

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET VETERINARSKE  
MEDICINE

Ratko R. Sukara

Epizootiološko-epidemiološki značaj  
zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju  
vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji  
Republike Srbije

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF VETERINARY  
MEDICINE

Ratko R. Sukara

Epizootiological-epidemiological importance  
of the golden jackal (*Canis aureus*) in the  
maintenance of vector-borne zoonoses in  
the territory of the Republic of Serbia

Doctoral Dissertation

Beograd, 2019

## **MENTORI:**

**Mentor 1: Dr Miroslav Valčić, redovan profesor,**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Mentor 2: Dr Snežana Tomanović, naučni savetnik,**  
Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Miroslav Valčić, redovan profesor,**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Dr Snežana Tomanović, naučni savetnik,**  
Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

**Dr Sonja Radojičić, redovni profesor,**  
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Dr Duško Ćirović, docent,**  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

**Datum odbrane:**

---

*Realizacija doktorske disertacije pod naslovom: „Epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala (Canis aureus) u održavanju vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije“ sprovedena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Enzootski transmisioni ciklusi patogenih mikroorganizama koje prenose krpelji (OI173006)“, kojim rukovodi dr Snežana Tomanović.*

*Mojoj Saši*

# Epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije

## Rezime

Istraživanjem sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije, po prvi put u Srbiji, analiziran je epizootiološko-epidemiološki značaj šakala (*Canis aureus*) kao potencijalnih rezervoara za uzročnike zoonoza koje se prenose vektorima. Molekularnim metodama (qPCR, konvencionalni PCR, RFLP, sekvenciranje) u slezinama šakala i krpeljima sakupljenim sa šakala, dokazivano je prisustvo vektorima prenosivih patogena iz rodova: *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Leishmania* spp., i vrsta u okviru *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksa i *Coxiella burnetii*.

Ukupno je analizirano 216 šakala poreklom sa 10 lokaliteta širom teritorije Republike Srbije. Na prisustvo patogena ispitano je i 118 sakupljenih krpelja koji su pripadali jednoj od tri vrste: *Ixodes ricinus* (54,2%), *Dermacentor reticulatus* (39,8%) i *Haemaphysalis concinna* (5,9%).

Molekularnim metodama u slezinama šakala potvrđeno je prisustvo DNK *Babesia canis* sa prevalencijom od 4,2% (9/216), *Anaplasma phagocytophilum* (0,9%, 2/216) i *Leishmania* spp. (6,9%, 15/216). U krpeljima sakupljenim sa

šakala potvrđeno je prisustvo DNK dve vrste *Babesia* (*Babesia canis*, *Babesia microti*), *Anaplasma phagocytophilum* i tri vrste *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa (*Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana*).

Rezultati dobijeni u sklopu ove doktorske disertacije ukazuju na potencijalnu ulogu šakala kao domaćina rezervoara za *Babesia canis*, glavnog uzročnika babezioze pasa u Evropi, za *A. phagocytophilum*, značajnog patogena sa aspekta humane i veterinarske medicine a skrenuta je pažnja na šakale kao potencijalne rezervoare uzročnika lajšmanioze u našoj zemlji. Utvrđeno prisustvo patogena u krpeljima sakupljenim sa šakala (*Babesia microti*, *Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana* i *Anaplasma marginale*), ukazuje na potrebu i za aktivnim epizootiološko-epidemiološkim nadzorom oboljenja koja navedeni patogeni izazivaju.

Ključne reči: Vektorima prenosivi patogeni, *Canis aureus*, *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Leishmania* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, PCR, Srbija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

UDK broj: 619:616.993:549.742

# Epizootiological-epidemiological importance of the golden jackal (*Canis aureus*) in the maintenance of vector-borne zoonoses in the territory of the Republic of Serbia

## Summary

The research conducted within this PhD dissertation analyzed the epizootiological and epidemiological role of the golden jackals (*Canis aureus*) as potential reservoirs for zoonotic vector-borne pathogens, for the first time in Serbia.

Jackal spleens and collected ticks were tested by molecular methods (qPCR, conventional PCR, RFLP, sequencing) for the presence of vector-borne pathogens from the genera: *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Leishmania* spp., and species from *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex and *Coxiella burnetii*.

A total of 216 jackals originating from 10 localities throughout the territory of the Republic of Serbia were analyzed. Beside that, 118 ticks collected from jackals were also tested. The collected ticks belonged to one of three species: *Ixodes ricinus* (54,2%), *Dermacentor reticulatus* (39,8%) i *Haemaphysalis concinna* (5,9%).

The presence of DNA of *Babesia canis* with the prevalence of 4.2% (9/216), *Anaplasma phagocytophilum* (0.9%, 2/216) and *Leishmania* spp. (6.9%, 15/216) was confirmed by molecular methods in the spleen of the tested jackals. In ticks collected from jackals, the presence of DNA from two *Babesia* spp. (*Babesia canis*, *Babesia microti*), *Anaplasma phagocytophilum* and three species from the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex (*Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana*) was



confirmed.

The results obtained in this PhD dissertation, point to the potential role of the jackal as the reservoir host for the *Babesia canis*, which is the main causative agent of canine babesiosis in Europe, for *A. phagocytophilum*, recognized as important pathogen from the standpoint of human and veterinary medicine, and the results also point to the jackals as the potential reservoirs of the causative agent of leishmaniasis in our country. The confirmed presence of pathogens in ticks collected from the jackals in our study (*Babesia microti*, *Borrelia* spp. and *Anaplasma marginale*) indicates the need for active epizootiological and epidemiological monitoring of diseases caused by these pathogens.

Key words: vector-borne pathogens, *Canis aureus*, *Babesia* spp., *Anaplasma* spp., *Leishmania* spp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, PCR, Serbia

Scientific field: Veterinary medicine

Field of academic expertise: Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDC number: 619:616.993:549.742

# SADRŽAJ

SADRŽAJ .....	1
1. UVOD .....	4
2. PREGLED LITERATURE .....	7
2.1 Epizootiološko-epidemiološke determinante sa stanovišta zoonoza prenošenih vektorima .....	7
2.1.1 Šakali i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj .....	8
2.1.1.1 Osobnosti zlatnog šakala ( <i>Canis aureus</i> ) .....	8
2.1.1.2 Epizootiološko-epidemiološki značaj šakala.....	14
2.1.2 Krpelji i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj.....	14
2.1.2.1 Opšte karakteristike krpelja.....	14
2.1.2.2 Životni ciklus krpelja .....	16
2.1.2.3 Epizootiološko-epidemiološki značaj krpelja .....	18
2.1.3 Flebotomine i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj.....	20
2.1.3.1 Opšte karakteristike flebotomina.....	20
2.1.3.2 Epizootiološko-epidemiološki značaj flebotomina.....	21
2.1.4 Epizootiološko-epidemiološki aspekti babezioze, lajmske bolesti i anaplazmoze.....	22
2.1.4.1 Babezioza .....	22
2.1.4.2 Lajmska bolest .....	33
2.1.4.3 Anaplazmoza.....	37
2.1.5 Epizootiološko-epidemiološki aspekti rikecioze, Kju groznice, tularemije, bartoneloze .....	40
2.1.5.1 Rikecioza .....	40
2.1.5.2 Kju groznica .....	42
2.1.5.3 Tularemija .....	45
2.1.5.4 Bartoneloza .....	48

2.1.6	Epizootiološko-epidemiološki aspekti lajšmanioze .....	50
2.1.6.1	Razvojni ciklus <i>Leishmania</i> spp.....	53
2.1.6.2	Vektori <i>Leishmania</i> spp.....	54
2.1.6.3	Rezervoari <i>Leishmania</i> spp. ....	55
3.	CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	58
4.	MATERIJALI I METODE .....	60
4.1	Opis istraživanog područja .....	60
4.2	Prikupljanje tkiva šakala .....	61
4.3	Prikupljanje krpelja sa šakala.....	61
4.3.1	Entomološki pregled krpelja.....	62
4.4	Izolacija DNK i molekularna detekcija patogena u uzorcima tkiva šakala i krpelja .....	62
4.4.1	Izolacija DNK iz slezine šakala .....	62
4.4.2	Izolacija DNK iz krpelja.....	64
4.4.3	Molekularne metode u detekciji i identifikaciji vrsta u okviru familije Anaplasmataceae i rodova <i>Babesia</i> , <i>Rickettsia</i> , <i>Francisella</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Leishmania</i> , kao i <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. i <i>Coxiella burnetii</i> .....	65
4.4.3.1	Detekcija <i>Anaplasma</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., <i>Francisella tularensis</i> , <i>Bartonella</i> spp., i <i>Coxiella burnetii</i> u slezinama šakala.....	65
4.4.3.2	Detekcija <i>Leishmania</i> spp., u slezinama šakala .....	68
4.4.3.3	Detekcija <i>Babesia</i> spp. i <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. u slezinama šakala .....	69
4.4.3.4	Detekcija i identifikacija vektorima prenosivih patogena u krpeljima sakupljenim sa šakala .....	70
4.5	RFLP metoda korišćena u identifikaciji vrsta roda <i>Anaplasma</i> i vrsta u okviru <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. kompleksa .....	75
4.6	Sekvenciranje pozitivnih uzoraka .....	76
4.7	Statistička analiza rezultata.....	76
5.	REZULTATI .....	77
5.1	Sakupljeni uzorci tkiva šakala .....	77
5.2	Sakupljeni krpelji sa odstreljenih šakala .....	82
5.2.1	Infestacija šakala krpeljima .....	85

5.3	Molekularna detekcija patogena u analiziranim uzorcima .....	88
5.3.1	Nalaz patogena u slezinama šakala .....	88
5.3.1.1	Identifikovane vrste u okviru patogenih rodova čije je prisustvo dokazano u analiziranim uzorcima tkiva šakala .....	95
5.3.2	Nalaz patogena u krpeljima sakupljenim sa šakala.....	97
6.	DISKUSIJA.....	104
7.	ZAKLJUČCI.....	129
8.	LITERATURA .....	132

## 1. UVOD

Vektorima prenosive bolesti zoonoznog karaktera poslednjih decenija sa razlogom, sve više zaokupljaju interesovanje naučne javnosti. Patogeni koji se prenose vektorima ugrožavaju zdravlje ljudi i životinja širom sveta a bolesti koje izazivaju dovode i do velikih ekonomskih gubitaka. Zbog globalnih klimatskih promena areali vrsta koje mogu da posluže kao vektori (krpelji, peščane mušice, komarci,..) infektivnim agensima sa zoonoznim potencijalom se iz godine u godinu šire, te se tako pojedine vektorima prenosive bolesti danas javljaju u regionima sveta u kojima do sada nisu bile registrovane ili se javljaju učestalije na prostorima gde su se pojavljivale sporadično. Sa druge strane, promene u dinamici populacija pojedinih vrsta kičmenjaka koje predstavljaju potencijalne rezervoare, nameću potrebu za konstantnim epizootiološkim nadzorom u cilju prevencije rizika po zdravlje ljudi i životinja.

Koncept „jedno zdravlje“ (*eng. One Health*), koji je definisan kao globalna strategija sa interdisciplinarnim pristupom u rešavanju zdravstvenih problema, prepoznaje povezanost ljudi, životinja i životne sredine, te naglašava značaj istraživanja divljih kanida sa aspekta javnog zdravlja. Ovaj koncept je od strane stručne javnosti prepoznat kao strategija za 21. vek u rešavanju zdravstvenih problema ljudi i životinja.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije. Populacija zlatnog šakala je doživela vrlo dinamične promene u poslednjih sedamdeset godina na ovim prostorima. Posle drugog svetskog rata brojnost jedinki je smanjena skoro do istrebljenja jer je verovatno stradao kao kolateralna šteta usled planskog trovanja vukova. Vremenom su se gustina populacije i areal postepeno povećavali, sa kulminacijom poslednjih godina. Iako autohtona vrsta sisara koja intezivno uvećava brojnost i rasprostranjenje, do sada nisu vršena istraživanja o ulozi šakala u

epizootiologiji vektorima prenosivih patogena u našoj zemlji. Epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala u ovoj doktorskoj disertaciji sagledan je kroz istraživanje prisustva i određivanje prevalencija vrsta vektorima prenosivih patogena iz rodova: *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Leishmania* spp., te vrsta u okviru *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksa i kroz detekciju prisustva *Coxiella burnetii* u tkivu slezine ispitivanih šakala a dodatno i kroz testiranje krpelja sakupljenih sa šakala na prisustvo prethodno nabrojanih zoonoznih patogena. Iako su patogeni iz pomenutih rodova uzročnici veoma značajnih zoonoza, prava epizootiološko-epidemiološka situacija u našoj zemlji nije do kraja istražena.

Sa aspekta javnog zdravlja, krpelji predstavljaju izuzetno značajne vektore zoonoznih patogena. Zlatni šakali predstavljaju dobre domaćine za više vrsta krpelja koji su prisutni na teritoriji naše zemlje. Iste vrste krpelja se mogu naći kao paraziti drugih divljih kanida (vuk, lisica) a takođe parazitiraju i na psima. Potvrđeno je i prisustvo najvažnije antropofilne vrste krpelja kod nas *Ixodes ricinus* na odstreljenim šakalima sa teritorije Republike Srbije što epizootiološko-epidemiološkim istraživanjima ove vrste daje dodatni značaj.

Pored patogena čiji su vektori krpelji, šakali predstavljaju potencijalne rezervoare i za uzročnike drugih vektorima prenosivih bolesti. Lajšmanioza je bila endemična bolest u južnim krajevima naše zemlje a smatra se da je iskorenjena pre više od četrdeset godina. Za održavanje uzročnika lajšmanioze potrebno je prisustvo rezervoara (inficirani psi ili druge domaće i divlje životinje) i vektora- peščanih mušica (flebotomina). Poslednjih godina, pored importovanih slučajeva, postoje indicije da se autohtona lajšmanioza ponovo vratila na šta ukazuje detekcija uzročnika ove bolesti u peščanim mušicama na teritoriji Vojvodine i opisani slučajevi pasa obolelih od lajšmanioze za koje se veruje da nikada nisu napuštali teritoriju naše zemlje. Poznato je da divlje životinje, a među njima i divlje kanide, igraju značajnu ulogu u održavanju lajšmanioze u endemskim područjima. Utvrđivanje prisustva *Leishmania* spp., u šakalima predstavlja prvi korak u poznavanju uloge ove vrste u epizootiologiji uzročnika lajšmanioze u našoj zemlji.

Detekcija i identifikacija prethodno pomenutih vektorima prenosivih zoonoznih patogena u šakalima, te prilog poznavanju vrsta krpelja koje parazitiraju na zlatnim šakalima i detekcija patogena koje u sebi nose, predstavlja značajan doprinos u rasvetljavanju uloge šakala u održavanju vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1 Epizootiološko-epidemiološke determinante sa stanovišta zoonoza prenošenih vektorima

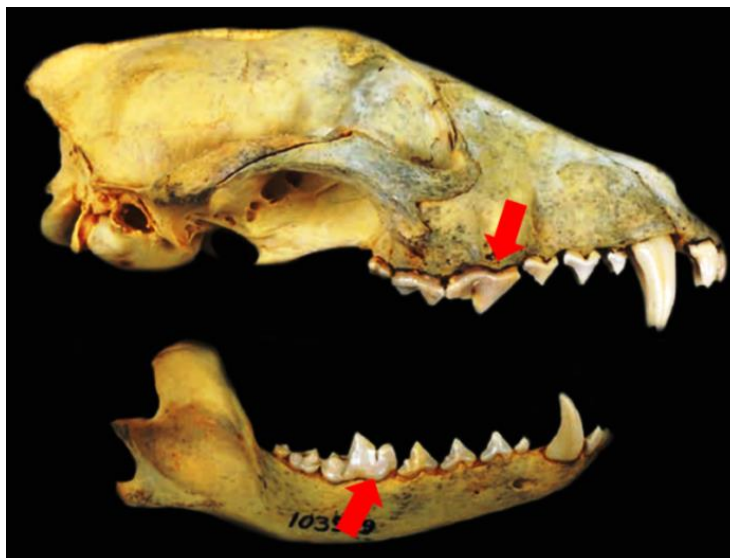
Epidemiologija i epizootiologija (veterinarska epidemiologija) su naučne discipline koje se bave proučavanjem svih faktora koji su u vezi sa oboljenjima u populaciji ljudi odnosno životinja, tj. bave se izučavanjem zakonitosti pod kojim dolazi do pojave bolesti, te prate njeno kretanje i održavanje u prijemčivim populacijama. Epidemiologija i epizootiologija oboljenja čiji se uzročnici prenose vektorima je kompleksne prirode zbog činjenice da je u nastanak ovih bolesti uključeno više faktora među kojima su najvažniji priroda samog mikroorganizma, vektori, domaćini i faktori spoljašnje sredine (Valčić, 1998). U ciklusima transmisije, vektorima prenosivi patogeni, cirkulišu između vektora i primarnih domaćina, te je sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta od velikog značaja poznavanje uloge različitih vrsta domaćina i vektora u enzootskim ciklusima zoonoznih patogena na određenoj teritoriji (Aguirre, 2009; Otranto et al., 2015a,b). Poslednjih decenija evidentno je povećanje incidencije i prevalencije pojedinih zoonoza u čijem prenošenju važnu ulogu imaju vektori (najčešće hematofagni insekti i druge artropode). To se sa jedne strane može objasniti dinamičnim promenama u populacijama životinja koje su prepoznate kao potencijalni vektori i rezervoari uzročnika ovih oboljenja. Sa druge strane, izmenjeni faktori spoljašnje sredine omogućavaju širenje areala vektora čime se ostvaruje mogućnost za pojavljivanje pojedinih vektorima prenosive zoonoza u regionima gde se ranije nisu javljale (Dantas-Torres, 2015; Negev et al., 2015). Zbog svega navedenog a u cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja postoji stalna potreba za epizootiološko-epidemiološkim istraživanjima potencijalnih rezervoara i vektora zoonoznih patogena (Schmidt et al., 2013).



