controlling the disease are implementation of biosafety measures and "all in-all out" principle. Due to the very rapid development of multidrug resistance, vaccine application and individual adjustment of the immunoprophylaxis program to the farm is essential in order to prevent disease outbreaks.

Key words: *Gallibacterium anatis*, poultry, layers

Liča LOZICA, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Danijela HORVATEK TOMIĆ, dr. med. vet., docentica, dr. sc. Željko GOTTSTEIN, dr. med. vet., docent, Zavod za bolesti peradi s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Mahoto Alphius LIYEMO, dr. med. vet., Windhoek Animal Hospital, Windhoek, Namibia. *Dopisni autor: llozica@vef.hr

Uvod

Gallibacterium anatis jest kokobacilarna, gram-negativna bakterija iz porodice *Pasteurellaceae* (Christensen i sur., 2003). Dio je fiziološke mikroflore reproduktivnog sustava i gornjih dišnih puteva kokoši (Bisgaard, 1977., Bojesen i sur., 2003.a), iako može uzrokovati infekcije koje uzrokuju pad proizvodnje jaja i porast mortaliteta. Posljednjih je nekoliko desetljeća prepoznata pod različitim imenima - *Pasteurella anatis*, avian *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis*, da bi na kraju dobila ime *Gallibacterium anatis*. Godine 1982. Bisgaard je predložio naziv *Gallibacterium* kao samostalan rod. Poslije je taj rod uključen u porodicu *Pasteurellaceae* na temelju sekvenca 16s rRNA gena (Christensen i sur., 2003.). Rod trenutačno ima sedam skupina s različitim vrstama povezanih sličnostima sekvenca 16S rRNA gena te fenotipskim karakteristikama. Vrste koje danas ubrajamo u ovaj rod jesu *G. anatis*, *G. melopsittaci*, *G. salpingitidis*, *Gallibacterium genospecies* III, *Gallibacterium* group V i *G. trehalosifermentans* (Christensen i sur., 2003.; Bisgaard i sur., 2009.). *G. anatis* može se podijeliti na dva makroskopski različita biovara: nehemolitički biovar *anatis* i biovar *haemolytica* koji stvara zonu beta-hemolize na krvnom agaru i smatra se učestalijim uzročnikom infekcija (Kristensen i sur., 2011.; Persson i Bojesen, 2015.; Ataei i sur., 2017.; Chavez i sur., 2017.). *Gallibacterium* je izoliran iz svinja, goveda, različitih vrsta ptica i peradi kao što su purani, golubovi, prepelice i fazani, pa i čovjeka (Bisgaard, 1977.; Mushin i sur., 1980.; Bisgaard, 1993.; Bojesen i sur., 2003. b; Neubauer i sur., 2009.; Aubin i sur., 2013.), no smatra se da najštetnije utječe na nesivost kokoši nesilica i stopu mortaliteta tovnih pilića (Neubauer i sur., 2009.; Singh i sur., 2016.; Persson i Bojesen, 2015.). *G. anatis* jedan je od najčešćih uzročnika poremećaja reproduktivnog i dišnog sustava u kokoši nesilica uz kolibacilozu (Proctor i sur., 2006.; Bojesen i sur., 2007.; Kristensen i sur., 2011.; Singh i sur., 2016.). Najčešće patomorfološke promjene koje uzrokuje jesu peritonitis, hepatitis i salpingitis (Bojesen i sur., 2004.; Proctor i sur., 2006.; Kristensen i sur., 2011.; Persson i Bojesen, 2015.). S obzirom na nespecifičnost kliničke slike i patomorfoloških promjena, teško je postaviti dijagnozu bez dodatnih dijagnostičkih pretraga.