## 2.1.1 Šakali i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj

### 2.1.1.1 Osobnosti zlatnog šakala (*Canis aureus*)

U okviru reda Carnivora (od lat. *carne* = meso i *vorare* = žderati) nalazi se preko 280 vrsta placentarnih sisara, uglavnom predatora. Familija Canidae je među najstarijim današnjim predstavnicima karnivora. Smatra se da njihovi predstavnici datiraju još iz perioda kasnog Eocena. Ovoj familiji pripada oko 36 vrsta svrstanih u pet rodova (Sillero-Zubiri et al., 2004; Van Gelder, 1978). Karakteriše ih specifična građa zubnog aparata koja se ogleda prisustvom „zuba razdirača“ (Slika 1.). Naime, poslednji premolar u gornjoj i prvi molar u donjoj vilici su modifikovani, snažnije građe, prilagođeni efikasnom sečenju i kidanju kože, tetiva i mišića plena.



**Slika 1.** Lobanja šakala sa naznakom na zube razdirače ( zubna formula familije: I 3/3, C 1/1, PM 4/4, M 2/3), (Prema: (Moehlman & Hayssen, 2018))

Postoje tri vrste šakala: zlatni šakal (*Canis aureus*), najkrupniji i najreprezentativniji predstavnik, zatim crnoleđi (*Canis mesomelas*) i prugasti šakal (*Canis adustus*) (Slika 2.),

koji su prisutni samo na Afričkom kontinentu za razliku od zlatnog šakala čija distribucija pored Afrike obuhvata Aziju i Evropu (Koepfli et al., 2015).



**Slika 2.** Tri vrste šakala, **a-** *Canis aureus*, **b-** *Canis mesomelas*, **c-** *Canis adustus* (preuzeto sa: <https://www.zoochat.com/community/media/european-golden-jackal-canis-aureus-moreoticus.129866/>, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2405505>, <https://retrieverman.files.wordpress.com/2017/04/lupullela-adustus.jpg?w=500>)

Zlatni šakal (*Canis aureus*) je divlja kanida srednje veličine tela, poznat i kao obični ili azijski šakal, evroazijski zlatni šakal ili crveni vuk (Koepfli et al., 2015; Sillero-Zubiri et al., 2004; Tóth et al., 2009). Ime vrste potiče od karakterističnog krzna u kome po bokovima dominiraju zlatno-žute nijanse, koje u različitim periodima godine poprimaju svetlije ili tamnije tonove. Autohtona je vrsta u našoj zemlji ali manje istraživana u odnosu na druge autohtone predstavnike familije Canidae (vuk, lisica) koji žive u Srbiji. Rezultati filogenetskih analiza potvrđuju da se zlatni šakal pre oko 3-4 miliona godina odvojio od klade kojoj pripadaju vuk, pas i kojot (Lindblad-Toh et al., 2005). Taksonomska karakterisitika šakala su spojena dva srednja jastučeta na šapi, što joj daje specifičan izgled i zbog čega ostavljaju karakterističan trag na mekoj podlozi. Veličinom tela šakal je između lisice i vuka. Visina do grebena kod šakala je od 45-50 cm, u lisica do 40 cm dok je kod vuka kao najkrupnijeg predstavnika divljih kanida u našoj zemlji, visina grebena od 70-80 cm (Sillero-Zubiri et al., 2004). Po rezultatima studija u našoj zemlji prosečna težina mužjaka šakala je  $12,1 \pm 0,2$  kg, a ženki  $10,9 \pm 0,3$  kg (Ćirović et al., 2006). Šakal je vrlo prilagodljiva vrsta po pitanju izbora staništa. Njegov širok areal rasprostranjenja objašnjava se činjenicom da opstaje u velikom broju različitih kopnenih bioma (tropske

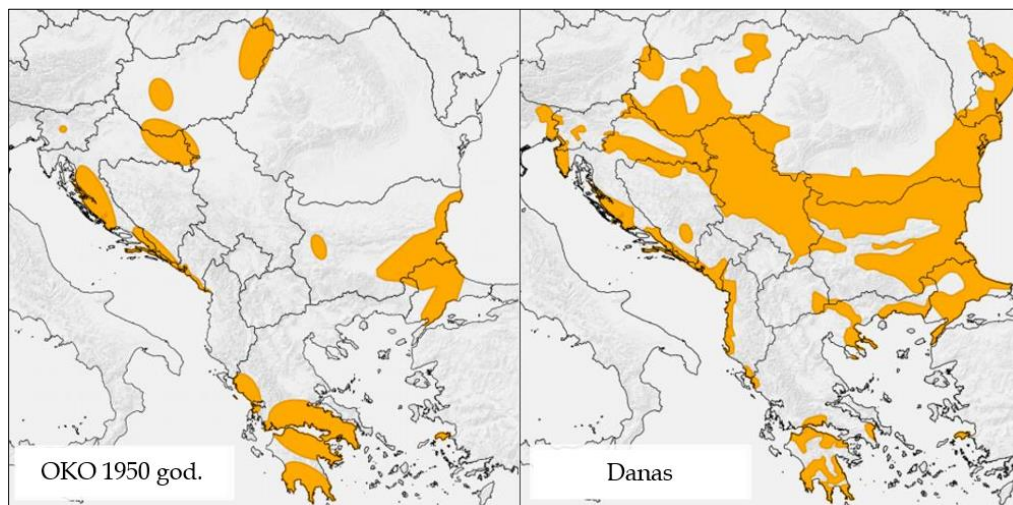
šume, polupustinje, mešovite šume umerenog pojasa) sa izuzetkom predela sa ekstremnom pustinjском klimom i oblasti obraslih gustom šumom (Giannatos, 2004). Na Evropskom kontinentu sklonište u kojima izgrađuju jazbine najčešće nalazi u staništima su gustom vegetacijom poput šuma sa dobro razvijenim podrastom, poplavnim šumama, ili šibljacima i šikarama u nižim predelima (Sillero-Zubiri et al., 2004). Šakali su monogamni, a par najčešće ostaje tokom čitavog života zajedno (od 6 do 8 godina). U odgoj podmlatka uključeni su i mužjak i ženka koji zajedno love i brane teritoriju koju označavaju urinom i fecesom. Druge životinje na svoje prisustvo upozoravaju karakterističnom vokalizacijom. Ponekad u zajednici i do godinu dana ostaju mladi iz prethodnog okota koji pomažu roditeljima u odgajanju mladunaca (Moehlman, 1987). Socijalna organizacija nije stroga i zavisi od količine dostupne hrane te zbog toga broj članova grupe varira. U Izraelu je opisana grupa sa čak preko dvadeset članova (Macdonald, 1979). Broj šakala koji lovi zajedno nije strogo definisan i u korelaciji je sa količinom i tipom dostupne hrane. Grupni lov upražnjavaju u slučaju krupnijeg plena, dok u sezonama sa velikim gustinama sitnih glodara postaju individualni lovci (Lanszki et al., 2006). Šakali se pare jednom godišnje. Graviditet traje dva meseca (60-63 dana) a prema podacima iz literature u Evropi, na svet dolazi između 2 i 10 mladunaca (Giannatos, 2004; Vassilev & Genov, 2002). Ženka koti štence pod zemljom u plitkim jazbinama. Mladi dostižu polnu zrelost sa 11 meseci. Aktivni period šakali započinju sa prvim sumrakom i koji traje tokom čitave noći Tokom dana su uglavnom neaktivni i većinu vremena provode odmarajući se skriveni u gustom vegetaciji (Giannatos, 2004).

Zbog lako dostupne hrane koju nalaze u blizini naselja, šakali često žive u neposrednoj blizini ljudi. Na primer u Grčkoj, Giannatos (2004) beleži prosečnu udaljenost pojedinih grupa šakala od naselja od 2,6 km, dok je u okolini grada Beograda telemetrijsko praćenje reproduktivne grupe pokazalo da je prosečna udaljenost šakala od ivice urbane zone iznosila svega 1 km (Ćirović et al., 2018). Po načinu ishrane šakali su omnivori, vrlo prilagodljivi različitim izvorima dostupne hrane na teritoriji koju naseljavaju. Iz tog razloga sastav ishrane uveliko varira sezonski i u odnosu na dostupnost različitih izvora

hrane (glodari, ptice, divlji papkari, voće, povrće, klanični otpad i uginule domaće životinje na divljim deponijama) (Lanszki & Heltai, 2002; Penezić & Ćirović, 2015; Stoyanov, 2012). Rezultati istraživanja ishrane šakala u našoj zemlji potvrđuju da je šakal generalist i da koristi širok dijapazon hraniva. U Srbiji šakali ne love često jer u velikoj meri koriste antropogne izvore hrane. To najčešće podrazumeva klanični otpad poreklom od domaćih životinja prvenstveno papkara i živine, koji se nesavesno odlaže na neuređenim deponijama. Hrana ovog porekla dominira u najnepovoljnijem, zimskom periodu godine. Time šakal opravdava svoj status sanitarca u prirodi čineći time značajne ekosistemske usluge ljudima. Procena materijalne koristi koju šakali donose samo uklanjanjem otpada životinjskog porekla a ona iznosi 66,8 miliona dinara na godišnjem nivou (Ćirović et al., 2016). U ishrani su prisutni i sitni sisari među kojima dominiraju voluharice a ishrana ovim tipom hrane je dominantna tokom leta. Uklanjajući velike količine sitnih glodara sa poljoprivrednog zemljišta šakali smanjuju nivo šteta na ratarskim kulturama (Ćirović et al., 2016; Penezic & Ćirović, 2015). Istraživanja ishrane šakala sprovedena u Srbiji ukazuju da šakal ne utiče značajnije na smanjene brojnosti gajene divljači. Kao i u slučaju domaćih životinja, gajena divljač je uglavnom zastupljena u ishrani u obliku klaničnog otpada, unutrašnjih organa i creva (ređe kože) koji se odmah nakon odstrela odstranjuju i ostavljaju direktno u lovištu (Penezić & Ćirović, 2015).

Šakali su najverovatnije kolonizovali Evropu u ranom holocenu preko Male Azije (Zachos et al., 2009) ali sve do XX veka njihova brojnost je bila mala a areal ograničen na primorska područja Mediterana i Crnog mora. Dinamične promene areala šakala u Evropi vezuju se za XX vek. Prva polovina XX veka bila je u znaku opadanja brojnosti populacije zbog sprovođenja akcija planskog trovanja vukova koje su bile posebno intezivne posebno posle II svetskog rata (Arnold et al., 2012). Tokom druge polovine XX veka, sve preživjele populacije šakala naglo povećavaju svoju brojnost i rasprostranjenje te se ovakav trend opravdano posmatra kao ekspanzija (Trouwborst et al., 2015). Ilustrativan je primer iz Bugarske koji pokazuje da se areal šakala u toj zemlji za 23 godine (od 1962 do 1985god.) uvećao čak 33 puta (Krystufek et al., 1997) a broj

odstreljenih šakala od 40 jedinki za celu 1940. godinu popeo na skoro 30000 u današnje vreme (Stoyanov, 2012). Slični trendovi su zabeleženi u čitavoj jugoistočnoj Evropi (Slika 3.), a tokom poslednje dve decenije šakali su stigli do Švajcarske, Nemačke, Poljske i Baltika (Krofel et al., 2017; Rutkowski et al., 2015).

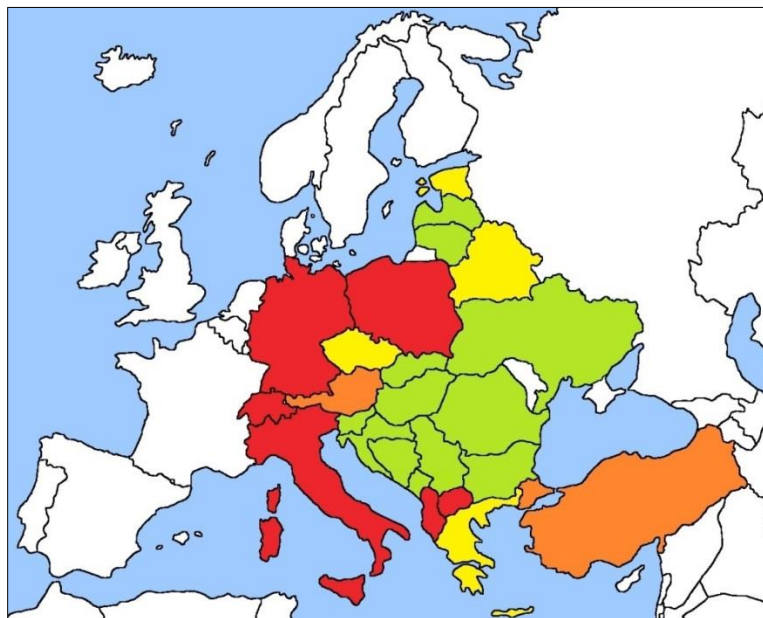


**Slika 3.** Distribucija zlatnog šakala u jugoistočnoj Evropi 1950. godine i danas (prema: Krofel et al., 2017).

Postoji više različitih mišljenja o razlozima za naglo širenje šakala u Evropi. Kao razlozi navode se društveno-ekološke prilike nastale usled klimatskih promena (Fabbri et al., 2014), zatim ratna dešavanja početkom XX veka (balkanski ratovi) (Tóth et al., 2009b), te izmene zakona o lovstvu (Šálek et al., 2014). Odsustvo ili male brojnosti krupnih predatora bi mogao biti takođe jedno od objašnjenja trenutnog širenja šakala na evropskom tlu. Naime Krofel i saradnici (2017) navode da je istrebljenje vukova kao vršnih predatora omogućilo ekspanziju šakala, posebno na području zapadne Evrope. Pored toga, oportunistički način ishrane i velike količine lako dostupne antropogene hrane su izuzetno značajni faktori koji su pogodovali ekspanziji šakala u Evropi (Ćirović

et al., 2016; Giannatos, 2004; Lanszki et al., 2006; Penezić & Ćirović, 2015; Rotem et al., 2011).

Promene areala šakala u našoj zemlji se podudaraju sa dinamičnim promenama u ostalim zemljama Evrope tokom XX veka. Zbog planskih akcija trovanja trovanja vuka šakal je gotovo nesta na prostoru Srbije. Preživeo je smo na izolovanim lokalitetima centralnog Srema i istočne Srbije.. Potom je usledio period stagnacije, da bi povećanje brojnosti i rekolonizacija staništa počela osamdesetih godina XX veka a od 2000. godine poprimila razmere ekspanzije (Ćirović et al., 2008b; Milenković & Paunović, 2003). Procenjuje se da populacija šakala u Srbiji danas broji preko 20 000 jedinki sa distribucijom na preko 70% teritorije zemlje i tendencijom daljeg širenja (Ćirović et al., 2018). Najveća brojnost šakala je zabeležena u Negotinskoj Krajini, Pomoravlju, Donjem Podunavlju i Sremu. U Srbiji je šakal lovna vrsta koja se može loviti tokom čitave godine. Status u drugim zemljama Evrope, prikazan je na slici 4.



**Slika 4.** Status šakala u Evropi: crvena boja- zemlje u kojima je šakal potpuno zaštićena vrsta, narandžasta boja- zavisno od regiona, osnovni režim, žuta boja- bez statusa, nezaštićena vrsta, zelena boja- zemlje u kojima je šakal lovna vrsta (prema Trouwborst et al., 2015).



### 2.1.1.2 Epizootiološko-epidemiološki značaj šakala

Divlje kanide su prepoznate kao domaćini rezervoari za veći broj infektivnih agenasa te predstavljaju dobre „sentinel“ vrste za praćenje vektorima prenosivih bolesti u ekosistemu (Aguirre, 2009). Uprkos povećanju brojnosti populacije i aktuelnom širenju areala zlatnog šakala u zemljama jugoistočne Evrope, kao i tendenciji da dolazi u neposrednu blizinu naselja, samo nekoliko studija do sada se bavilo istraživanjima o ulozi ove vrste u održavanju i širenju uzročnika zoonoza. Studije koje se bave ulogom i značajem šakala u širenju zoonoza bile su uglavnom fokusirane na endoparazite (Széll et al., 2013; Ćirović et al., 2015; Lalošević et al., 2016; Mitková et al., 2017). Zbog prethodno pomenutih činjenica kao i sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta postoji jasna potreba za ovim tipom istraživanja. Za sve patogene obuhvaćene ovom studijom (*Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa, *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., i *Coxiellaburneti* i *Leishmania* spp.) šakali predstavljaju dobre potencijalne domaćine rezervoare. Stoga je rasvetljavanje njihovog epizootiološko-epidemiološkog značaja sa aspekta humane i veterinarske medicine jedan od prioriteta

### 2.1.2 Krpelji i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj

#### 2.1.2.1 Opšte karakteristike krpelja

Krpelji su obligatni hematofagni ektoparaziti svih klasa kičmenjaka osim riba. Zbog svoje široke rasprostranjenosti, raznovrsnosti i velikog potencijala za prenošenje i održavanje većeg broja uzročnika oboljenja ljudi i životinja imaju globalni značaj. Specifična biologija uslovlila je da su krpelji prvi po broju vrsta patogena (uzročnike babezioze, borelioze, anaplazmoze, erlihioze, krpeljskog encefalitisa...) koje prenose u odnosu na sve ostale artropode koje se hrane krvlju a drugi, odmah posle komaraca u svetu po važnosti vektora patogenih mikroorganizama uopšte (Dantas-Torres et al., 2012; Jongejan &

Uilenberg, 2004). Fauna krpelja do danas broji preko 900 opisanih vrsta (Guglielmone et al., 2014). Po taksonomskoj klasifikaciji krpelji pripadaju razdelu Arthropoda, podtipu Chelicerata, klasi Arachnida, potklasi Acarina, nadredu Parasitiformes, redu Ixodida, superfamiliji Ixodoidea i svrstani su u tri familije: Ixodidae, Argasidae i Nuttallielliade. Osnovna taksonomska karakteristika krpelja iz familije Ixodidae je postojanje hitinoznog leđnog štita- *scutum*, zbog čega se označavaju i kao tvrdi krpelji. Krpelji familije Ixodidae su svrstani u dve grupe: *prostrata*, kojoj pripadaju krpelji roda *Ixodes* i grupa *metastriata* sa preostalih 13 rodova: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Cornupalpatum*, *Compluriscutula*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* i *Rhipicephalus* (Guglielmone, 2010). Većina vrsta ove familije ima egzofilni način života i trodomaćinski životni ciklus. Mužijaci ili uzimaju manje količine krvnog obroka ili se uopšte ne hrane krvlju (rod *Ixodes*).