Patogeneza, klinička slika

Premda se *G. anatis* smatra komenzalnim mikroorganizmom koji je sastavni dio mikroflore gornjega dišnog i donjega reproduktivnog sustava zdrave peradi, u nepovoljnim uvjetima može uzrokovati bo-

lest. Predisponirajući čimbenici za nastanak infekcije jesu neprikladni zoohigijenski uvjeti, stres, narušen imunostatus i hormonski status, genetska predispozicija te infekcije drugim mikroorganizmima (Bojesen i sur., 2003.; Bojesen i sur., 2004.; Rzewuska i sur., 2007.; Neubauer i sur., 2009.; Abd El-Hamid i sur., 2016., Persson i Bojesen, 2015.). Razvoj infekcije, supkliničke ili kliničke, uzrokuje postupan ili nagao pad proizvodnje jaja, ovisno o općem zdravstvenom stanju jata, te povećan mortalitet. Često se radi o koinfekciji s avijarnim patogenim sojevima *E. coli* (APEC) koji uzrokuju vrlo sličnu kliničku sliku i patomorfološke promjene. Kao u slučaju kolibaciloze, zaražavanju dišnog sustava često prethodi infekcija virusom, čime dišni sustav postaje osjetljiviji (Cordoni i sur., 2016.). Smanjena je brojnost makrofaga te sposobnost fagocitoze makrofaga i neutrofila koji imaju obrambenu ulogu (Matthijs i sur., 2009.; Antão, 2010.; Mellata, 2013.). Oštećenje tkiva dišnog sustava virusima dovodi do gubitka cilija i trepetljivih stanica, što uzrokuje smanjenu cilijarnu aktivnost i čišćenje mukocilijarnog sekreta te lakšeg prijanjanje i prodiranje bakterija (Matthijs i sur., 2009.). Oštećenje tkiva dišnog sustava može biti uzrokovano neprikladnim zoohigijenskim uvjetima kao što su loša ventilacija i prevelik broj životinja u objektu (Abd El-Hamid i sur., 2016.), što također može dovesti do proboja bolesti u jatu.

Klinička i patomorfološka slika vrlo su nespecifične. Depresija, proljev i pad proizvodnje jaja uočavaju se na vrhuncu proizvodnje, no slični se simptomi mogu uočiti i kod kokcidioze, zaraznog bronhitisa, zarazne korice, newcastleske bolesti, influence ili kolere. Infekcija donjega reproduktivnog sustava uzrokuje atrofiju folikula, deformacije ljuski jaja, kao i razlike u njihovoj veličini, pad proizvodnje jaja te povećan mortalitet zbog pojave peritonitisa. Bolest se može pojaviti u obliku akutne septikemije s naglim mortalitetom u zdravih nesilica, a može biti prisutna i u supkliničkom obliku u jatu (Paudel i sur., 2013.). Često uočene patološke promjene jesu gnojni salpingitis, folikulitis, peritonitis, perikarditis, upala zračnih vrećica, hepatitis i septikemija (slike 1.A, B, C). Kronična infekcija očituje se lokaliziranim ili generaliziranim gnojnim peritonitisom (Hattem i sur., 2016.; Singh i sur., 2016.). S obzirom na to da su simptomi jednaki kao u slučaju kolibaciloze, postavljanje etiološke dijagnoze otežano je (Neubauer i sur., 2009.). Utvrđeno je da *G. anatis* može uzrokovati pad proizvodnje jaja bez pojave kliničke infekcije, za razliku od srodne joj bakterije *Pasteurella multocida*. U pojedinim je slučajevima *G. anatis* bila izolirana iz organa koji nisu bili makroskopski patološki promi-

jenjeni, iako je uzrokovala uginuće životinja. Zepeda i suradnici (2010.) 48 sati nakon intranazalne inokulacije bakterija uočili su histopatološke promjene u dušniku, plućima, zračnim vrećicama i jetri, iako ni klinički znakovi ni makroskopske promjene prilikom patomorfološke pretrage nisu bili vidljivi. Kod kokoši nesilica samo je nesenje izrazit stres, a hormonski status (visoke razine estrogena) dodatno pridonosi prijemljivosti na infekciju s *E. coli*, pa tako i *G. anatis*, do kojih nerijetko dolazi ascendentnim putem (Anon., 2014.). Smatra se da je ascendentna infekcija glavni način širenja bolesti na reproduktivni sustav, jetru i slezenu, što je i dokazano intraperitonealnom inokulacijom *Gallibacterium* u pilića (Bojesen i sur., 2004.). Nespecifični klinički znakovi i nedostatak patognomoničnih simptoma otežavaju postavljanje *ante mortem* dijagnoze, dok se postmortalni nalaz često može usporediti s onim prisutnim kod kolibaciloze, kolere, zarazne korice peradi, newcastleske bolesti ili influence (Christensen i sur., 2003.). Težina kliničkih simptoma, trajanje bolesti i stopa mortaliteta ovise i o čimbenicima okoliša kao što su loša higijena, neprikladna ventilacija, visoka razina amonijaka u zraku te prisutnost drugih bolesti u jatru (Paudel i sur., 2015.; Abd El-Hamid i sur., 2016.). Infekcija može nastati horizontalnim i vertikalnim putem, no smatra se da je horizontalni češći (Bojesen i sur., 2003.). Paudel i suradnici (2013.) dokazali su da je primarno mjesto infekcije dišni sustav te da hoane imaju ulogu rezervoara iz kojega se u drugoj fazi infekcije uzročnik sistemski širi, i to najčešće u organe reproduktivnog sustava. Istu je tvrdnju dokazao i Neubauer sa suradnicima (2009.) izdvajanjem istog izolata iz dišnog i reproduktivnog sustava. Epizootičkim praćenjem u Hrvatskoj također je utvrđena upravo dominantna učestalost izolata *G. anatis* u obriscima gornjih dišnih puteva i ždrijela (Lozica i sur., 2018.b). Smatra se da se vertikalni prijenos zbiva putem zaražene sperme pijetlova. Paudel i suradnici (2015.) dokazali su prisutnost *G. anatis* u testisima i epididimisu pijetlova dobi 35 tjedana nakon intranazalne inokulacije, što dokazuje mogućnost vertikalnog prijenosa. Tada su uočeni morfološki deformirani spermiji te lošija kvaliteta sperme. Dokazan je i transovarijalni prijenos, što je potvrdilo izdvajanje bakterije iz žumanjka (Bojesen i sur., 2004.; Paudel i sur., 2014.; Persson i Bojesen, 2015.). Na širenje *G. anatis* od mjesta ulaska po cijelom organizmu, uz druge prisutne lezije, utječu i čimbenici okoliša, imunosupresija i kanibalizam (Neubauer i sur., 2009.; Paudel i sur., 2014.; Abd El-Hamid i sur., 2016.). Isto tako i mikroklimatski uvjeti u objektu mogu utjecati na povećanu pojavnost infekcija, a time i brže širenje jatam. Lawal i suradnici (2017.) dokazali su statistički značajnu razliku u po-

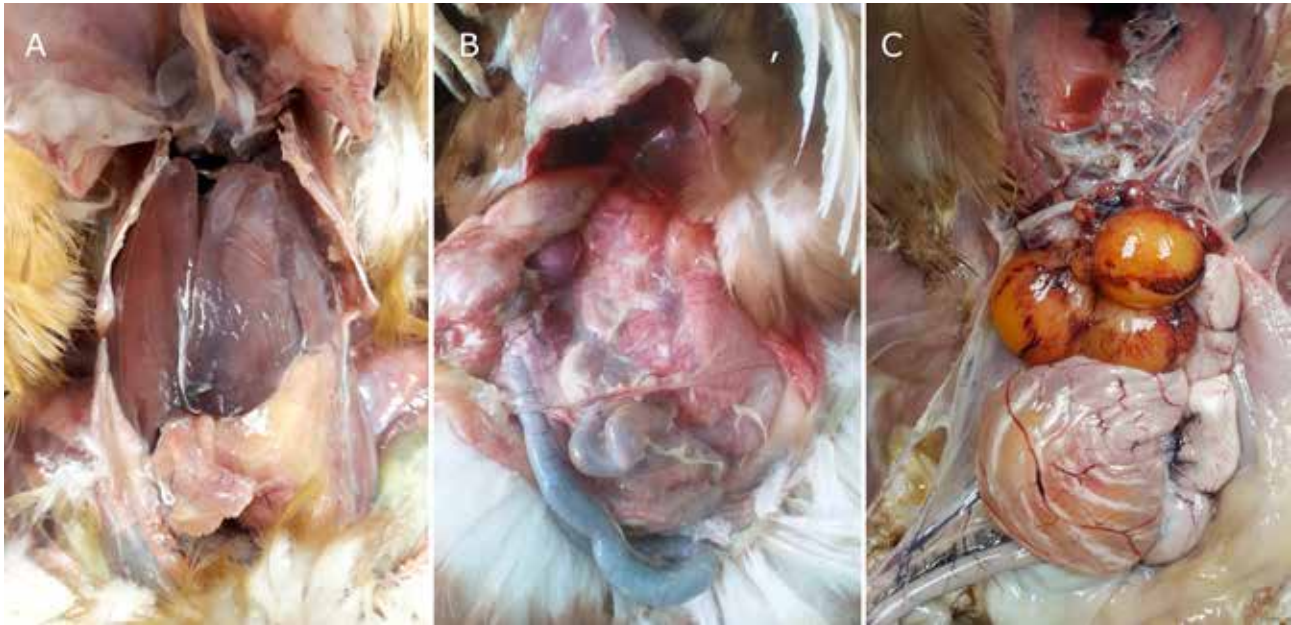
javnosti infekcije u jatru u suho i vlažno doba godine. Iako u strogo kontroliranim uvjetima u intenzivnom uzgoju razlike nisu toliko značajne, promjena mikroklimatskih uvjeta može biti predisponirajući čimbenik. Nadalje, neki smatraju da dob nema utjecaja na pojavnost bolesti (Bojesen i sur., 2003.), iako drugi autori tvrde suprotno (Bisgaard, 1977.; Persson i Bojesen, 2015.).