Krpelji svrstani u familiju *Argasidae* zbog nepostojanja leđnog štita označavaju se i kao meki krpelji. U familiji Nuttallielliade nalazi se samo jedna vrsta *Nuttalliella namaqua* koja ima karakteristike krpelja familije Ixodidae i familije Argasidae.

Što se tiče fizioloških i anatomskih karakteristika krpelja, postoji više specifičnosti koje su u skladu sa parazitskim načinom života. Ovo se prvenstveno ogleda u građi usnog aparata (kapitulum) koji je prilagođen bodenju i sisanju krvi kao i posebnoj građi digestivnog trakta. Kapitulum se sastoji iz baze kapitulum, parnih palpi na kojima se nalaze senzorne strukture, parnih helicera i hipostome koje zajedno čine rostrum (Sonenshine & Roe, 2014). Strukture rostruma služe krpelju za probijanje kože domaćina i pričvršćivanje na mestu uboda. Dodatnu stabilnost i uspešno uzimanje krvnog obroka krpelju pružaju komponente pljuvačke koje brzo očvrstnu i stvaraju tzv. cementni čep. Pored proteina koji učestvuju u formiranju cementnog čepa i druge veoma raznovrsne bioaktivne komponente pljuvačke krpelja imaju značajne uloge prilikom uzimanja krvnog obroka. Jedna od uloga pljuvačnih žlezda krpelja je koncentrisanje sadržaja hranljivih materija krvnog obroka salivacijom kojom se u organizam domaćina vraća i do 70% tečnog sadržaja. Ovim se može objasniti zašto veliki broja patogenih

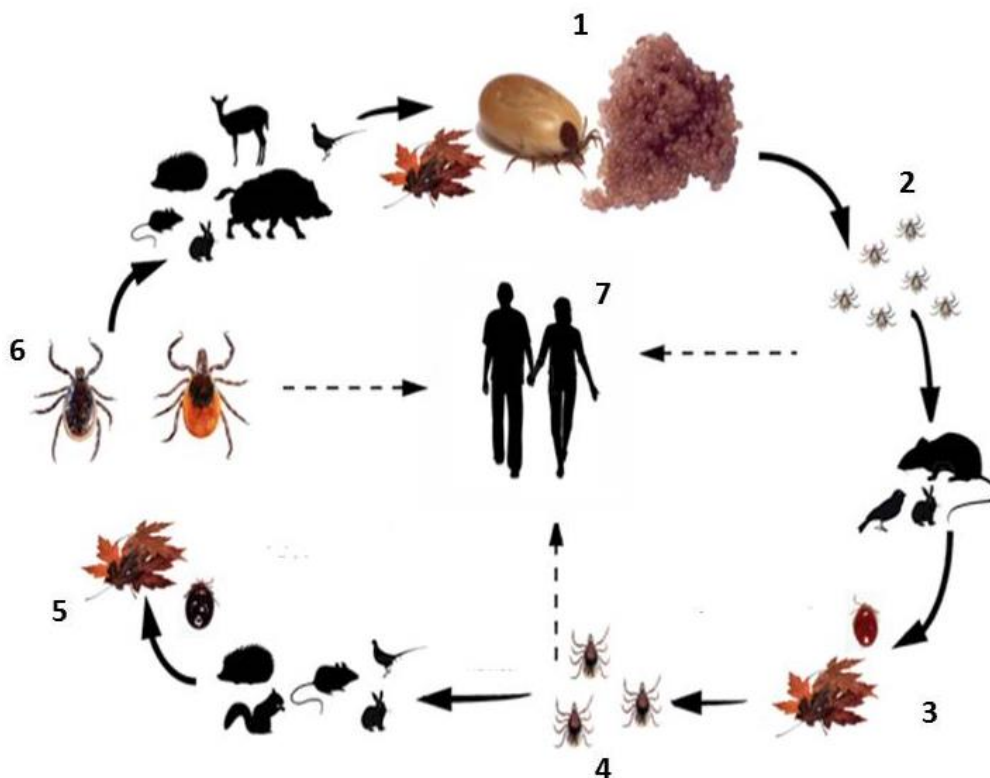


mikroorganizama kojima su krpelji vektori i rezervoari upravo u pljuvačnim žlezdama obavljaju završne faze razvića i putem pljuvačke inficiraju domaćina (Binnington & Kemp, 1980).

#### 2.1.2.2 Životni ciklus krpelja

Poznavanje životnog ciklusa određenih vrsta krpelja je prvi korak ka razumevanju i rasvetljavanju njihove uloge u epizootologiji i epidemiologiji patogenih uzročnika kojima su vektori i rezervoari. Najveći značaj u širenju i održavanju uzročnika oboljenja u humanoj i veterinarskoj medicini imaju krpelji iz familije Ixodidae zbog toga što tvrde krpelji duži vremenski period ostaju zakačeni na domaćinu hraneći se krvlju i činjenice da se kod većeg broja vrsta svaki od razvojnih stadijuma hrani na drugom domaćinu (Milutinović i sar., 2012). Razvojni stadijumi krpelja tokom razvića su: larva, nimfa i adult. Sa određenim izuzecima (npr. mužjaci roda *Ixodes*), svi navedeni stadijumi se hrane krvlju domaćina (Sonenshine & Roe, 2014). U zavisnosti od toga da li se svi razvojni stadijumi hrane na istom domaćinu ili se pojedini stadijumi hrane na različitim domaćinima, razlikujemo jednodomaćinske, dvodomaćinske, trodomaćinske i krpelje sa višedomaćinskim životnim ciklusom (Milutinović i sar., 2012). Broj različitih domaćina koje ista vrsta krpelja može da parazitira je u korelaciji sa epizootiološko-epidemiološkim značajem jer se time povećava i mogućnost za transmisiju većeg broja različitih patogena kako među različitim životinjskim vrstama, tako i sa životinja na ljude (Jongejan & Uilenberg, 2004). U Evropi, najširu distribuciju ima iksodidna vrsta krpelja *I. ricinus* za koju se vezuje trodomaćinski životni ciklus koji u regionima sa umerenom klimom traje oko tri godine (Slika 5.). Larve i nimfe ove vrste obično parazitiraju na gušterima i sitnim glodarima, dok adulti za domaćine biraju krupnije domaće i divlje sisare i ptice. Larve se hrane na domaćinu od dva do tri dana, a nimfe od četiri do šesta dana (Milutinović i sar., 2012). Mužjaci ove vrste najčešće ne uzimaju krvni obrok, i otpočinjanje spermatogeneze nije uslovljeno prethodnim hranjenjem, kao kod nekih drugih vrsta krpelja (Sonenshine & Roe, 2014). Parenje je moguće za vreme slobodnoživećeg perioda razvoja ali i na samom

domaćinu. Ženke mogu da se pare i sa nekoliko mužjaka pre samog krvnog obroka koji je neophodan za početak oogeneze. Period hranjenja ženki na domaćinu traje od sedam do devet dana, zatim se otkaače sa kože domaćina, polože oko 2000 jaja na tlu i potom uginu (Milutinović i sar., 2012).



**Slika 5.** Razvojni ciklus *Ixodes ricinus* (prema: <https://www.tick.kit.edu/english/94.php>, autor: Dr Nina Littwin) **1-** Ženka po uzimanju krvnog obroka polaže jaja na tlu, **2-** larve izležene iz jaja traže prvog domaćina, **3-** Kada završe sa uzimanjem krvnog obroka nasisane larve napuštaju prvog domaćina i na tlu se presvlače u nimfe. **4-** slobodnoživeće nimfe zatim traže drugog domaćina, **5-** Nakon kompletiranja krvnog obroka na drugom domaćinu, nasisane nimfe se na tlu presvlače u adulte, **6-** Mužjaci i ženke sada traže trećeg domaćina na kome se pare (paranje je moguće i van domaćina) a ženke uzimaju i krvni obrok čime se ciklus zatvara. **7-** Infestacija ljudi krpeljima vrste *Ixodes ricinus* moguća je svim razvojnim stadijumima (larve, nimfe, adulti).

Dužina trajanja embrionalnog razvića značajno varira i u direktnoj je vezi sa klimatskim faktorima sredine u kojoj su poležena jaja te zbog postojanja fenomena dijapauze

(odlaganje procesa razvića), može da traje do 400 dana. U povoljnim uslovima sredine embrionalno razviće je skraćeno na 25 dana (Milutinović i sar., 2012).

### 2.1.2.3 Epizootiološko-epidemiološki značaj krpelja

Krpelji predstavljaju važne vektore bakterijskih, protozoarnih i virusnih patogena, te posmatrano sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta predstavljaju sponu između patogena koji kruže u populaciji divljih, domaćih životinja i ljudi. Jongejan i Uilenberg (2004) ukazuju da oko 10% do danas opisanih vrsta krpelja predstavljaju rezervoare i vektore uzročnika zaraznih bolesti ljudi i životinja. Takođe, poznato je više od 30 vrsta krpelja koji parazitiraju na ljudima. Krpelji kao hematofagni ektoparaziti životinja i ljudi relativno dugo ostaju na svojim domaćinima te tako svojim direktnim uticajem mogu da dovedu do mehaničkih lezija kože (ponekad praćenih sekundarnim infekcijama) i anemije, a usled ubrizgavanja toksičnih komponenti pljuvačke u krvotok domaćina do intoksikacije i najvažnijeg fenomena koji tom prilikom može da se javi: krpeljske paralize (*eng.* „tick paralysis“) (Milutinović i sar., 2012). Nemaju sve vrste krpelja potencijal da izazovu paralizu, tačnije za manje od osam procenata svih do sada opisanih krpelja (oko 900 vrsta) je dokazano da mogu izazvati paralizu domaćina na kojima se hrane, dok manje od jedan posto svih krpelja izaziva paralize od značaja sa aspekta humane i veterinarske medicine (Pienaar et al., 2018).

Pored direktnog štetnog delovanja, krpelji imaju daleko veći značaj kao vektori i rezervoari patogenih mikroorganizama (virusa, bakterija, rikecija, protozoa) koji su uzročnici oboljenja ljudi i životinja a među kojima je i veliki broj zoonoza (Jongejan & Uilenberg, 2004). Način transmisije infektivnog agensa vektorima može biti mehanički ili biološki. Mehaničko prenošenje podrazumeva da se patogen u vektoru ne multiplifikuje niti obavlja neku od svojih faza razvoja. Za krpelje je svojstveno da su oni u najvećem broju slučajeva biološki vektori patogenima koje prenose pri čemu infektivni agens može

a i ne mora da se multiplikuje u vektoru ali svakako prolazi kroz određene biološke transformacije. Vrsta krpelja koja je označena kao vektor određenog infektivnog agensa mora da bude u mogućnosti da prilikom uzimanja krvnog obroka na inficiranom domaćinu unese datog patogena a potom da istog patogena održi kroz jedan ili više razvojnih stadijuma i konačno prenese infektivni agens drugom domaćinu prilikom uzimanja krvnog obroka (de la Fuente, 2008). Ciklus kruženja patogena na relaciji vektor-domaćin se prekida u slučajevima kada se prenošenje izvrši na tzv. „slučajne“ domaćine (čovjek i neke životinje) i vektor koji se hrani na takvim domaćinima ne može više krvlju da unese infektivnog agensa kojim su slučajni domaćini inficirani (Milutinović i sar., 2012).

Veći broj uzročnika zoonoza koje prenose krpelji izazivaju prirodno žarišne infekcije koje se karakterišu endemskim pojavljivanjem i sezonskim karakterom. Izučavanje enzootskih transmisionih ciklusa koje se ogleda u poznavanju primarnih žarišta, identifikaciji infektivnih agensa, njihovih artropodnih vektora i domaćina rezervoara, od krucijalnog je značaja u epizootologiji i epidemiologiji oboljenja čiji se uzročnici prenose vektorima (Valčić, 1998). Incidencija oboljenja čiji se uzročnici prenose krpeljima se poslednjih decenija povećava na svetskom nivou. Jedan od glavnih razloga za ovakav trend su globalne klimatske promene koje uslovljavaju i širenje areala vektora (Estrada-Peña et al., 2012; Gray et al., 2009). Naša zemlja je endemsko područje za veći broj oboljenja čije uzročnike prenose krpelji (babezioza, lajmska bolest, humana granulocitna anaplazmoza, tularemija, Q groznica, rikecioze i dr.) (Milutinović i sar., 2012). Autohtoni slučajevi ovih bolesti se kontinuirano ili periodično registruju, ali se smatra da je stvarna epidemiološka i epizootiološka situacija potcenjena. Iz svega navedenog proizilazi potreba za daljim epizootiološko epidemiološkim studijama koje se bave izučavanjem enzootskih ciklusa zoonoznih patogena u čijem prenošenju učestvuju krpelji.

### 2.1.3 Flebotomine i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj

#### 2.1.3.1 Opšte karakteristike flebotomina

Flebotomine, poznate i pod nazivom peščane mušice, su sitne hematofagne artropode veličine od 2-3 mm. Svrstane su u red Diptera, podred Nematocera, familiju Psychodidae i podfamiliju Phlebotominae a do sada je opisano više od 800 vrsta. Još uvek postoje određene kontroverze i nejasnoće u pogledu taksonomske klasifikacije ovih artropoda. Po najšire prihvaćenoj klasifikaciji među današnjim taksonomima u Evropi, sve opisane vrste svrastavaju se u jedan od tri roda: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* i *Chinius* (Maroli et al., 2013). Za peščane mušice Novog sveta, većina entomologa i dalje koristi taksonomsku klasifikaciju Lewis-a i saradnika iz 1977. godine po kojoj su prepoznat tri roda: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* i *Warileya* (Lewis et al., 1977; Young & Duncan, 1994). Naziv „peščane mušice“ potiče od blede, pesku slične boje ovih insekata, mada boja tela varira među različitim vrstama od skoro crne pa do sasvim svetle, skoro beličaste boje. Za razliku od drugih vrsta Diptera za vreme mirovanja imaju karakteristično postavljena krila pod uglom od 45° u odnosu na abdomen, njihov let je nečujan, generalno su loši letači te retko prelaze više od jednog kilometra od mesta izleganja.

Flebotomine kao i krpelji, tokom svog razvoja prolaze potpunu metamorfozu kroz tri razvojna stadijuma: larva (četiri faze), lutka i adult. Nezreli razvojni stadijumi za razliku od komaraca ne zahtevaju stajaću vodu kako bi kompletirali svoj razvoj ali su im potrebna relativno vlažna i topla staništa (Claborn, 2010; Maroli et al., 2013). Flebotomine su široko rasprostranjene i njihovo prisustvo beleži se u toplim klimatskim zonama Azije, Afrike, Australije, južne Evrope i Amerike (Killick-Kendrick, 1999). Maksimalna aktivnost flebotomina u zemljama mediteranskog regiona je u toplom periodu godine, od juna do oktobra (Alten et al., 2016). Istraživanje sprovedeno u Maroku svedoči da je maksimalna aktivnost vrste *Phlebotomus papatasi* na temperaturi od 32–36 °C sa pikom aktivnosti tokom vlažnih meseci (maj i novembar), dok je smanjena aktivnost uočena na nižim (od

11–20 °C) i višim (od 37–40 °C) temperaturama od optimalne (Boussaa et al., 2005). Najveći broj vrsta je aktivan na otvorenom prostoru u periodu od sumraka do svitanja., Određen broj vrsta je u potrazi za domaćinima je aktivan i tokom dana kao i u zatvorenim prostorima.

### 2.1.3.2 Epizootiološko-epidemiološki značaj flebotomina

Flebotomine su prepoznate kao značajni vektori patogenih mikroorganizama važnih sa aspekta humane i veterinarske medicine. Najvažnija je njihova uloga kao vektora uzročnika lajšmanioze širom sveta. Pored toga, poznata je njihova uloga u transmisiji drugih patogena kao što su *Bartonella* spp. a imaju značajnu ulogu u prenošenju većeg broja virusnih patogena iz rodova: *Phlebovirus* (familija *Bunyaviridae*), *Vesiculovirus* (familija *Rhabdoviridae*) i roda *Orbivirus* (familija *Reoviridae*) koji cirkulišu između flebotomina i domaćina i u zemljama Mediterana. Na tlu Evrope virusi od posebnog medicinskog značaja koje prenose flebotomine su Toskana virus, Sicilijanski virus i papatačijeva groznica– Napuljski virus (Alkan et al., 2013; Depaquit et al., 2010). Prva pojava virusne groznice koju prenose flebotomine zabeležena je u Srbiji još 1947. godine (Karakashević, 1947), a papatačijeva groznica javljala se i tokom narednih godina u formi epidemija manjeg ili većeg intenziteta (Guelmino & Jevtić, 1955; Simić, 1951). Napuljski virus iz flebotomine *Phlebotomus perfiliewi* izolovan je prvi put 1982. godine u mestu Dobrič u jugoistočnoj Srbiji (Glišić et al., 1982). S obzirom na globalne klimatske promene i širenje areala vektora, evidentno je da će oboljenja koja prenose peščane mušice dobiti poseban značaj u mnogim zemljama Evrope. Bolesti čije uzročnike prenose flebotomine mogu se očekivati sa većom prevalencijom u regionima gde su se do sada javljale endemski a takođe, pojava ovih oboljenja moguća je i u zemljama gde do sada njihovo prisustvo nije bilo potvrđeno. U našoj zemlji dokazano je prisustvo više vrsta flebotomina (*P. papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. simici*, *P. sergenti* i *P. balcanicus*, *P. mascittii*)

a za većinu njih je potvrđen epizootičko-epidemiološki značaj (Vaselek et al., 2017; Živković, 1967).

#### 2.1.4 Epizootičko-epidemiološki aspekti babezioze, lajmske bolesti i anaplazmoze

Zajednička odlika ovih zoonoza jeste da su krpelji glavni vektori njihovih uzročnika. Pored toga, krpelji su prepoznati i kao glavni rezervoari uzročnika babezioze jer se u iksodidnim krpeljima obavlja seksualna faza razmnožavanja *Babesia* spp.

##### 2.1.4.1 Babezioza

Babezioza je široko rasprostranjena parazitska bolest domaćih, divljih sisara i čoveka, a posmatrano sa ekonomskog aspekta i stanovišta humane i veterinarske medicine spada u red izuzetno značajnih parazitoza. Uzročnici oboljenja su krpeljima prenosiive hemoprotozoe iz roda *Babesia*. Zvaničan opis uzročnika usledio je krajem 19. veka, kada rumunski lekar Viktor Babeš primećuje nepoznate mikroorganizme u eritrocitima goveda sa simptomima hemoglobinurije (Uilenberg, 2006). Smith i Kilborne 1893. godine u SAD opisuju uzročnika teksaške groznice i daju mu naziv *Pyrosoma bigeminum*, a takođe dokazuju da se uzročnik prenosi krpeljima, čime po prvi put potvrđuju ulogu artropoda kao vektora parazitskih protozoa (Smith & Kilborne, 1893). Iste godine, prethodno identifikovani mikroorganizmi će biti svrstani u rod *Babesia* (Starcovici, 1893). Nedugo zatim, 1895. godine, po prvi put opisana je infekcija pasa u Italiji sa protozoama roda *Babesia*, a uzročnik označen kao *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895), dok Koch 1904. godine opisuje prisustvo *B. caballi* u eritrocitima konja (Schnittger et al., 2012). Vrste roda *Babesia*, kao i blisko povezani rod *Theileria*, pripadaju redu Piroplasmida unutar razdela Apicomplexa. Na osnovu kruškolikog oblika parazita koji se umnožavaju u eritrocitima domaćina, rodovi *Babesia* i *Theileria* se zajedničkim imenom označavaju kao piroplazme

(Irwin, 2009). Takođe se pokazalo da je način prenošenja i postojanje ili odsustvo šizonata značajan fenotipski karakter za razlikovanje *Babesia* sensu stricto (s.s.) od *Theileria* (Uilenberg, 2006). Za *Babesia* s.s. je karakteristično odsustvo šizonata i postojanje transovarijalne transmisije, dok je za parazite iz roda *Theileria* svojstveno prisustvo šizonata i postojanje samo transstadijalnog prenošenja (Schnittger et al., 2012). Klasična taksonomija prepoznaje postojanje i treće grupe piroplazmi koja je označena kao *Babesia* sensu lato (s.l.) kojoj pripadaju sve piroplazme koje se ne mogu nedvosmisleno svrstati kao *Babesia* s.s. ili *Theileria* vrste. Na osnovu veličine piroplazme se mogu svrstati u dve grupe: tajlerije i „male“ babezije (*B. bovis*, *B. gibsoni*, *B. microti*,.. (<2,5-5  $\mu\text{m}$ )) i „velike“ babezije (*Babesia canis*, *B. bigemina*, *Babesia caballi*,.. (> 1-2,5  $\mu\text{m}$ )). Indetifikacija vrsta po ovom kriterijumu može biti otežana zbog razvojnih promena oblika i veličine parazita u eritrocitima kao i zbog prisutnog pleomorfizma istog parazita prilikom inficiranja različitih domaćina kičmenjaka (Homer et al., 2000). Ipak postoje izuzeci u odnosu na navedene kriterijume zbog čega se taksonomska klasifikacija zasnovana na ovim kriterijumima mora uzeti sa rezervom (npr. *B. gibsoni* i *B. divergens* su male veličine a pripadaju sensu stricto grupi babezija). Karakteristike kao što su specifičnost u odnosu na izbor domaćina beskičmenjaka i kičmenjaka su značajni sa aspekta epizootiološko-epidemioloških studija dok imaju ograničenu vrednost u pogledu određivanja vrste parazita. Iako je jedna vrsta krpelja obično glavni vektor određene vrste *Babesia* ili *Theileria*, prenosni kapacitet se obično proširuje na celi rod a ponekad i na više rodova krpelja (Uilenberg, 2006). Takođe, opisani su slučajevi da ista vrsta krpelja prenosi dve ili više različitih vrsta piroplazmi, npr. *Hyalomma a. anatolicum* može preneti *Babesia* sp. Xinjinang, *T. annulata* i *T. lestoquardi* (Guan et al., 2009; Mehlhorn et al., 1994). Jedan domaćin kičmenjak može takođe biti inficiran sa više različitih vrsta piroplazmi te ni specifičnost u odnosu na izbor domaćina kičmenjaka nije pouzdan taksonomski kriterijum. Neke vrste babezija imaju više domaćina (npr. *B. microti*) i dokazan je veći broj rezervoara i akcidentalnih infekcija za pojedine vrste što se objašnjava polifagijom krpelja kao vektora (Criado et al., 2006). Ilustrativan je primer za krpelje vrste *I. ricinus* koji mogu da se hrane na preko 300 vrsta kičmenjaka (Honig et al., 2017).



Pouzdana identifikacija i klasifikacija parazita zasnovana na tradicionalnim metodama posebno je problematična kod domaćina divljih kičmenjaka, jer opis vrste nije dovoljan za njihovu tačnu identifikaciju (Penzhorn, 2006). Ovo je postalo evidentno upotrebom molekularnih metoda kada je potvrđeno postojanje više vrsta parazita u istom domaćinu koje često nije moguće razlikovati mikroskopskim pregledom (Jinnai et al., 2010; Oosthuizen et al., 2009). Pre ere molekularnih metoda bilo je opisano oko 111 vrsta *Babesia* i oko 39 vrsta *Theileria*. Ova tradicionalna taksonomska klasifikacija zasnivala se gotovo u potpunosti na biološkim i morfološkim karakteristikama (Schnittger et al., 2012). Molekularna taksonomija piroplazmi zasniva se na varijabilnosti 18S rRNK gena sa ciljem da se na osnovu tog molekularnog markera determinišu vrste, identifikuju simultane infekcije domaćina sa više vrsta piroplazmi i da se da evolutivni okvir za taksonomsku klasifikaciju i uporednu analizu različitih vrsta (Lack et al., 2012).

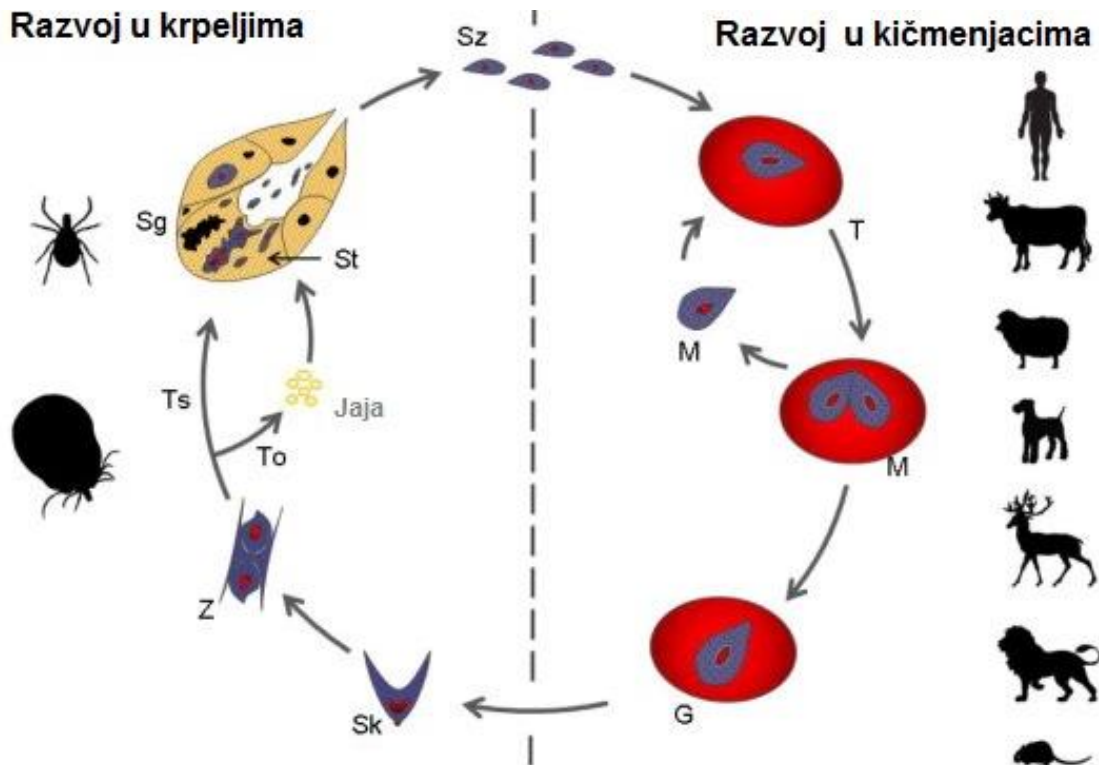
Za babezije je svojstven indirektan razvojni ciklus prisutan i kod ostalih parazitskih protozoa. Ixodidni krpelji predstavljaju prave domaćine dok su prelazni domaćini razne vrste kičmenjaka. Razvojni ciklus se sastoji iz tri sukcesivne faze: 1. **Merogonije**, aseksualne deobe u domaćinima kičmenjacima, 2. **Gametogonije**, seksualne reprodukcije koju karakteriše formiranje i fuzionisanje gameta u epitelnim ćelijama creva iksodidnih krpelja i 3. **Sporogonije**, aseksualne deobe u pljuvačnim žlezdama krpelja pri čemu dolazi do formiranja sporozoita koji po sazrevanju predstavljaju infektivni oblik za domaćine kičmenjake u čiji krvotok dospevaju sa pljuvačkom krpelja prilikom uzimanja krvnog obroka (Jalovecka et al., 2018).

Sve do danas poznate vrste babezija prenose pljuvačkom artropodni vektori, tj. odgovarajuće vrste krpelja tokom hranjenja na domaćinu kičmenjaku. Sporozoiti dospevši tom prilikom u krvotok direktno inficiraju eritrocite domaćina. Sporozoiti se u eritrocitima razvijaju u trofozoite. Deljenjem parazita formiraju se dve a ponekad četiri ćerke ćelije (merozoiti) koje zatim nakon eritrolize napadaju nove eritrocite. Ovo je i osnova patogeneze babezioze sa posledičnim nagomilavanjem toksičnih materija, anoksijom, i degenerativnim promenama epitela manjih krvnih sudova. Dalje

umnožavanje parazita nastavlja se do momenta u kome imuni sistem domaćina onemogućuje dalju multiplikaciju ili progresivno umnožavanje dovede do smrti domaćina (Jalovecka et al., 2018).

*Babesia* spp. ne formiraju pigmentne depozite u parazitiranim eritrocitima čime se razlikuju od vrsta iz drugih rodova protozoa kao što su *Plasmodium* i *Haemoproteus*. Izgleda da babezije metabolišu hemoglobin u dovoljnoj meri te ne dolazi do formiranja rezidualnih nakupina. Takođe, životni ciklus i kod domaćina kičmenjaka i u krpeljima zbog izostanka formiranja pigmenta je karakteristika po kojoj mogu da se razlikuju od drugih hemoprotozoa (Uilenberg, 2006).

Krpelji se inficiraju ingestijom krvi domaćina u kojoj postoje infektivne forme parazita za krpelje- gametociti. U epitelnim ćelijama creva od gametocita se formiraju muški i ženski gameti. Zatim dolazi do spajanja mikrogameta sa makrogametima pri čemu se formiraju pokretni zigoti koji se umnožavaju a potom dospevaju do raznih unutrašnjih organa krpelja uključujući i ovarijume. Na ovaj način dolazi do infekcije tkiva jajnika a posledično i jaja čime se paraziti prenose na sledeću generaciju krpelja (transovarijalna transmisija). Obično ženke krpelja bivaju inficirane na ovaj način a sporogonija se odvija u pljuvačnim žlezdama larvi, nimfi i/ili adulta sledeće generacije. Kada se krpelj zakači za kožu novog domaćina dolazi do sazrevanja sporozoita koji sa pljuvačkom krpelja dospevaju u krvotok domaćina. U slučaju *B. canis* sazrevanje sporozoita u krpeljima *D. reticulatus* traje 2-3 dana (Schein et al., 1979). Transstadijalna transmisija omogućuje pojedinim vrstama babezija da mogu perzistirati kroz nekoliko generacija krpelja bez nove infekcije (Mehlhorn & Schein, 1984). Kompletan razvojni ciklus *Babesia* spp. prikazan je na slici 6.



**Slika 6.** Razvojni ciklus *Babesia* spp. Sporozoit babezija (Sz) dospevaju u krvotok domaćina kičmenjaka sa pljuvačkom inficiranog krpelja prilikom uzimanja krvnog obroka. Nakon ulaska u eritrocite sporozoiti se diferenciraju u trofozoite (T), koji se dalje dele asexualnom deobom (merogonija) pri čemu nastaju dva a ponekad četiri merozoita (M). Nakon eritrolize oslobođeni merozoiti inficiraju nove eritrocite čime se nastavlja ciklus replikacije u domaćinu. Neki merozoiti prestaju da se dele i transformišu se u gamonte ili pregametocite (G). Gametogonija i sporogonija de odvijaju u krpeljima. Prilikom uzimanja krvnog obroka na inficiranom domaćinu krpelji unose gamonte koji se u epitelnim ćelijama creva diferenciraju u gamete, poznate i kao cilijarna tela (Strahlenkörper (Sk)), koji se međusobno spajaju formirajući diploidne zigote (Z, gametogonija).

Zigoti prolaze kroz mejozu što rezultira nastankom pokretnih haploidnih kineta koji se umnožavaju asexualnom deobom (sporogonija) i dospevaju u hemolimfu krpelja kojom bivaju diseminovani po unutrašnjim organima uključujući i pljuvačne žlezde (Sg) u kojima nastavljaju da se dele. U tkivima unutrašnjih organa se odvija završni ciklus diferencijacije i multiplikacije pri čemu se kineti transformišu u sporozoite koji će inficirati domaćina kičmenjaka pošto se krpelji presvuku u naredni razvojni stadijum npr. larve u nimfe ili nimfe u adulte (transstadijalni prenos Ts) Prema: (Schnittger et al., 2012)

Babesioza je danas oboljenje od najvećeg značaja kod pasa a njen epizootiološki značaj prepoznat je u zemljama širom sveta (Solano-Gallego et al., 2016). Babesioza pasa se dovodi u vezu sa više vrsta u okviru roda *Babesia*, koje se tradicionalno na osnovu morfoloških karakteristika dele na „velike babezije“ (2.5-5.0  $\mu\text{m}$ ) kojima pripadaju *B. canis*, *B. rosii*, *B. vogeli*, i „male babezije“ (1.0-2.5  $\mu\text{m}$ ) sa predstavnicima: *B. gibsoni*, *B. conradae*, *B. microti*-like (Bilić et al., 2018). Velikim babezijama pripada i još uvek neimenovana *Babesia* sp. (Coco), srodna sa *B. bigemina*, koja je potvrđena kod pasa obolelih od babesioze u SAD (Birkenheuer et al., 2004). Za malu piroplazmu, *Babesia microti*-like ne postoji validan opis u skladu sa međunarodnim kodeksom za zoološku nomenklaturu (Harris, 2016) zbog čega u naučnoj literaturi postoji više sinonima za ovu vrstu: poznata je pod nazivima: *Theileria annae*, *Babesia* "Spanish dog isolate", *Babesia annae*, *Babesia* cf. *microti*, i pod poslednje predloženim nazivom: *Babesia vulpes* sp. nov. (Baneth et al., 2015). Blisko je povezana sa *B. microti*, parazitom malih glodara, a prvi put je otkrivena kao uzročnik babesioze pasa u Španiji (García, 2006; Miró et al., 2015). Skorašnji nalaz *B. caballi* kod psa obolelog od babesioze u Hrvatskoj navode na zaključak da i neke druge piroplazme mogu biti odgovorne za nastanak bolesti osim do sada opisanih vrsta (Beck et al., 2009). Sve do sada poznate vrste babezija prenose krpelji i u slučaju babesioze pasa postoji bliska veza između različitih vrsta babezija i određenih vrsta krpelja. Pojava bolesti je korelaciji sa sezonskom aktivnošću krpelja te se najveći broj oboleli pasa javlja tokom proleća i jeseni. Poslednjih decenija primetne su značajne promene u dinamici širenja babesioze pasa u Evropi što se dovodi u vezu sa globalnim klimatskim promenama, antropogenim uticajem na životnu sredinu, širenjem areala i povećavanjem broja jedinki u populacijama divljih životinja te širenjem areala vektora divljim pticama i životinjama (Solano-Gallego et al., 2016). Godišnji sezonski obrazac pojave babesioze u skladu je sa lokalnim klimatskim faktorima, a relativno blago i vlažno vreme tokom proleća i jeseni pogoduje razvoju i održavanju krpelja a time i pojavi bolesti. Tokom suvih leta babesioza se retko javlja za razliku od kišnih leta i blagih zima (Leschnik et al., 2008). Geografska distribucija *Babesia* spp. je jako varijabilna u različitim delovima Evrope i direktno zavisi od prisustva kompetentnih vrsta krpelja kao vektora i