Čimbenici virulencije

Čimbenici virulencije omogućuju pojavu bolesti i određuju patogenost nekog mikroorganizma, te su nužni za njegovu održivost (Persson i Bojesen, 2015.). Oni pridonose pojavi simptoma, kolonizaciji, boljem iskorištavanju hranjivih tvari, izbjegavanju imunskog sustava i adheziji molekula. Bakterija *G. anatis* ima različite čimbenike virulencije kao što su RTX-like toxin *GtxA*, *outer membrane vesicles* (OMV), kapsula, fimbrije, metaloproteaze te sposobnost hemaglutinacije. Mnoga se istraživanja temelje na dokazivanju mogućnosti korištenja tih čimbenika virulencije u proizvodnji autogenih cjepiva kao nositelja patogenosti. RTX-like toxin *GtxA* sintetiziraju sve bakterije porodice *Pasteurellaceae* (Pedersen i sur., 2015.). Djeluje leukotoksično na makrofage peradi te razara eritrocite što se očituje nastankom beta-hemolitičkih zona na krvnom agaru u slučaju *G. anatis* bv. *haemolytica*. OMV su membranske strukture koje stvaraju sve gram-negativne bakterije. Imaju ulogu u interakciji s okolišem i unutar bakterijske populacije te omogućuju bakteriji preživljavanje u stresnim uvjetima. Njihova je glavna uloga prihvaćanje, kolonizacija i zaštita bakterijske stanice (Singh i sur., 2016.). Novija se istraživanja temelje na mogućnosti iskorištavanja različitih čimbenika virulencije kao adjuvansa i antigena u cjepivu koje bi pružalo unakrižnu zaštitu od više biovarova iz roda *Gallibacterium*. *G. anatis* također ima sposobnost stvaranja biofilma što omogućuje prihvaćanje na površine živih tkiva i ima važnu ulogu u patogenezi i pojavi kroničnih infekcija, uz pojačanu neosjetljivost na antimikrobne pripravke (Singh i sur., 2016.).

Dijagnostika

Dijagnoza infekcije bakterijom *G. anatis* može se postaviti na temelju izolacije bakterije iz tkiva te fenotipskim i genotipskim metodama. S obzirom na nespecifičnost kliničkih znakova i patomorfoloških promjena potrebne su dodatne dijagnostičke metode za postavljanje sigurne dijagnoze. Bakterije rastu na krvnom agaru, bijelosivkaste su boje, promjera 2 – 3 mm, a hemolitičke sojeve obilježava tvorba zone beta-hemolize veličine 1 – 2 mm nakon 24-sat-



Slika 1. A. Perihepatitis. B. Fibrinozni peritonitis. C. Folikulitis. (Foto.: Liča Lozica)

ne inkubacije, na temelju koje se može posumnjati na *G. anatis* (slika 2.A). Identifikacija se temelji na morfološkim karakteristikama i biokemijskim testovima, a dijagnoza se potvrđuje metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ili metodom MALDI-TOF (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*). Osim PCR-a za razlikovanje klonova *G. anatis* može se rabiti polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (engl. *amplified fragment length polymorphism*, AFLP), fluorescentna hibridizacija *in situ* (engl. *fluorescent in situ hybridization technique*, FISH) kao i elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE), omogućujući prepoznavanje različitih specifičnih patogenih sojeva (Bojesen i sur., 2007.). Zasad ne postoje komercijalni kitovi za imunoenzimni test (ELISA) u svrhu dijagnostike, no može se primijeniti *in-house* ELISA kao dijagnostička metoda, ali i za provjeru procijepljenosti jata u slučaju primjene autogenog cjepiva (Gottstein i sur., neobjavljeni podaci).