prijemčivih domaćina kičmenjaka, što pored uticaja drugih faktora objašnjava i velike varijacije u prijavljenim prevalencijama infekcije sa različitim *Babesia* spp. kod pasa u različitim zemljama Evrope (Matijatko et al., 2012). Pojava babezioze pasa je u korelaciji sa njihovim načinom života te tako životinje koje imaju veću mogućnost da dođu u kontakt sa vektorima krpeljima imaju veće šanse da obole od babezioze (npr. lovački psi znatno češće oboljevaju od pasa kućnih ljubimaca) (Adaszek et al., 2011; Imre et al., 2013). Najčešći uzročnik babezioze pasa u Evropi je *B. canis*, a njeno prisustvo u mnogim evropskim zemljama u vezi je se širokom geografsku distribucijom *D. reticulatus* glavnog vektora ove piroplazme, dok se babezioza pasa izazvana ovim uzročnikom van Evropskog kontinenta javlja sporadično (Földvári et al., 2016; Matijatko et al., 2012). Visoka prilagodljivost ove vrste poslednjih decenija dovela je do širenja i pojave *D. reticulatus* u mnogim zemljama i regionima Evrope. Krpelje vrste *D. reticulatus* idealnim vektorima čini nekoliko karakteristika od kojih su najvažnije visoka stopa fertiliteta, prilagodljivost različitim uslovima staništa i mogućnost parazitiranja na velikom broju domaćina. Oplođena ženka *D. reticulatus* polaže i do 7.200 jaja (Šimo et al., 2004). Sposobnost preživljavanja u različitim uslovima sredine se može ilustrovati činjenicama da pod vodom koja sadrži ostatke organskih materija prežive i do 30 dana a u hladnim i čistim vodama čak više od 100 dana (Honzakova, 1970), bez uzimanja krvnog obroka opstaju i četiri godine, dok su laboratorijska ispitivanja pokazala da na temperature od -10 °C prežive i 150 dana. Dokazana je aktivnost ove vrste tokom zime u mnogim klimatskim zonama na temperaturama koje zaustavljaju aktivnost krpelja vrste *I. ricinus* (Földvári et al., 2016). *D. reticulatus* parazitira na preko 60 vrsta sisara. Larve i nimfe su endofilne i hrane se predominantno na malim divljim glodarima, a adulti na različitim domaćim (psi, konji, magarci, goveda, bivoli, ovce, koze, svinje) i divljim životinjama (jeleni, divlje svinje, lisice, zlatni šakali, vukovi, ježevi, kunići i zečevi) (Földvári et al., 2016). Ljudi takođe mogu biti povremeni domaćini za adulte *D. reticulatus* što sa epidemiološkog aspekta predstavlja rizik za prenošenje određenih patogenih uzročnika kojima su ovi krpelji vektori i rezervoari (Estrada-Peña & Jongejan, 1999). Adultni stadijumi su najaktivniji zimi, uz povećanu aktivnost od oktobra do marta ako

temperature nisu suviše niske. Preferiraju staništa kao što su vlažne mešovite šume, rubni delovi staza koji prolaze kroz otvorene terene ili pašnjaci u blizini šuma (Karbowski, 2014). Kod adultnih krpelja *D. reticulatus* sakupljenih sa vegetacije, molekularnim metodama su detektovane različite prevalencije *B. canis*: od 0 % u Nemačkoj i Belorusiji (Reye et al., 2013; Schreiber et al., 2014), 0.7 % u istočnoj Poljskoj, 1.64 % u Holandiji (Jongejan et al., 2015), 2.3 % u jugo-zapadnoj Slovačkoj (Kubelová et al., 2011), 3.41 % u Ukrajini (Karbowski et al., 2014), 4.18 % u Poljskoj (Mierzejewska et al., 2015), pa do 14.7 % u istočnoj Slovačkoj (Kubelová et al., 2011) i 14.8 % u južnoj Poljskoj (Mierzejewska et al., 2015). Seroprevalencija na *B. canis* koda pasa u Evropi takođe pokazuje širok dijapazon. U Italiji registrovana je seroprevalencija od 0,8% do 17% (Trotz-William & Trees, 2003), 5.7% u Mađarskoj (Hornok et al., 2006), 7.3% i 13% u Albaniji (Hamel et al., 2009), 14,1% u Francuskoj (Cabannes et al., 2002), 19.8% u zapadnoj Rumuniji (Imre et al., 2013), u Hrvatskoj 20.0% (Mrljak et al., 2017) a u Srbiji 26.17% i 51.4 % (Kovačević Filipović et al., 2018; Potkonjak et al., 2015a). Najveća do sada zabeležena seroprevalencija kod pasa na antigene *B. canis* zabeležena je u regionu centralne Italije i kretala se od 52-57% (Cassini et al., 2009). Takođe, u više različitih zemalja je vršena detekcija prisustva *B. canis* molekularnim metodama a prevalencije su se kretale od 2.3% u Italiji (Cassini et al., 2009), , 4.6% u Sloveniji (Duha et al., 2004), 13.5 % u Srbiji (Kovačević Filipović et al., 2018), 25.3% u Poljskoj (Welc-Falęciak et al., 2009), 44.8% u Rumuniji (Hamel et al., 2012). U istraživanju sprovedenom u Hrvatskoj DNK *B. canis* detektovana je kod 2.4% pasa koji nisu imali simptome karakteristične za babeziozu, dok je od 96 pasa sa simptomima bebezioze njih 96.3% bilo pozitivno na prisustvo DNK *B. canis* (Beck et al., 2009). Među klinički obolelim psima u Srbiji testiranim na prisustvo DNK *Babesia* spp. takođe je dominantno potvrđeno prisustvo *B. canis* (58/60, 96.7%) (Davitkov et al., 2015).

*B. vogeli* je druga po epizootiološkom značaju piroplazma kod pasa u Evropi. Infekcija pasa sa *B. vogeli* može biti subklinička ali takođe su opisani slučajevi obolelih pasa sa teškom kliničkom slikom (Baneth, 2018). Raširena je u celom svetu (Irwin, 2009) a *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (kompleks srodnih vrsta koje je teško ili nemoguće

razlikovati na osnovu morfoloških karakteristika) su prepoznati kao vektori (Dantas-Torres & Otranto, 2015). Prisustvo *B. vogeli* potvrđeno je u Aziji (Inokuma et al., 2004), Turskoj (Gülanber et al., 2006), Africi (Bouattour, 2008; Matjila et al., 2004), Severnoj i Južnoj Americi (Birkenheuer et al., 2003; Maria et al., 2005) i Australiji (Jefferies et al., 2003a). U Evropi, prisustvo DNK *B. vogeli* dokazano je u Španiji (Criado-Fornelio et al., 2007), Portugalu (Cardoso et al., 2008), Francuskoj (Criado-Fornelio et al., 2009), Sloveniji (Duha et al., 2004), Srbiji (Gabrielli et al., 2015), Albaniji (Hamel et al., 2009), Hrvatskoj (Beck et al., 2009), centralnoj i južnoj Italiji (Solano-Gallego et al., 2008). Prevalencija se kretala od 0.01% u Španiji, 0.2% u Hrvatskoj, 0.7% u u Francuskoj, 1.3% u Sloveniji, 1.9% u Srbiji do 16,3% u Italiji. *R. sanguineus* s.l. je prisutan u području Mediterana, pogoduje mu klima sa prosečnim višim temperaturama u odnosu na *D. reticulatus* ali i endofilni način života omogućava mu prisustvo u hladnijim regionima centralne Evrope. Prisutnost krpelja *R. sanguineus* s.l. kod pasa u hladnijim regionima može se objasniti uvozom krpeljima infestiranih pasa sa područja Mediterana (Solano-Gallego et al., 2016). Još uvek ne postoje kompletni podaci o arealu *R. sanguineus* s.l. kompleksa jer ne postoji konsenzus oko morfoloških kriterijuma za pouzdanu identifikaciju a mogućnost da ovi krpelji preživljavaju u zatvorenim prostorijama dodatno komplikuje određivanje rasprostranjenja u prirodi (Gray et al., 2013; Nava et al., 2015). Međutim, poznato je da je donji temperaturni limiti 14 °C a gornji 35 °C, te ispod i iznad navedenih graničnih vrednosti razvoj *R. sanguineus* prestaje i krpelji ulaze u hibernaciju (Gray et al., 2013). *B. rossi*, velika babezija, jedna od najpatogeniji vrsta roda *Babesia* i nije od epizootiološkog značaja u Evropi. Endemski se javlja u Severnoj Africi dok je njeno prisustvo potvrđeno i u Istočnoj Africi (Matjila et al., 2004; Oyamada et al., 2005).

*B. gibsoni* je sa epizootiološkog aspekta najvažnija mala babezija kao uzročnik babezioze pasa u svetu. Klinički slučajevi pasa obolelih od babezioze izazvane ovim uzročnikom u Evropi zabeleženi su u Španiji (Criado-Fornelio et al., 2003), Nemačkoj (Hartelt et al., 2007), Italiji (Trotta et al., 2009), Hrvatskoj (Beck et al., 2009), i Srbiji (Davitkov et al., 2015) a klinički slučajevi opisani su i u ostalim delovima sveta: Australiji, Aziji, SAD i Brazilu

(Jefferies et al., 2003; Trapp et al., 2006; Zahler et al., 2000). Vektori *B. gibsoni* nisu dokazani. Krpelji kompleksa *R. sanguineus* su verovatno glavni vektori za *B. gibsoni* u Evropi, dok su *Haemaphysalis longicornis* i *H. bispinosa* označeni kao glavni potencijalni vektori *B. gibsoni* u Aziji (Baneth, 2018; Iwakami et al., 2014; Solano-Gallego et al., 2016). Pored prenošenja krpeljima za *B. gibsoni* je dokazana vertikalna transmisija sa majke na plod i mogućnost direktne infekcije posredstvom inficirane krvi tokom borbe pasa ili transfuzijom (Birkenheuer et al., 2005). Prisustvo *B. microti*-like kod pasa u Evropi potvrđeno je u nekoliko zemalja: Portugalu (Simões et al., 2011), Španiji (Camacho et al., 2001), Francuskoj (René-Martellet et al., 2015b), Hrvatskoj (Beck et al., 2009), Srbiji (Gabrielli et al., 2015) i Švedskoj (Falkenö et al., 2013). Epidemiološke studije ukazuju da su *Ixodes hexagonus*, *I. canisuga*, *I. ricinus* i *D. reticulatus* kandidati vektori za *B. microti*-like (Najm et al., 2014). Detalji životnog ciklusa *B. microti*-like su u velikoj meri i dalje nepoznati. *B. conradae* je mala babezija do sada potvrđena jedino u SAD. Filogenetske analizesekvenci 18S rRNK i ITS-2 gena, pokazale su njenu veću srodnost sa piroplazmama izolovanim iz divljih životinja i ljudi u zapadnoj Americi nego sa *B. gibsoni* (Kjemtrup et al., 2006; Kjemtrup & Conrad, 2006). Pretpostavlja se da su vektori ove babezije krpelji *R. sanguineus* kompleksa (Bilić et al., 2018).

Divlje kanide i domaći psi su često inficirani sa istim vrstama babezija i posmatrano sa evolutivnog stanovišta data je hipoteza po kojoj se ovi protozojski patogeni prenose sa divljih na domaće kanide koje su međusobno srodne (Penzhorn, 2011). Zbog toga je verovatno da različite *Babesia* spp. cirkulišu između domaćih i divljih kanida koje žive na istom geografskom području (Margalit Levi et al., 2018). Povećavanjem interakcija između domaćih i divljih životinja postoji realan rizik za pojavu infektivnih agenasa koji cirkulišu u silvatičnom ciklusu u populaciji domaćih životinja pa tako i pojavu babezioze pasa izazvane *Babesia* spp. za koje su divlje kanide rezervoari (Aguirre, 2016; Brickner, 2000; Otranto et al., 2015a). Način na koji *B. canis* cirkuliše u prirodi još uvek je dobrim delom nepoznat jer nisu poznate divlje životinje rezervoari. Studije o ulozi divljih kanida u epizootiologiji različitih vektorima prenosivih bolesti su poslednjih godina intezivirane



mada je još uvek dosta nepoznanica o njihovoj tačnoj ulozi kao vektora i rezervoara u širenju i održavanju vektorima prenosivih bolesti. Iz svega navedenog jasno je da postoji potrebna za daljim epizootiološko-epidemiološkim istraživanjima o ulozi divljih kanida u ciklusima vektorima prenosivih zoonoza a time i babezioze.

Babezioza kao emergentna zoonoza, poslednjih godina postaje predmet interesovanja naučnika širom sveta. Infekcija ljudi najčešće usledi posredstvom vektora, iksodidnih krpelja a veoma retko i transplacentarno, perinatalno ili putem transfuzije zaražene krvi (Kjemtrup & Conrad, 2000). Infekcija čoveka babezijama može dovesti do veoma ozbiljnog oboljenja praćenog sa simptomima povišene telesne temperature, anemijom, hiperbilirubinurijom, hemoglobinurijom i eventualnim otkazivanjem rada unutrašnjih organa (Homer et al., 2000). Babezioza čoveka prvi put je potvrđena u Evropi kada je opisana fatalna bolest 33 godine starog muškarca u bivšoj Jugoslaviji u Zagrebu (Skrabalo & Deanović, 1957). Mikroskopskim pregledom krvi i koštane srži uočene su forme koje su odgovarale *B. divergens*. Od tada se babezioza posmatra kao ne tako česta ali potencijalno životno opasna zoonoza. Od prvog nalaza do danas u Evropi je opisano oko 50 slučajeva oboljenja ljudi izazvano babezijama (Hildebrandt et al., 2013). Dve su vrste najčešći uzročnici babezioze čoveka: *B. divergens* u Evropi, koja primarno izaziva babeziozu goveda a glavni vektor je *I. ricinus* i *B. microti*, vrsta povezana sa glodarima, koja je glavni uzročnik humane babezioze u Severnoj Americi dok je glavni vektor *I. scapularis* (Hunfeld et al., 2008). Pored ova dva dobro poznata uzročnika, nekoliko drugih vrsta babezija je dovedeno u vezu sa babezozom čoveka: *B. duncani*, izolat CA1-CA4 (SAD), *B. venatorum* (*Babesia* sp. EU1) (Austrija, Italija, Nemačka), *B. divergens*-like (SAD, Portugal, Kanarska Ostrva), KO1 izolat (Koreja), (Gray et al., 2010; Hildebrandt et al., 2013). Najveći značaj sa aspekta javnog zdravlja i dalje ima babezioza ljudi u Severnoj Americi izazvana sa *B. microti* (Westblade et al., 2017).

Upotreba molekularnih metoda u epizootiološko-epidemiološkim studijama omogućila je tačnu identifikaciju vrste uzročnika babezioze životinja i ljudi što ranije zbog morfoloških sličnosti među različitim vrstama babezija mikroskopskim pregledom nije bilo moguće.

Molekularne metode ukazale su na manju specifičnost *Babesia* spp., u pogledu izbora vrste domaćina nego što se ranije mislilo. Ova saznanja ukazuju na mogućnost pojave do sada neidentifikovanih vrsta babezija kao uzročnika babezioze čoveka ali i drugih životinja (Hildebrandt et al., 2013). Važno je napomenuti da su mnoge činjenice koje se odnose na epidemiologiju i patogenezu uzročnika babezioze ljudi nepoznate ili nedovoljno razjašnjene. Vrlo je verovatno da je prava epidemiološka situacija potcenjena zbog još uvek nedovoljnog nivoa svesti o ovoj zoonози i nedostatka adekvatnih mikrobioloških metoda za detekciju ovih patogena. Pored toga, sve veći broja putovanja ljudi u područja gde se babezioza endemski javlja i stalno povećanje broja imunokompromitovanih ljudi, ukazuje na to da će učestalost humane babezoze u Evropi nastaviti da raste (Hildebrandt et al., 2013).

#### 2.1.4.2 Lajmska bolest

Lajmska bolest je prirodnožarišna, vektorska zoonoza koju izazivaju spirohete iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa. To su gram-negativne pokretne bakterije spiralnog oblika, čija je dužina od 10 do 30  $\mu\text{m}$  a prečnik od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  (Mannelli et al., 2012). Za prenošenje i održavanje uzročnika u prirodi odgovorni su iksodidni krpelji koji imaju ulogu vektora, i rezervoara. Bolest kod ljudi ima kosmopolitski karakter i prisutna je u regionima sveta sa umerenom klimom koja pogoduje razvoju vrsta krpelja koji igraju glavnu ulogu u transmisiji borelija (Pavlović, 2006). Prve zapise o pojavi crvenila koje se širi na koži pacijenata koje je dovedeno u vezu sa ubodom krpelja dao je švedski dermatolog Afzelius (Afzelius, 1921). Poseban klinički entitet, lajmska bolest postaje 1977. godine posle epidemije juvenilnog reumatoidnog artritisa kod dece u SAD, državi Konektikat, gradu Lajmu (Steele et al., 1975). Danas je lajmska bolest najčešće oboljenje ljudi u svetu koje se prenosi krpeljima i bolest je sa najvećom incidencijom među svim vektorima prenosivim oboljenjima čoveka u umerenom klimatskom pojasu (Stanek & Strle, 2018). Patognomonični nalaz za lajmsku bolest je pojava crvenila kože ovalnog oblika koje se širi

(*Erythema migrans*, EM) i ujedno je najčešći simptom prvog stadijuma oboljenja tj. rane lokalizovane infekcije. Ukoliko usledi hematogena i/ili limfogena diseminacija borelija po unutrašnjim organima (do nekoliko meseci od infekcije) dolazi do pojave znakova bolesti drugog stadijuma (simptomi slični gripu i patologije u zavisnosti od zahvaćenog organa). Ukoliko se održi perzistentna infekcija, bolest prelazi u hroničan tok (treći stadijum) i zahvata zglobove i nervno tkivo sa mogućim trajnim oštećenjem zahvaćenih organskih sistema (Stanek & Strle, 2018). Postoje dve glavne grupe u okviru roda *Borrelia*: grupa borelija u koju su svrstane vrste uzročnici povratnih groznica (*eng.* Relapsing Fever) i grupa vrsta povezanih sa lajmskom bolesti (*eng.* Lyme borreliosis), tj. kompleks vrsta *Borrelia burgdorferi* s.l.

*Borrelia* spp. koje pripadaju prvoj grupi se najčešće prenose krpeljima iz familije Argasidae ali i nekim iksodidnim krpeljima. Vrste borelije koje pripadaju drugoj grupi karakteriše isključivo prenošenje posredstvom nekoliko vrsta iz roda *Ixodes* (Estrada-peña et al., 2018). Nisu sve vrste u okviru *Borrelia burgdorferi* s.l kompleksa podjednako značajne sa epidemiološkog aspekta. U okviru ovog kompleksa opisano je najmanje 21 vrsta borelija koje su zastupljene širom sveta (Steere et al., 2016). Do sada potvrđeni uzročnici lajmske bolesti kod ljudi u Evropi su: *B. afzelii* (primarno degenerativna oštećenja kože), *B. garinii* (neurološke manifestacije), *B. bavariensis* i *B. burgdorferi* sensu stricto (artritis). Vrste *B. spielmanii*, *B. bissetii*, *B. valaisiana* i *B. lusitaniae*, identifikovane su kao patogeni samo u pojedinačnim slučajevima (Stanek et al., 2012; Stupica et al., 2015). Najčešći uzročnik lajmske bolesti kod ljudi u Severnoj Americi je *B. burgdorferi* s.s. Kao uzročnici u pojedinačnim slučajevima detektovane su i *B. bissetti*, *B. americana* i *B. andersonii* (Clark et al., 2013) i nedavno identifikovana *B. mayonii* (Pritt et al., 2016). Najveći broj prijavljenih slučajeva kod pacijenata u SAD i Evropi je u junu i julu, mesecima kada je aktivnost nimfi krpelja roda *Ixodes* najveća (Steere et al., 2016). Incidencija slučajeva lajmske bolesti u Evropi i Aziji varira u širokom rasponu, od niske i zanemarljive u Velikoj Britaniji, Turskoj i Japanu do preko 80 slučajeva na 100 000 stanovnika u Holandiji, Belgiji, Austriji, Sloveniji, Finskoj Estoniji i Litvaniji (Fülöp &

Poggensee, 2008; Schauman et al., 1989; Sykes & Makiello, 2017). I pored evidentnog prisustva oboljenja, postoji malo podataka o zastupljenosti lajmske bolesti u Aziji. U Severnoj Americi, preko 90% posto prijavljenih slučajeva je poreklom iz severoistočnog, srednjeg-Atlantskog i severnog-centralnog regiona (Kugeler et al., 2015). U Republici Srbiji prosečna incidencija lajmske bolesti u periodu od 2012. godine do 2016. godine iznosila je 9,9/100.000 stanovnika i bolest je sa najvećom incidencijom među svim vektorima prenosivim bolestima koje se javljaju u našoj zemlji. (Izveštaj Instituta za javno zdravlje Srbije „ Dr Milan Jovanović Batut“ za 2016. godinu).

Kada su u pitanju domaće životinje, lajmska bolesti je prepoznata kao poseban klinički entitet kod pasa i konja, dok mogućnost pojave oboljenja kod drugih domaćih životinja nije do kraja razjašnjena (Divers et al., 2018; Littman et al., 2018). Klinički sindromi koji se najčešće dovode u vezu sa lajmskom bolesti pasa su poliartritis i glomerulopatija (Littman et al., 2006), dok konji pokazuju znakove oboljenja centralnog nervnog sistema (neuroboreliozna), uveitis i nastanak kutanog pseudolimfoma (Divers et al., 2018). Značajno je napomenuti da je lajmska bolest kao poseban klinički entitet prepoznata kod pasa u SAD, dok kao takva nije potvrđena kod prirodno inficiranih pasa u Evropi (Thalhammer et al., 2010). Iako mačke mogu biti seropozitivne na borelije, do sada nije poznato da li je moguć nastanak bolesti (Littman et al., 2018). Domaćim a posebno divljim životinjama se veći značaj pridaje kao potencijalnim rezervoarima za uzročnike lajmske bolesti jer sprovedena serološka istraživanja pokazuju izloženost pojedinih vrsta životinja borelijama a odsustvo bilo kakvih kliničkih simptoma (Sala & Favari, 2016).

Iksodidni krpelji prilikom uzimanja krvnog obroka na inficiranom domaćinu rezervoaru unose i borelije koje ostaju vezane za zid epitelnih ćelija srednjeg creva krpelja do hranjenja sledećeg razvojnog stadijuma na domaćinu kičmenjaku (Šimo et al., 2017). Adultni krpelji predstavljaju krajnju instancu u prenosu borelija u krpeljima jer je transovarijalna transmisija jako retka (Mannelli et al., 2012; Rollend et al., 2013). Prilikom novog hranjenja na domaćinu kičmenjaku, unesene komponente krvnog obroka predstavljaju stimulus borelijama prisutnim u srednjem crevu krpelja za migraciju te one

posredstvom hemolimfe dolaze do pljuvačnih žlezda. Borelije pljuvačkom za vreme uzimanja krvnog obroka dospevaju u krvotok novog domaćina kičmenjaka (Stanek & Strle, 2018) Istraživanja su pokazala da krpelji zaraženi borelijama treba da provedu zakačeni za kožu pacijenata najčešće preko 12 časova kako bi preneli infekciju. Kod približno trećine pacijenata potrebno vreme za transmisiju je iznosilo preko 24 sata a kod najmanjeg broja pacijenata (14-18%) zabeležena je pojava EM iako su zakačeni krpelji sa njih skinuti u vremenskom okviru od 6h (Stanek & Kahl, 1999; Strle et al., 1996). Glavni vektori uzročnika lajmske bolesti u svetu su četiri vrste krpelja iz roda *Ixodes*: *I. scapularis* i *I. pacificus* u SAD dok je u Evropi glavni vektor *I. ricinus* pored koga u Evro-Azijskom delu kontinenta ulogu igra i *I. persulcatus* koji je glavni vektor lajm borelioze na Azijskom kontinentu (Steere et al., 2016). Enzooski ciklus *B. burgdorferi* s.l. vrsta je veoma kompleksan i u mnogome zavisi od geografskog regiona.

*I. ricinus* u Evropi parazitira na preko 300 vrsta životinja uključujući male i velike sisare, ptice i reptile (Gern, 2014). Ptice predstavljaju važne rezervoare za *B. garinii* dok su sitni glodari (rodovi *Apodemus*, *Myodes*) značajni rezervoari za *B. afzelii*. Migratornim pticama se daje značaj i u pogledu širenja areala krpelja mehaničkim putem a time i indirektnim uticajem na epizootiološko-epidemiološku situaciju lajmske bolesti (Kjelland et al., 2010). Ostale divlje životinje za koje postoje saznanja da su uključene u enzooski ciklus kruženja i održavanja borelija u prirodi su lisice (*Vulpes vulpes*) (Dumitrache et al., 2015) i evropski jež (*Erinaceus europeus*) (Jahfari et al., 2017). Pretpostavlja da pored do sada poznatih životinja ulogu rezervoara igraju i neke druge vrste. Upravo zato budića istraživanja treba da rasvetle njihovu ulogu u epizootiologiji lajmske bolesti.

### 2.1.4.3 Anaplazmoza

Anaplazmoza je oboljenje ljudi i životinja u čijem prenošenju ulogu vektora imaju iksodidni krpelji. Uzročnici bolesti su različite vrste roda *Anaplasma*, koje pokazuju manji ili veći stepen specifičnosti u odnosu na izbor domaćina. Familija Anaplasmataceae (red Rickettsiales) obuhvata rodove *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* i *Wolbachia*. Njima pripadaju sitni, gram-negativni, vrlo često pleomorfni mikroorganizmi koji se nalaze obligatno intracelularno smešteni u citoplazmatskim vakuolama ćelija domaćina (eritrociti, retikuloendotelne ćelije, fagocitne ćelije iz koštane srži, endotlene ćelije i ćelije insekata, reproduktivni organi helminata i artropoda) bilo pojedinačno ili češće u kompaktnim inkluzijama nazvanim morulae (Dumler et al., 2001). Pojedine vrste u okviru rodova koji pripadaju familiji Anaplasmataceae su emergentni krpeljima prenosivi patogeni sa zoonoznim potencijalom i globalnom distribucijom. Rodu *Anaplasma* pripada *Anaplasma phagocytophilum*, zatim tri vrste koje isključivo inficiraju preživare *A. marginale*, *A. ovis*, *A. centrale*, kao i *A. bovis* i *A. platys* vrste infektivne za goveda i pse (Severo et al., 2015).

*A. phagocytophilum* je u Evropi još pre 70 godina prvi put identifikovana kao uzročnik krpeljske groznice domaćih preživara (Woldehiwet, 2010). Javlja se na severnoj hemisferi a vektori su tvrdi krpelji *I. ricinus* kompleksa. Glavni vektor ovog patogena u Aziji je *I. persulcatus*, u Evropi *I. ricinus*, u istočnom delu Severne Amerike *I. pacificus*, dok u zapadnom delu Severne Amerike ulogu vektora za *A. phagocytophilum* ima *I. scapularis* (Otranto et al., 2015a). Pored glavnih vrsta vektora, *A. phagocytophilum* je detektovana i kod više drugih vrsta roda *Ixodes* a takođe i kod nekih vrsta roda *Dermacentor* i *Haemaphysalis* kojima se ne pridaje epizootiološko-epidemiološki značaj (Stuen et al., 2013). Studije koje su se bavile ispitivanjem genetičke varijabilnosti sojeva *A. phagocytophilum* potvrdile su postojanje četiri posebna klastera od kojih su tri nađena samo kod papkara (dva klastera samo kod divljih papkara) i jedan klaster kome pripadaju sekvence *A. phagocytophilum* poreklom od pasa, mačaka, konja, ljudi ali i od papkara. Ovi nalazi ukazuju na veoma raznoliku ekologiju sojeva *A. phagocytophilum*,

varijacije u virulenciji kao i veliki dijapazon vrsta domaćina ovog intracelularnog agensa (Scharf et al., 2011; Stuen et al., 2013).

Epizootije anaplazmoze goveda su posledica infekcije sa *A. marginale*. *A. centrale* može da izazove umerenu anemiju ali su klinički manifestne infekcije veoma retke. *A. phagocytophilum* i *A. bovis* mogu inficirati goveda ali je infekcija inaparentna (Dreher et al., 2005; Hofmann-Lehmann et al., 2004) Fatalni slučajevi infekcije sa *A. phagocytophilum* zabeleženi su i kod ovaca, konja, jelena, pasa i ljudi. Klinički simptomi kod preživara su iznenadna visoka temperatura (>41°C) i pad u proizvodnji mleka, dok su simptomi kod konja i pasa često nejasni i nespecifični. Hronične infekcije do sada nisu prijavljene dok su perzistentne infekcije potvrđene kod više vrsta sisara (Woldehiwet, 2010).

Od 1997. godine kada je opisan prvi potvrđeni slučaj humane anaplazmoze u Sloveniji (Petrovec et al., 1997), tokom narednih godina slučajevi oboljenja ljudi uzrokovana *A. phagocytophilum* prijavljeni su i u Španiji, Holandiji, Italiji Norveškoj, Švedskoj, Poljskoj, Austriji, Hrvatskoj. Do sada je prijavljeno preko 70 slučajeva ljudi obolelih od humane granulocitne anaplazmoze (Stuen et al., 2013). Kod obolelih ljudi javljaju se simptomi slični gripu nakon dve do tri nedelje posle uboda krpelja.

Dve vrste roda *Anaplasma* su patogeni domaćih pasa: *A. phagocytophilum*, uzročnik granulocitne anaplazmoze i široko rasprostranjena *A. platys*, izazivač trombotične anaplazmoze pasa u Severnoj i Južnoj Americi, Australiji, Aziji i Africi. Geografska distribucija *A. platys* u Evropi dovodi se u vezu sa rasprostranjenjem glavnog potencijalnog vektora *R. sanguineus* s.l. krpelja, iako vektorski kapacitet ove vrste za *A. platys* do sada nije potvrđen (Dantas-torres et al., 2013).

*A. phagocytophilum* je detektovana u velikom broju Evropskih zemalja sa promenljivom prevalencijom u analiziranim krpeljima sakupljenim sa vegetacije. Prevalencija se u različitim studijama kretala od 0% do preko 30%. U Portugalu je ona iznosila od 0,3% do 6,9% (Carvalho et al., 2008; Richter & Matuschka, 2012), Španiji 3,7% do 20,5% (Portillo et al., 2011; Ruiz-fons et al., 2012), Italiji 1,5% do 24,4% (Capelli et al., 2012; Cinco et al.,

1997), Nemačkoj od 1,0% do 17,4% (Hartelt et al., 2004; Silaghi et al., 2012), Poljskoj 2,5% do 19,2% (Richter & Matuschka, 2012; Stańczak et al., 2002), Srbiji 1,9% do 13,9% (S Tomanović et al., 2010; Tomanović et al., 2013), odnosno do 33,9% u Bugarskoj (Christova et al., 2001).

Prisustvo DNK *A. phagocytophilum* dokazano je kod pasa u više Evropskih zemalja sa prevalencijom od 0,3% u Hrvatskoj (Huber et al., 2017) do 7,5% u Italiji (Alberti et al., 2005), dok su serološka ispitivanja kod pasa pokazala generalno veće vrednosti seroprevalencije, od 8,76% u centralnoj Italiji (Ebani et al., 2008), 9% u mešovitom uzorku od pasa iz Španije, Portugala i Italije (René-Martellet et al., 2015a), 26,1% u Srbiji (Kovačević Filipović et al., 2018) do preko 40% u Nemačkoj (Jensen et al., 2007). Malo je dostupnih podataka o prirodnim infekcijama pasa sa *A. platys* što se objašnjava subkliničkim formama bolesti uprkos promenama u vrednosti hematoloških parametara i aktivnosti serumskih enzima (Beugnet, 2013). Oskudni su podaci i o prevalencijama i značaju *A. platys* kod divljih kanida što može biti posledica ograničenog kliničkog značaja infekcije ovim patogenom kod pasa u Evropi ili zbog činjenice da većina studija koja se bavi ispitivanjem prevalencija krpeljima prenosivih patogena kod različitih domaćina jednostavno nisu uključivale detekciju *A. platys* (Otranto et al., 2015a).

Nasuprot tome, postoji veći broj istraživanja koja su se bavila prirodnim domaćinima rezervoarima za *A. phagocytophilum* u Evropi i svetu (Stuen et al., 2013a; Žele et al., 2012). Transovarijalni način transmisije do sada nikad nije potvrđen kod krpelja roda *Ixodes* koji su uključeni u prenošenje uzročnika anaplazmoze različitim domaćinima kičmenjacima. Verovatnu ulogu domaćina i rezervoara za *A. phagocytophilum* ima više vrsta sisara. Pored domaćih preživara (goveda, ovce, koze), konja, ptica i ljudi, *A. phagocytophilum* je detektovana kod više vrsta malih sisara (rodovi *Apodemus*, *Myodes*, *Microtus*,..) i nekoliko vrsta divljih preživara (jeleni, divokoze, mufloni,..) samo u Evropi (Stuen et al., 2013).



### 2.1.5 Epizootiološko-epidemiološki aspekti rikecioze, Kju groznice, tularemije, bartoneloze

Zajednička karakteristika uzročnika navedenih oboljenja je da u njihovom širenju i održavanju krpelji kao vektori mogu imati epizootiološko-epidemiološki značaj, mada to nije jedini način njihovog održavanja i širenja u prirodi. Radi mogućnosti primene određenih mera u svrhu prevencije oboljenja izazvanih ovim uzročnicima, neophodno je poznavanje svih elemenata enzootskog ciklusa tj. svih domaćina, vektora i rezervoara važnih sa epidemiološko-epizootiološkog aspekta.

#### 2.1.5.1 Rikecioza

Rikecioze su zoonozna oboljenja široko rasporstranjena u svetu, izazvane gram-negativnim, obligatno intracelularnim, aerobnim  $\alpha$ -proteobakterijama pripadnicima rodova *Rickettsia* i *Orientia* za čije prenošenje su odgovorni artropodni vektori (krpelji, vaši, buve, grinje) (Portillo et al., 2015). Postoji više podela u okviru roda *Rickettsia*, a najprihvaćenija je na grupu rikecija izazivača tačkaste groznice (eng. „spotted fever group“ SFG), i grupu uzročnika tifusa (eng. „typhus group“, TG). Uzročnici krpeljima prenosivih rikecioza pripadaju „SFG“ grupi i spadaju među najranije poznate vektorima prenosive zoonoze (Parola et al., 2013). Najvažniji vektori i verovatno glavni rezervoari rikecija u Južnoj, Zapadnoj i Centralnoj Evropi su krpelji *D. marginatus* i *D. reticulatus* (Raoult et al., 2002). Sitni glodari su domaćini većeg broja vrsta artropodnih vektora i predstavljaju najvažnije rezervoare rikecija koje izazivaju oboljenja ljudi i životinja (Han et al., 2015; Heglasová et al., 2018).

*Rickettsia conorii* subsp. *conorii* je glavni etiološki agens rikecioze prenošene krpeljima u Evropi i uzročnik je Mediteranske tačkaste groznice (MTG), a *Rhipicephalus sanguineus* s.l je označen kao glavni vektor i potencijalni rezervoar na području Mediterana. Poslednjih decenija, upotrebom molekularnih metoda u kliničkoj praksi potvrđena je i uloga drugih

vrsta rikecija koje se prenose krpeljima u nastanku oboljenja sa sličnom kliničkom slikom kao kod MTG (*Rickettsia helvetica* i *Rickettsia monacensis* koje prenose *I. ricinus* krpelji, *Rickettsia massiliae* kojoj su vektori krpelji *Rhipicephalus sanguineus* kompleksa, *Rickettsia aeschlimannii* koju prenose *Hyalomma* spp. krpelji). Klinička slika rikecioza čoveka izazvanih navedenim uzročnicima manifestuje se obično lokalizovanim nekrotičnim promenama na koži, eritemom i limfadenopatijom dok sistemski znakovi oboljenja poput povišene telesne temperature često izostaju. Iako geografski položaj Srbije i prisustvo vektora krpelja upućuje na postojanje rizika od pojave rikecioze u humanoj populaciji, postoji malo publikovanih naučnih radova koji se bave ovom problematikom, te je i svest veterinara i lekara o ovom oboljenju u našoj zemlji na niskom novu. Prva, i jedina objavljena serološka ispitivanja pacijenata u Srbiji pokazala su prisustvo specifičnih antitela na *R. conorii*, *R. akari* i *R. typhi* sa prevalencijama sličnim kao u zemljama u regionu (Samardžić et al., 2008). Istraživanja krpelja u našoj zemlji potvrdila su prisustvo *R. helvetica* (7.7%) i *R. monacensis* (15.4%) u *I. ricinus* krpeljima (Radulović et al., 2011). *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*, uzročnik Astrakanove groznice u istoimenoj regiji kod Kaspijskog mora, detektovana je i na Kosovu kod *R. sanguineus* s.l krpelja od kojih je jedan bio poreklom sa čoveka a preostali sa pasa (Fournier et al., 2003). Prava epizootiološko-epidemiološka situacija rikecioza u našoj zemlji nije poznata a na osnovu epidemiološke situacije u zemljama regiona sasvim sigurno i potcenjena (Parola et al., 2013).