Terapija i profilaktičke mjere

Gallibacterium anatis jest komenzalni mikroorganizam koji u nepovoljnim uvjetima uzrokuje infekciju, stoga samo u jatima držanima u optimalnim uvjetima neće biti bolesti. Pridržavanje biosigurnosnih mjera na farmi znatno će smanjiti mogućnost nastanka i širenja bolesti, a time i ekonomske gubitke koji bi nastali liječenjem. Zbog širenja infekcije horizontalnim putem bolest se vrlo brzo može proširiti

cijelom farmom. U intenzivnom uzgoju u peradarskoj industriji brzo se razvija antimikrobna rezistencija zbog učestale uporabe antibiotika. Zabilježena je česta multirezistentnost *G. anatis* na tetracikline, streptomycin, trimetoprim-sulfametoksazol te kinolone (Bojesen i sur., 2011.; Johnson i sur., 2013.; Abd El-Hamid i sur., 2016.; Singh i sur., 2016.). Osjetljivost na antimikrobne preparate iz skupine aminoglikozida te za amoksisicilin i eritromicin različita je (Jones i sur., 2013.; Abd El-Hamid i sur., 2016.). Egipatski istraživači zaključili su da je jedan od pokazatelja da je *G. anatis* filogenetski odvojen mikroorganizam od roda *Pasteurellaceae* činjenica da su svi njihovi izolati s farmi bili rezistentni na oksitetraciklin, trimetoprim-sulfametoksazol i streptomycin, koji su najčešće korišteni antibiotici u liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama iz roda *Pasteurella* u kokoši, purana i pataka (Dewhirst i sur., 1993.; Janda, 2011.; Jones i sur., 2013.; Elbestawy i sur., 2014.). Moguće je da se zbog neprikladne terapije drugih bolesti u jatu razvija multirezistencija koja se primijeti tek naknadno u slučaju izbijanja bolesti. Rezultati istraživanja antimikrobne rezistencije provedeni na izolatima izdvojenim u Hrvatskoj također pokazuju visoku učestalost multirezistentnih sojeva (Lozica i sur., 2018.a). Smanjenju pojave antimikrobne rezistencije može pridonijeti korištenje autogenih cjepiva. Razvoj prikladnog cjepiva protiv *G. anatis* jest izazov zbog velike genetske varijabilnosti unutar vrste, odnosno velikog broja biovarova kod kojih ne dolazi do unakrižne zaštite (Christensen i sur., 2003.; Persson i sur., 2010.; Bojesen i sur., 2011.; Johnson i



Slika 2. *Gallibacterium anatis* u čistoj kulturi na krvnom agaru.
(Foto.: Aleksandar Gavrilović)

sur., 2013.; Chavez i sur., 2017.). U istraživanju koje su proveli Bojesen i suradnici (2003.a, b), dokazano je da su hemolitički biovarovi *Gallibacterium* spp. često bili prisutni na farmama s niskom ili umjerenom biosigurnosnom zaštitom, što upućuje na to da su velik rizik za pojavnost ove bakterije uvjeti držanja i mjere biosigurnosti. Trenutačna se istraživanja temelje na identifikaciji dijelova mikroorganizama koji bi bili prikladni antigeni za razvoj cjepiva. Pangenomska istraživanja omogućuju identifikaciju antigena koji bi bili odgovorni za poticanje zaštitnog imunogenog odgovora. Pokusima se dokazuje mogućnost iskorištavanja OMV-a kao adjuvansa i antigena za cjepivo mnogih bakterijskih vrsta, uključujući bakterije iz roda *Pasteurellaceae*, kao što su *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* i *Neisseria meningitidis* grupe B (Holst i sur., 2009.; Roier i sur., 2013.). Zaštita može biti specifična za određeni soj, odnosno biovar, zbog varijabilnosti OMV-a unutar jedne vrste bakterije (Holst i sur., 2009.). Persson i suradnici (2018.) istražili su mogućnost korištenja OMV-a kao adjuvansa uz druge čimbenike virulencije kao antigene, pri čemu su dokazali da kombinacija OMV i *F1fA* (F17 sličan fimbrijama) u cjepivu ima potencijal zaštititi domaćina od razvoja salpingitisa. U tom istraživanju nisu primijećene upale, ekssudat, atrofija folikula i jaka hiperemija (Persson i sur., 2018.). Ipak, dodatna istraživanja potrebna su kako bi se dokazala učinkovitost i vrijeme poluzivota protutijela. Iako su neki čimbenici virulencije vrlo detaljno opisani, patogeneza u prirodnim uvjetima i

dalje nije u potpunosti razjašnjena (Persson i Bojesen, 2015.). *In vivo* pokusima potvrđen je potencijal korištenja *FlfA* i *GtxA* kao antigena u cjepivu protiv infekcija bakterijama iz roda *Gallibacterium* (Kristensen i sur., 2010.; Pedersen i sur., 2015.; Pors i sur., 2016.b). Također se trenutačno vrlo često rabe i autogena cjepiva, uglavnom u kombinaciji s *E. coli*, koja su se pokazala vrlo djelotvornima u zaštiti kokoši nesilica smanjivanjem mortaliteta i pada nesivosti (Gottstein i sur., 2018.).

Zaključak

Infekcija bakterijom *G. anatis* na farmama u Hrvatskoj potencijalna je prijetnja za proizvodnju zbog velikih ekonomskih gubitaka koje može uzrokovati. Iako primjena cjepiva nije dovoljna mjera za kontrolu bolesti, uz primjenu biosigurnosnih mjera i načela *svi unutra – svi van* može pomoći u sprečavanju bolesti na farmi. Preventivnim se cijepljenjem smanjuje potreba za antimikrobnom terapijom zaraženih jata, što ima pozitivan utjecaj i na zdravlje ljudi te na razvoj antimikrobne rezistencije. Stalnim praćenjem epizootičke situacije potrebno je kontrolirati pojavnost i širenje patogenih biovarova koji su opasni za perad u proizvodnji, te prilagoditi program imunoprofilakse potrebama farme i epizootičkom području u kojemu se nalazi.

Literatura

- ABD EL-HAMID, H. S., H. F. ELLAKANY, A. A. BEKHEET, A. R. ELBESTAWY, N. MATARIED (2016): Pathogenicity of ten *Gallibacterium anatis* isolates in commercial broiler chickens. *Alexandria J. Vet. Sci.* 49, 42-49.
- ANONYMOUS (2014): Colibacillosis in layers: an overview. *Hy-Line Technical Update*, 1-8.
- ANTÃO E.-M. (2010): Identification of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) genes important for the colonization of the chicken lung and characterization of the novel ExPEC adhesin I. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- ATAEI, S., A. M. BOJESEN, F., AMININAJAFI, M. M. RANJBAR, M. BANANI, M. AFKHAMNIA, M. ABTIN, A., ABTIN, H. GOODARZI (2017): First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. *Arch. Razi Inst.* 72, 123-128.
- AUBIN, G. G., A. HALOUN, M. TREILHAUD, A. REYNAUD, W. CORVED (2013): *Gallibacterium anatis* bacteremia in Human. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3897-3899.
- BISGAARD, M. (1977): Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparent-