Značaj *Rickettsia* spp. u patologiji kod domaćih pasa nije do kraja razjašnjen. Nedavna studija kod pasa u Italiji dovela je u vezu akutno febrilno stanje kod analiziranih pasa sa prisustvom *R. conorii* (Solano-gallego et al., 2015).

Studije o ulozi divljih kanida kao potencijalnih vektora i rezervoara za različite vrste rikecija u Evropi su oskudna, dok u našoj zemlji istraživanja tog tipa do sada nisu vršena. Rezultati nedavno sprovedenog istraživanja o ulozi lisica u epizootiologiji rikecioze u Italiji, ukazuju na izloženost lisica rikecijama iz grupe tačkastih groznica (seroprevalencija od 50.3%). PCR-om u *R. sanguineus* s.l krpeljima sakupljenim sa istih

životinja dokazano je prisustvo *R. massiliae*, *R. aeschlimannii* i *R. slovaca* (Ortuño et al., 2018). Kod *Rhipicephalus turanicus* krpelja sakupljenih sa lisica u Izraelu dokazano je prisustvo *R. massiliae* (Keysary et al., 2011) a kod *R. sanguineus* s.l krpelja porekloma sa šakala u Alžiru (Leulmi et al., 2016). Uloga divljih kanida u eko-epidemiologiji rikecija „SFG“ grupe ostaje nepoznata i zahteva dalja istraživanja u cilju rasvetljavanja njihovog značaja kao potencijalnih vektora i rezervoara ovih uzročnika.

#### 2.1.5.2 Kju groznica

Kju groznica (eng. Q Fever), je široko rasprostranjna bakterijska zoonoza za čiji nastanak je odgovorna *Coxiella burnetii*. To je mali, (0,2-0,4 µm x 0,4-1,0 µm) obligatno intracelularni kokobacili koji se po gramu boje negativno. Oboljenje ljudi uzrokovano ovim tada nepoznatim agensom prvi put je opisano u gradu Brizbejnu u Australiji kod radnika u klanici koji su dolazili u kontakt sa inficiranim životinjama i njihovm izlučevinama (Derrick, 1937). U približno isto vreme, istraživači iz SAD u Montani, izolovali su do tada nepoznatog infektivnog agensa sa zoonoznim potencijalom iz *D. andersoni* krpelja i uspešno dokazali vektorsku ulogu ove vrste u transmisiji patogena sličnog rikecijama laboratorijskim životinjama kao i transovarijalni i transstadijalni prenos kod krpelja (Davis et al., 1938). Kasnija istraživanja potvrditi će da se u oba slučaja radilo o istom mikroorganizmu koji je u čast istraživača Heralda Koksa i Frank Burneta, koji su ga nezavisno prvi put izolovali, dobio naziv *Coxiella burnetii* (Philip, 1948).

U Evropi, uzročnik je prvi put potvrđen tokom izbijanja epidemije u glavnom gradu Grčke, Atini 1943. godine. Tokom II svetskog rata, epidemije tzv. „balkanskog gripa“ su se javljale među nemačkim vojnicima stacioniranim na Balkanskom poluostrvu, a kao uzročnik ovog oboljenja sličnom gripu, potvrđena je *C. burnetii* (Caminopetros, 1948). Danas, kju groznica ima kosmopolitski karakter i pojava ovog oboljenja potvrđena je na svim kontinentima osim Antarktika. Epidemija najvećih razmera do sada u svetu

dogodila se u Holandiji, kada je od 2007. do 2010. godine po procenama obolelo preko 40.000 ljudi dok je 14 osoba smrtno stradalo. Kao glavni razlog izbijanja epidemije prepoznat je porast inteziteta uzgoja koza u ovoj zemlji koje su poslužile kao izvor infekcije za ljude (Speelman, 2007). U našoj zemlji, kju groznica se endemo-epidemijski održava na području Vojvodine, a sporadična pojava bolesti prisutna je u centralnoj Srbiji (Nedić et al., 2003).

Infekcija najčešće usledi aerogeno, inhalacijom kontaminiranog aerosola, a transmisija je moguća i direktanim kontaktom sa zaraženim životinjama i njihovim izlučevinama, ingestijom kontaminiranog nepasterizovanog mleka. Osim navedenog zabeleženi su i slučajevi oboljevanja nakon uboda zaraženog krpelja, transfuzije krvi i koitusa (Eldin et al., 2017).

Kod ljudi obolelih u akutnoj formi, pored povišene telesne temperature i ostalih gripu sličnih simptoma, može doći i do zapaljenja pluća, hepatitis, a ređe do oboljenja srca i nervnog sistema. Posledica perzistentne fokalne infekcije (u literaturi opisane i kao hronična forma bolesti) je u najvećem broju slučajeva pojava endokarditisa. Ređe se javljaju infekcije krvnih sudova hepatitis, pneumonija i oboljenja koštano-zglobnog sistema (Kampschreur et al., 2015; Matthieu & Raoult, 2017). Različite kliničke manifestacije bolesti, dovode se u vezu sa različitom virulencijom pojedinih sojeva *C. burnetii* i imunološkim osobenostima i predisponirajućim faktorima samog domaćina (Spyridaki et al., 1998).

Infekcija domaćih i divljih životinja sa *C. burnetii* je najčešće asimptomatska, a ukoliko se ispolji patogeno delovanje (najčešće kod goveda, ovaca i koza) ono se manifestuje abortusima gravidnih jedinki ili pojavom bronhopneumonije. Domaći preživari koji su često inaparentno inficirani se smatraju glavnim izvorom infekcije za ljude (Guatteo et al., 2011), dok se u urbanim sredinama potencijalnim izvorima smatraju i psi i mačke (Buhariwalla et al., 1996; Shapiro et al., 2017). Na epizootiološko-epidemiološki značaj pasa u pogledu kju groznice u Srbiji ukazuju rezultati skorašnjeg istraživanja u kome je

ukupna seroprevalencija na antigene *C. burnetii* kod analiziranih pasa bila 29,52% dok je molekularnim metodama DNK *C. burnetii* potvrđena kod 20,95% pasa (Bogunović, 2018). Istraživanja sprovedena poslednjih godina ukazuju na ulogu i drugih vrsta domaćih, morskih i kopnenih sisara, gmizavaca, krpelja i ptica u epidemiologiji kju groznice u različitim delovima sveta (Anderson et al., 2013; Hirai & To, 1998). Tako su npr. lenjivci primarni rezervoari do danas najpatogenijeg izolata *C. burnetii* u Francuskoj Gvajani (Eldin et al., 2015). Uloga divljih kanida (lisica, vukova, šakala) kao potencijalnih rezervoara *C. burnetii* je slabo istražena. Krpelji igraju veoma važnu ulogu u epizootologiji i epidemiologiji kju groznice, iako njihovo prisustvo nije neophodno za transmisiju infekcije sa zaraženih na prijemčive jedinke. Zbog prisutnog transstadijalnog i tranovarijalnog prenosa uzročnika te parazitiranja na velikom broju različitih prijemčivih domaćina, krpelji su odgovorni su za održavanje, prenošenje među različitim vrstama kičmenjaka i širenje *C. burnetii* u prostoru. Zbog toga se krpelji smatraju glavnim prirodnim rezervoarima ovog patogena (Porter et al., 2011). Značaj krpelja u eko-epidemiologiji kju groznice se može ilustrovati činjenicom da je prisustvo *C. burnetii* detektovano kod više od 50 vrsta krpelja, a eksperimentalna infekcija laboratorijskih životinja inficiranim krpeljima dokazana je za *I. holocyclus*, *H. bispinosa*, *R. sanguineus* i *D. andersoni* (Eldin et al., 2017; Porter et al., 2011). Nedavno sprovedena studija u Srbiji pokazala je prisustvo DNK *C. burnetii* kod *R. sanguineus* krpelja sakupljenih sa pasa lotalica poreklom sa teritorije grada Beograda. Kod analiziranih krpelja potvrđena je ukupna prevalencija od 10.53% (Bogunović et al., 2018). Pored ekskrecije uzročnika pljuvačkom, značajno je izlučivanje *C. burnetii* putem fecesa krpelja u velikim koncentracijama ( $10^{12}$  mikroorganizama po gramu fecesa) što s obzirom na veliku otpornost i visoku virulenciju *C. burnetii*, predstavlja veoma značajan izvor infekcije za druge prijemčive jedinke koje se mogu inficirati kontaktno ili aerogeno, kontaminiranim aerosolom (Porter et al., 2011).

### 2.1.5.3 Tularemija

Tularemija je bakterijska zoonoza od koje može da oboli veliki broj domaćina. Uzročnik tularemije je *Francisella tularensis*, pripadnik familije *Francisellaceae* i klase *Gamma proteobacteria*. To su sitni, gram-negativni, nepokretni, aerobni, fakultativno intracelularni koobacili koji se zbog izrazite virulencije svrstavaju u grupu A potencijalnih bioterorističkih agenasa (Dennis et al., 2001). Dve podvrste su značajne sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta: najpatogenija *F. tularensis* subsp. *tularensis* (ili tip A, u okviru koga postoje podtipovi A1a, A1b i A2 ) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B, sa biovarijetetima I, II i III/japonica). *F. tularensis* subsp. *tularensis* je prisutna samo u Severnoj Americi dok je *F. tularensis* subsp. *holarctica* rasprostranjena širom Severne hemisfere i jedina je podvrsta prisutna u Evropi (Keim et al., 2007). Bolest je prvi put opisana 1912. godine u okrugu Tulari, Kalifornija (SAD), kao oboljenje glodara slično kugi. Nedugo zatim prepoznata je i kao vrlo ozbiljna zoonoza koja ponekad ima i fatalan ishod po pacijenta (Francis, 1925; McCoy & Chapin, 1912). Epidemijski potencijal uzročnika tularemije postaje jasan tokom tridesetih i četrdesetih godina XX veka kada u Evropi i Sovjetskom Savezu dolazi do pojave velikih epidemija (Karpoff & Antonoff, 1936; Silchenko, 1957), i slučajeva epizootija u SAD (Francis, 1937; Jellison & Kohls, 1955). Druge *Francisella* spp. kao npr. *F. novicida*, *F. hispaniensis* i *F. philomiragia*, takođe se dovode u vezu sa oboljenjem ljudi i životinja ali o ulozi ovih vrsta u patologiji ljudi i životinja ima malo dostupnih podataka. Veruje se da su manje patogene od *F. tularensis* (Huber et al., 2010; Kingry & Petersen, 2014; Relich et al., 2015).

Tularemija se danas javlja u mnogim zemljama severne hemisfere, a endemska žarišta odavno postoje u Rusiji, Turkmenistanu i Kazahstanu, Finskoj i Švedskoj (Hestvik et al., 2015; Olsufiev, 1977). Zemlje istočne Evrope na godišnjem nivou prijavljuju slučajeve oboljenja kod ljudi, dok se bolest sporadično javlja u kontinentalnom delu zapadne Evrope. Epidemije novijeg datuma u Evropi u kojima je obolelo više stotina pacijenata, registrovane su u Portugalu, Španiji, Švedskoj, Bugarskoj i na Kosovu (De Carvalho et al.,

2007; Eliasson et al., 2002; Kantardjiev et al., 2006; Pérez-Castrillón et al., 2001; Reintjes et al., 2002).

Uprkos naporima istraživača širom sveta, ekologija *F. tularensis* nije do kraja shvaćena a posebno su neistraženi ciklusi prenosa uzročnika i ekološke razlike među različitim podvrstama i grupama *Francisella* spp. (Keim et al., 2007). Prisustvo *F. tularensis* potvrđeno je kod više od 300 vrsta sisara, ptica, vodozemaca i bezkičmenjaka (krpelji, komarci i druge artropode) te je definisanje specifičnog transmisionog ciklusa jako komplikovano (Keim & Wagner, 2009). Prepoznata su dva glavna ciklusa: terestrični i akvatični. U suvozemnom ciklusu, gde predominantno cirkuliše *F. tularensis* subsp. *tularensis*, najvažniji domaćini rezervoari su kunići, zečevi i drugi glodari, dok se *F. tularensis* subsp. *holarctica* vezuje za vodena staništa i domaćine kao što su dabrovi, bizamski pacovi i vodene voluharice. Prepoznata je i uloga protozoe *Acanthamoeba castellanii* kao rezervoara uzročnika tularemije u akvatičnom ciklusu (Abd et al., 2003; Carvalho et al., 2014). Artropodni vektori igraju značajnu ulogu u transmisiji tularemije među različitim sisarima. U istočnom delu Severne Amerike krpelji su prepoznati kao glavni vektori *F. tularensis*. Kod najmanje trinaest vrsta krpelja iz rodova: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* i *Ixodes* je dokazano prisustvo uzročnika tularemije (Hopla, 1974). U Nevadi, Juti i Kaliforniji najčešći vektori tularemije su obadi iz roda *Chrysops*. Nekoliko epidemija u Juti je bilo je povezano sa tabanidom *Chrysops discalis* (Jellison, 1950). U bivšem Sovjetskom Savezu dokazana je transmisija uzročnika tularemije komarcima rodova *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* i krpeljima roda *Ixodes* a prepoznata je i vektorska uloga obada iz porodice Tabanidae (Krinsky, 1976; Olsufiev & Dunayeva, 1970). Krpelji *D. reticulatus* i *I. ricinus* su važni vektori uzročnika tularemije u centralnoj Evropi. *F. tularensis* je sa prevalencijom od 2,3% potvrđena kod krpelja *D. reticulatus* iz Češke i Austrije (Hubálek et al., 1998), kod *D. reticulatus* i *I. ricinus* i *H. concinna* krpelja u Slovačkoj sa prevalencijom od 0,5–2% (Guryčová et al., 1995) dok je prevalencija od 0,27% zabeležena kod *D. reticulatus* i *H. concinna* krpelja u Mađarskoj (Kreizinger et al., 2013). Kod *I. ricinus* krpelja sakupljenih sa vegetacije u našoj zemlji potvrđena je

prevalencija od 3,8% na prisustvo *F. tularensis* (Milutinović et al., 2008), a prisustvo ovog patogena kod *I. ricinus* krpelja potvrđeno je i u koinfekciji sa vrstama iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. (Milutinović et al., 2008; Tomanović et al., 2010).

Čovek se može inficirati na više načina: ubodom inficiranog artropodnog vektora, kontaktom sa inficiranim tkivima životinja i njihovim izlučevinama, zatim ingestijom ili direktnim kontaktom sa vodom, hranom i zemljištem u kome je prisutan uzročnik. Aerogena infekcija može da usledi inhalacijom kontaminiranog aerosla (Ulu-kilic & Doganay, 2014). Ljudi se najčešće inficiraju sa *F. tularensis* subsp. *tularensis* u kontaktu sa inficiranim glodarima iz reda Lagomorpha ili ubodom inficiranih insekata. Komarci se smatraju glavnim vektorima za *F. tularensis* subsp. *holarctica* čije je ekologija vezana za reke, potoke i plavna područja (Keim et al., 2007; Lundström et al., 2011; Thelaus et al., 2014). Klinička iskustva i epidemiološki podaci u Finskoj i Švedskoj podržavaju ulogu komaraca u transmisiji *F. tularensis* (Christenson, 1984; Eliasson et al., 2002). Prvi simptomi kod ljudi su obično nespecifični i uključuju povišenu telesnu temperaturu, drhtavicu, bolove u telu i umor. Postoji šet glavnih kliničkih manifestacija tularemije kod ljudi. Podela je izvršena na osnovu dominantnih simptoma na: ulceroglandularnu, glandularnu, okuloglandularnu, orofaringelanu, plućnu i tifoidnu tularemiju (Carvalho et al., 2014). Klinički simptomi kod domaćih životinja zavise od virulencije soja koji je izazvao infekciju i vrste inficirane životinje. *F. tularensis* subsp. *tularensis* izaziva oboljenje sa ozbiljnijom kliničkom slikom doka su infekcije sa *F. tularensis* subsp. *holarctica* kod životinja obično subkliničke. Kod životinja nisu poznati svi klinički simptomi koji se javljaju kod tularemije. Opisani su orofaringealni, ulceroglandularni, respiratorni i tifoidni oblik bolesti koji odgovaraju formama koje se javljaju kod ljudi. Ovce su najosetljivije na infekciju dok je bolest opisana i kod mačaka, konja i mladih svinja. Kod goveda i pasa infekcija prolazi bez simptoma i ove vrste se smatraju prilično rezistentnim na *F. tularensis* (Baldwin et al., 1991; Gürçan, 2014; Toole et al., 2008). Znakovi i simptomi tularemije kod divljih životinja nisu dobro dokumentovani a i patomorfološke promene su nespecifične. Najčešće se nalazi uvećana slezina i bele, rasute, tačkaste nekrotične lezije



na jetri i slezini. Zečevi i ostali glodari su dosta osetljivi na infekciju uzročnikom tularemije koja kod ovih vrsta često ima septikemični karakter (Carvalho et al., 2014). Zbog činjenice da kliničkim slučajevima tularemije kod ljudi često prethode pojave bolesti kod slobodno živećih divljih životinja i onih držanih u zarobljeništvu, od ključnog je značaja poznavanje distribucije *F. tularensis* u odgovarajućim životinjama rezervoarima (Splettstoesser et al., 2009). Serološka istraživanja pokazala su izloženost većeg broja vrsta divljih životinja *F. tularensis* (Olsufiev & Dunayeva, 1970; WHO, 2007). Nedavno sprovedeno serološko istraživanje u Nemačkoj kod nekoliko vrsta divljih životinja otkrilo je značajan broj seropozitivnih lisica na *F. tularensis* (18,4%) i ukazalo na značaj ove divlje kanide kao biološkog indikatora za uzročnika tularemije (Kuehn et al., 2013). Studije o ulozi šakala u epizootologiji i epidemiologiji tularemije do sada nisu vršene.