- ly healthy chickens and chickens with infectious bronchitis: characterisation of 213 strains. *Avian Pathol.* 6, 285–292.
- BISGAARD, M. (1982): Isolation and characterization of some previously unreported taxa from poultry with phenotypical characters related to *Actinobacillus* and *Pasteurella* species. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B: Microbiol.* 90, 59-67.
 - BISGAARD, M. (1993): Ecology and significance of Pasteurellaceae in animals. *Zentralbl. Bakteriol.* 279, 7-26.
 - BISGAARD, M., B. M. KORCZAK., H. BUSSE., P. KUHNERT., A. M. BOJESEN., H. CHRISTENSEN (2009): Classification of taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard with *Gallibacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 735–744.
 - BOJESEN, A. M., S. S. NIELSEN, M. BISGAARD (2003a): Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production system with different biosecurity level. *Avian Pathol.* 32(5), 503-510.
 - BOJESEN, A. M., M. TORPDAHL, H. CHRISTENSEN, J. E. OLSEN., M. BISGAARD (2003b): Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chicken flocks. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2737–2740.
 - BOJESEN, A. M., O. L. NIELSEN, J. P. CHRISTENSEN, M. BISGAARD (2004): In-vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chicken. *Avian Pathol.* 33, 145-152.
 - BOJESEN, A. M., M. E. VAZQUEZ, F. ROBLES, C. GONZALEZ, E. V. SORIANO (2007): Specific identification of by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Vet. Microbiol.* 123, 262-268.
 - BOJESEN, A. M., R. J., BAGER, D. IFRAH, F. M. AAR-ESTRUP (2011a): The rarely reported tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* 149, 497–499.
 - BOJESEN, A. M., M. E. VAZQUEZ, R. J. BAGER, D. IFRAH, C. GONZALEZ, F. M. AARESTRUP (2011b): Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium Anatis*. *Vet. Microbiol.* 148, 105–110.
 - CHAVEZ, O. R. F., M. R. M. BARRIOS, H. J. F. CHAVEZ, M. J. ROBLES, I. J. G. A. ESCALANTE, M. ACUÑAY-ANES (2017): First report of biovar 6 in birds immunized against *Gallibacterium anatis* in poultry farms located in Sonora, Mexico. *Veterinaria México OA* 4, 389.
 - CHRISTENSEN, H., M. BISGAARD, A. M. BOJESEN, R. MUTTERS, J. E. OLSEN (2003): Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, “*Actinobacillus salpingitidis*” or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 275–287.
 - CORDONI, G., M. J. WOODWARD, H. WU, M. ALANAZI, T. WALLS, R. M. LA RAGIONE (2016): Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC). *BMC Genomics*, 17, 960.
 - DEWHIRST, R. E., B. J. PASTER, I. OLSEN, G. J. FRASER (1993): Phylogeny of the Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences. *Zentralbl. Bakteriol. B.* 279, 35-44.
 - EL-BESTAWY, A.R. (2014): Studies on *Gallibacterium anatis* infection in chickens. Dissertation, Alexandria University.
 - GOTTSTEIN, Ž., L. LOZICA, D. HORVATEK TOMIĆ, G. NEDELJKOVIĆ, M. LUKAČ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ (2018): Autogenous vaccine against *Escherichia coli* and *Gallibacterium anatis* reduces losses and improves production on layer farms. The XVth European Poultry Conference (Dubrovnik, 17.-21. rujna 2018.). Conference Information and Proceedings. Dubrovnik, (149).
 - HOLST, J., D. MARTIN, R. ARNOLD, C. C. HUERGO, P. OSTER, J. O’HALLAHAN, E. ROSENQVIST (2009): Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 27, B3-B12.
 - JANDA, W. M. (2011): Update on Family Pasteurellaceae and the Status of Genus *Pasteurella* and Genus *Actinobacillus*. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 33, 135-144.
 - JOHNSON, T. S., J. L. DANZEISEN, D. TRAMPPEL, L. K. NOLEN, T. SEEMANN, R. J. BAGER, A. M. BOJESEN (2013): Genome Analysis and Phylogenetic Relatedness of *Gallibacterium anatis* Strains from Poultry. *PLoS ONE* 8, e54844.
 - JONES, K. H., J. K. THORNTON, Y. ZHANG, M. J. MAUEL (2013): A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and *Pasteurella multocida* isolates from chickens in Mississippi. *Poult Sci* 92, 3166-71.
 - KRISTENSEN, B.M., D. FREES, A. M. BOJESEN (2010): GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organisation. *Vet. Res.* 41, 25.
 - KRISTENSEN, B.M., D. FREES, A. M. BOJESEN (2011): Expression and secretion of the RTX-toxin

- GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. *Vet. Microbiol.* 153, 116-123.
- LAWAL, J. R., J. J. NDAHL, A. M. BELLO, Y. WAKIL, J. DAUDA, U. I. IBRAHIM (2017): Prevalence, isolation and antimicrobial susceptibility of *Gallibacterium anatis* from local breed of female muscovy ducks (*Cairina moschata*) in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *JASVM.* 2, 27-37.
 - LOZICA, L., D. HORVATEK TOMIĆ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2018a): Antimicrobial resistance of *Gallibacterium anatis* isolated from layer poultry farms in Croatia. 6th International Veterinary Poultry Congress (Teheran, 27. veljače-1. ožujka 2018.). Proceedings of 6th International Veterinary Poultry Congress. Teheran, (155).
 - LOZICA, L., D. HORVATEK TOMIĆ, E. PRUKNER-RADOVČIĆ, Ž. GOTTSTEIN (2018b): Prevalence of *Gallibacterium anatis* isolated from layer poultry farms in Croatia. The XVth European Poultry Conference (Dubrovnik, 17.-21. rujna 2018.). Conference Information and Proceedings. Dubrovnik, (197).
 - MATTHIJS, M., M. P. ARIAANS, R. M. DWARS, J. H. H. VAN ECK, A. BOUMA, A. STEGEMAN, L. VERVELDE (2009): Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 127, 77-84.
 - MELLATA, M. (2013): Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 916-932.
 - MUSHIN, R., Y. WEISMAN, N. SINGER (1980): *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. *Avian Dis.* 24, 162-168.
 - NEUBAUER, C., M. DE SOUZA-PILZ, A. M. BOJESEN, M. BISGAARD, M. HESS (2009): Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathol.* 38, 1-7.
 - PAUDEL, S., M. ALISPAHIC, D. LIEBHART, M. HESS, C. HESS (2013): Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization. *Avian Pathol.* 42, 527-535.
 - PAUDEL, S., D. LIEBHART., M. HESS., C. HESS. (2014): Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. Folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers. *Avian Pathol.* 43, 443-449.
 - PAUDEL, S., C. HESS, P. WERNSDORF, T. KÄSER, S. MEITZ, E. JENSEN-JAROLIM, M. HESS, D. LIEBHART (2015): The systemic multiplication of *Gallibacterium anatis* in experimentally infected chickens is promoted by immunosuppressive drugs which have a less specific effect on the depletion of leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 166, 22-32.
 - PERDERSEN, I. J. P., S. E. PORS, R. J. BAGER SKJERNING, S. S. NIELSEN, A. M. BOJESEN (2015): Immunogenic and protective efficacy of recombinant protein GtxA-N against *Gallibacterium anatis* challenge in chickens. *Avian Pathol.* 44, 386-391.
 - PERSSON, G., S. E. PORS, I. C. N. THOFNER, A. M. BOJESEN (2010): Vaccination with outer membrane vesicles and the fimbrial protein FlfA offers improved protection against lesions following challenge with *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* 217, 104-111.
 - PERSSON, G., A. M. BOJESEN (2015): Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Vet. Res.* 46, 57.
 - PORS, S. E., R. BAGER SKJERNING, E. M. FLACHS, A. M. BOJESEN (2016b): Recombinant proteins from *Gallibacterium anatis* induces partial protection against heterologous challenge in egg-laying hens. *Vet. Res.* 47, 36-43.
 - PROCTOR, R. A., C. VAN EIFF, B. C. KAHL, K. BECKER, P. MCNAMARA, M. HERMANN, G. PETERS (2006): Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 295-305.
 - ROIER, S., J. C. FENNINGER, D. R. LEITNER, G. N. RECHBERGER, J. REIDL, S. SCHILD (2013): Immunogenicity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* outer membrane vesicles. *J. Med. Microbiol.* 303, 247-256.
 - RZEWUSKA, M., E. KARPIŃSKA, P. SZELESZCZUK, M. BINEK (2007): Isolation of *Gallibacterium* spp. from epacocks with respiratory tract infections. *Med. Weter.* 63, 1431-1433.
 - SINGH, S.V., B. R. SINGH, D. K. SINHA, V. KUMAR OR, P. A. ADHANA, M. BHARDWAJ, S. DUBEY (2016): *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. *J Vet. Sci. Techno.* 7, 324.
 - ZEPEDA, V. A., N. L. CALDERÓN-APODACA, M. L. PAASCH, P. G. MARTÍN, D. A. PAREDES, S. RAMÍREZ-APOLINAR, E. SORRIANO-VARGAS (2010): Histopathologic findings in chickens experimentally infected with *Gallibacterium anatis* by nasal instillation. *Avian Dis.* 54, 1306-1309.