#### 2.1.5.4 Bartoneloza

Bartoneloza je zoonotska, vektorima prenosiva zarazna bolest široko rasprostranjena u svetu. Uzročnici ovog oboljenja su vrste bakterija roda *Bartonella* koji pripada porodici *Bartonellaceae*, i alfa-2 podgrupi alfa-proteobakterija zajedno sa rodovima *Rickettsia* i *Brucella* (Sanchez Clemente et al., 2012). Većina ovih bakterija su pleomorfni gram-negativni, aerobni, fakultativno intracelularni kokobacili ili bacilarni štapići (0,6-1,0 µm). Do 1993. godine u rodu *Bartonella* bila je samo jedna vrsta: *B. bacilliformis*. Od tada, izmenama u taksonomskoj klasifikaciji pridruživanjem rodova *Rochalimea* i *Grahamella* kao i opisom novih vrsta unutar roda, broj se značajno povećao. Trenutno je zvanično opisano trideset i pet *Bartonella* spp. a još nekoliko predloženo kao „kandidat vrste“. Za njih sedamnaest je prepoznato da imaju epizootiološko-epidemiološki značaj, tj. dovode se u vezu sa oboljenjima ljudi i životinja (Breitschwerdt, 2017; Gomes & Ruiz, 2017).

Posmatrano sa aspekta humane i veterinarske medicine, najveći značaj se pridaje *B. henselae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi* i *B. koehlerae*, vrstama koje inficiraju mačke, pse, konje a takođe imaju i zoonotski potencijal. *B. bacilliformis* i *B. quintana* su prepoznate kao važni

patogeni u humanoj populaciji a primati se smatraju domaćinima rezervoarima za ove vrste (Breitschwerdt et al., 2013). Bakterijemija izazvana sa *B. henselae* potvrđena je kod pasa, krava, konja, morskih sisara, morskih kornjača i malih terestričnih sisara što u mnogome komplikuje epizootiološko-epidemiološku situaciju ove medicinski značajne vrste (Breitschwerdt, 2014). *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* je prvi put izolovana kod psa sa endokarditisom a kasnije je ova podvrsta potvrđena i kod mačaka, kojota, lisica, jelena, konja i obolelih ljudi (Breitschwerdt, 2014; Chomel et al., 2009). Sve patološke manifestacije izazvane infekcijom različitim *Bartonella* spp. kod mačaka, pasa, većine drugih životinjskih vrsta i ljudi do danas nisu istražene. Najčešće se patogeno delovanje ispoljava u vidu endokarditisa, miokarditisa i patologijom vezanom za krvne sudove (vaskulitis, tromboze, aneurizme, neoplazije endotela krvnih sudova), limfadenopatije (Breitschwerdt, 2017).

*Bartonella* spp. su visoko prilagođene svojim sisarskim domaćinima u kojima ove bakterije izazivaju dugotrajnu intra-eritrocitnu bakterijemiju ili endoteliotropnu infekciju često bez ispoljavanja kliničkih simptoma (Breitschwerdt et al., 2010; Breitschwerdt & Kordick, 2000). Sve veći broj novootkrivenih domaćih i divljih životinja dokazanih i potencijalnih rezervoara za *Bartonella* spp. (goveda, ovce, psi, mačke, sitni glodari, zečevi, jeleni, kojoti, lisice) ukazuje na širu distribuciju uzročnika i veći značaj bartoneloze u epizootiologiji i epidemiologiji nego što se do sada mislilo (Breitschwerdt, 2017, 2014).

Istraživanja novijeg datuma ukazuju na sve veći broj potvrđenih i potencijalnih artropodnih vektora za uzročnike bartoneloze među različitim populacijama životinja i sa životinja na ljude, među kojima je veći broj insekata koji bodu i sišu krv, poput obada, buva, vaši. Poslednjih godina se sve veći značaj pridaje i krpeljima kao vektorima različitih *Bartonella* spp. (Billeter et al., 2008; Breitschwerdt, 2017). Prirodna infekcija kičmenjačkih domaćina usledi preko artropodnih vektora prilikom uzimanja krvnog obroka. Značajan način transmisije *Bartonella* spp. je i preko fecesa artropodnih vektora (Finkelstein et al., 2002). Epidemiološki dokazi i studije eksperimentalnog prenosa ukazuju na važnu ulogu mačije buve (*Ctenocephalides felis*) u transmisiji *Bartonella* spp.

među mačkama, psima i drugim sitnim sisarima u čitavom svetu (Billeter et al., 2008). *C. felis* dokazano prenosi *B. henselae*, *B. clarridgeae*, *B. koehlerae*, i potencijalni je vektor za *B. quintana*, (Breitschwerdt, 2014; Kernif et al., 2014). Mačke se smatraju glavnim domaćinima rezervoarima zoonoznih *Bartonella* spp. a zbog svoje široke rasprostranjenosti u populaciji mačaka i pasu u Evropi, *C. felis* je prepoznat kao glavni artropodni vektor *Bartonella* spp. infektivnih za čoveka (Iannino et al., 2018; Traversa, 2013). Kada se razmatra uloga krpelja kao vektora za *Bartonella* spp. objavljeni rezultati više naučnih studija ukazuju na njihovu potencijalnu ulogu u transmisiji uzročnika bartoneloze iako do sada njihova uloga kao vektora nije jasno potvrđena (Angelakis et al., 2010; Billeter et al., 2008; Iii & Wormser, 2010). Generalno, uzimajući u obzir sve dokazane i potencijalne domaćine i rezervoare za različite *Bartonella* spp. mnogo je nepoznanica o načinu cirkulisanja ovih patogena u enzootskim ciklusima te su dalja epizootiološko-epidemiološka istraživanja od krucijalnog značaja u cilju boljeg razumevanja kompleksne eko-epidemiologije uzročnika bartoneloze.

### 2.1.6 Epizootiološko-epidemiološki aspekti lajšmanioze

Lajšmanioza je široko rasprostranjena, vektorima prenosiva zoonoza koju izaziva više vrsta intracelularnih protozoa iz roda *Leishmania* (klasa Kinetoplastida, familija Trypanosomatidae) i od koje može da oboli više vrsta sisara. Transmisija *Leishmania* spp. se odvija posredstvom flebotomina, tj. peščanih mušica (Diptera, Psychodidae) a vektorsku ulogu ima preko devedeset vrsta ovih hematofagnih artropoda. Lajšmanioza se endemski javlja širom tropskog i subtropskog pojasa Azije, Afrike, Amerike i u Mediteranskom basenu a bolest je registrovana u oko 89 država (Torres-Guerrero et al., 2017). Na osnovu kliničkih manifestacija, lajšmanioza je podeljena na kutanu (lokalizovana i dieseminovana), muko-kutanu i visceralnu (kala-azar, crna bolest) formu bolesti. Od svih slučajeva visceralne lajšmanioze na godišnjem nivou u svetu, njih 90% je poreklom iz Bangladeša, Brazila, Etiopije, Indije, Južnog Sudana i Sudana, dok oko 70%

slučajeva kutane forme bolesti se prijavljuje u Avganistanu, Alžiru, Brazilu, Kolumbiji, Kostariki, Etiopiji, Iranu, Sudanu i Siriji (WHO, 2018) a oko jedne trećine prijavljenih slučajeva svih formi bolesti u svetu poreklom je iz zemalja Mediteranskog basena (Negev et al., 2015). Epidemiološki značaj ovog oboljenja može se sagledati kroz činjenice da godišnje u svetu od ove bolesti oboli između 1,5 i 2 miliona ljudi, 350 miliona je pod rizikom, a život izgubi 70.000 osoba te je druga parazirska bolest u svetu po smrtnosti posle malarije. Lajšmanioza je od strane Svetske zdravstvene organizacije svrstana u sedam najvažnijih tropskih bolesti u svetu (WHO, 2018). Porast incidencije lajšmanioze na svetskom nivou dovodi se u vezu sa više faktora antropogenog porekla od kojih su najvažniji velike migracije stanovništva, krčenje šuma, intezivna urbanizacija i porast broja oboljenja imunosupresivnog karaktera (Oryan & Akbari, 2016).

Faktori koji utiču na pojavu bolesti uključuju: parazita tj. različite vrste roda *Leishmania* (patogenost, virulencija,..), flebotomine kao vektore i faktore životne sredine, te samog domaćina (osetljivost, imunokompetencija,..). U okviru roda *Leishmania*, oko 20 vrsta se smatra patogenim i dovodi u vezu sa nekom od kliničkih formi lajšmanioze. Geografska distribucija pojedinih vrsta razlikuje se među zemljama čija je zajednička odlika suptropska klima. Novija istraživanja zasnovana na molekularnim metodama ukazuju da bi broj vrsta roda *Leishmania* mogao biti značajno veći nego što je do sada opisano i sugerišu na potrebu za određenim promenama u sistematici lajšmanija (Schönian et al., 2010). Sve *Leishmania* spp. su na osnovu anatomskih razlika u mestu na kome se obavlja njihov razvoj u crevu peščanih mušica podeljene u dva podroda: *Leishmania* (razvoj u prednjem i srednjem delu creva), kome pripadaju vrste zastupljene u zemljama Novog (Amerika) i Starog sveta (Evropa, Azija i Afrika) i *Viannia* (razvoj u prednjem, srednjem ali i u kaudalnim delovima alimentarnog kanala tj. pilorusu, ileumu i rektumu), sa vrstama prisutnim samo u zemljama Novog sveta (Rioux et al., 1990). U podrodu *Viannia* nalaze se *Leishmania braziliensis* (najšeeći uzročnik kutane i muko-kutane forme) zatim *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. peruviana*, *L. panamensis* i *L. colombiensis*, vrste koje su prisutne na području Južne i Centralne Amerike i značajni su uzročnici

lajšmanioze ljudi u tom delu sveta. Vrste značajne sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta u podrođu *Leishmania* su: *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* prisutne u Latinskoj Americi dok su u zemljama Starog sveta od značaja: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*. Sve nabrojane vrste se javljaju kao uzročnici kutane forme bolesti dok su *L. donovani* i *L. infantum* kompleks vrsta glavni uzročnici visceralne lajšmanioze, a opisano je nekoliko slučajeva ove forme bolesti uzrokovane i sa *L. tropica*. Za visceralnu lajšmaniozu kod dece u zemljama Starog sveta vezuje se *L. infantum*, dok se ista vrsta endemski ili sporadično javlja kao uzročnik visceralna lajšmanioze u zemljama Novog sveta sa kliničkim manifestacijama sličnim onim kod pacijenata obolelih od ove forme bolesti u Evropi. Kutane lezije izazvane sa *L. infantum* se najčešće viđaju u regionu Mediteranskog basena gde je ova vrsta ponajviše zastupljena, te je i najčešći uzročnik kutane forme bolesti u zemljama Južne Evrope.

Na teritoriji Evrope od epizootiološko-epidemiološkog značaja su tri vrste *Leishmania*: *L. infantum*, koja je najznačajniji uzročnik lajšmanioze pasa u Evropi i uzročnik kutane i visceralne forme bolesti kod ljudi u zemljama Mediteranskog basena i dve antroponotične vrste *L. tropica* i *L. donovani* koje su odgovorne za sporadičnu pojavu kutane i visceralne lajšmanioze uglavnom u Grčkoj i na Kipru (Mazeris et al., 2010). Mada retko, *L. infantum* može izazvati oboljenje i kod domaćih mačaka (Pennisi et al., 2013). Transmisija *L. infantum* usledi vektorima sa domaćih pasa koji su prepoznati kao glavni rezervoari, dok se *L. tropica* prenosi flebotominama sa čoveka na čoveka (Preadynhmacuk, 2010). Autohtoni slučajevi lajšmanioze potvrđeni su u Španiji, Portugalu, Francuskoj, Italiji, Grčkoj, Kipru, Malti, Hrvatskoj, Albaniji, Bugarskoj i Turskoj a endemski se javlja i na jugu naše zemlje (Dakić et al., 2009a; Pace, 2014). Uobičajeno je da lajšmanioza u Evropi ima endemski karakter, mada su nedavno zabeležene epidemije ove bolesti u Italiji i Španiji (Arce et al., 2013; Varani et al., 2013). Značajno je napomenuti da se poslednjih godina beleži širenje infekcije lajšmanijama ka severnijim delovima Evrope (Maroli et al., 2008), a takođe je potvrđeno i prisustvo vektora, peščanih mušica u zemljama centralne Evrope (Ivović et al., 2015; Poepl et al.,

2013). Muko-kutana forma bolesti se viđa retko u zemljama Starog sveta ali može biti uzrokovana bilo kojom od pomenutih vrsta i obično se javlja kod imunokompromitovanih pacijenata. Diseminovana kutana forma se dovodi u vezu sa *L. aethiopica*, dok kod imunosuprimiranih pacijenata simptome karakteristične za ovaj tip bolesti mogu da izazovu i druge vrste *Leishmania*.

#### 2.1.6.1 Razvojni ciklus *Leishmania* spp.

Postoje dve glavne morfološke forme u životnom ciklusu *Leishmania*: ekstracelularna, pokretna forma- **promastigoti**, dužine od 12-20  $\mu\text{m}$  koje karakteriše prisustvo duge flagele u obliku biča i kao takve prisutne su u digestivnom traktu svojih artropodnih vektora, i intracelularna, nepokretna forma- **amastigoti**, veličine od 3-5  $\mu\text{m}$  koji parazitiraju u ćelijama monocitno-makrofagnog sistema svojih sisarskih domaćina (Bates, 2009; Hommel, 1999). Razvoj i umnožavanje amastigota u inficiranim ćelijama domaćina odvija se do momenta lize ćelije pri čemu oslobođeni paraziti napadaju nove, zdrave ćelije (Hommel, 1999). Nakon što amastigoti prilikom uzimanja krvnog obroka dospeju u digestivni trakt peščane mušice oni se ponovo transformišu u flagelatne, pokretne promastigote. Razvoj u vektoru traje od 4 do 18 dana što zavisi od vrste parazita i temperature na način da niže temperature usporavaju razvoj parazita u vektorima a više pospešuju (Torres-Guerrero et al., 2017). Promastigoti su i forma parazita koja je prisutna *in vitro*, u ćelijskim kulturama nakon zasejavanja materijala poreklom od inficiranih ljudi, peščanih mušica i životinja rezervoara (Santarém et al., 2014). Razvojni ciklus *Leishmania* spp. prikazan je na slici 7.



2014). Hipoteza po kojoj se *Leishmania* spp. mogu prenositi ubodom ili ugrizom drugih artropodnih vektora (krpelji, buve..) nije eksperimentalno potvrđena (Dantas-Torres, 2011; Killick-Kendrick, 1999). U zemljama Starog sveta, ukupan broj dokazanih ili potencijalnih vektora uzročnika lajšmanioze broji 42 vrsta, od čeka je njih 20 odgovorno za transmisiju *L. infantum*, (*Phlebotomus ariasi*, *P. balcanicus*, *P. chinensis*, *P. galileus*, *P. halepensis*, *P. kandelakii*, *P. langeroni*, *P. longicuspis*, *P. longiductus*, *P. major* s.l., *P. neglectus*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. sichuanensis*, *P. smirnovi*, *P. syriacus*, *P. tobbi*, *P. transcaucasicus*, *P. turanicus*, *P. wui*), šest vrsta prenosi *L. donovani* (*P. argentipes*, *P. celiae*, *P. longiductus*, *P. martini*, *P. orientalis*, *P. vansomerena*), po sedam *L. major* (*P. ansarii*, *P. caucasicus*, *P. duboscqi*, *P. mongolensis*, *P. papatasi*, *P. salehi*, *P. bergeroti*) i *L. tropica* (*P. aculeatus*, *P. arabicus*, *P. chabaudi*, *P. guggisbergi*, *P. rossi*, *P. saevus* *P. sergenti*) a tri vrste flebotomina (*P. longipes*, *P. pedifer*, *P. sergenti*) se dovode u vezu sa transmisijom *L. aethiopica*. Pravilo je da jedna vrsta flebotomine prenosi jednu vrstu *Leishmania*, sa izuzetkom *Phlebotomus sergenti* koji je u delovima Etiopije vektor za *L. tropica* i *L. aethiopica*, i *Phlebotomus alexandri* koji je vektor za vrste kompleksa *L. donovani* (*L. donovani* s.s. i *L. infantum*) u Kini a verovatno i u drugim zemljama (Gebre-Michael et al., 2004; Maroli et al., 2013). Prethodna faunistička istraživanja na teritoriji Srbije potvrdila su prisustvo: *Phlebotomus papatasi*, *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. simici*, *P. sergenti* i *P. balcanicus*, dok je nedavno na teritoriji Vojvodine potvrđeno i prisustvo vrste *P. mascittii* (Vaselek et al., 2017; Živković, 1967).

### 2.1.6.3 Rezervoari *Leishmania* spp.

U transmisionom ciklusu lajšmanioze uključeni su ljudi, i veći broj domaćih i divljih životinja. Najčešći put transmisije na čoveka je sa životinja, domaćina rezervoara kao što su vrste iz reda glodara, torbara, edentatnih sisara zatim majmuna, domaćih pasa i divljih kanida (Baneth et al., 2016). Samo nekoliko vrsta lajšmanija se posredstvom flebotomina prenosi sa čoveka na čoveka (npr. *L. tropica* i *L. donovani*) (Quinnell & Courtena, 2009). U



urbanom transmisionom ciklusu, domaći psi su označeni kao glavni rezervoari *L. infantum*, i predstavljaju izvor infekcije za druge pse i ljude u Evropi, i šire (na području sve od Portugala do Kine i u centralnim i južnim delovima Severne Amerike sa izuzetkom Australije) (Solano-gallego et al., 2011). Silvatični ciklus, prisutan u kišnim šumama Amerike i u pustinjama centralne Azije podrazumeva transmisiju lajšmanija posredstvom flebotomina sa divljih životinja koje igraju ulogu domaćina rezervoara a ljudi su slepi domaćini u slučaju infekcije (Bern et al., 2008).

Potvrđena je infekcija više vrsta divljih mesojeda sa *Leishmania* spp. u Evropi. Prisustvo lajšmanija potvrđeno je kod: lisice (*Vulpes vulpes*), vuka (*Canis lupus*), mrkog tvora (*Mustela putorius*), kuna (*Martes foina*, *Martes martes*), evropskog ježa (*Erinaceus europaeus*), evropske vidrice (*Mustella lutreola*), šakala (*Canis aureus*), egipatskog mungosa (*Herpestes ichneumon*), genete (*Genetta genetta*), iberijskog risa (*Lynx pardinus*) i divlje mačke (*Felis silvestris*). Klinički znakovi lajšmanioze kod divljih životinja su zabeleženi samo kod lisice i vuka (Baneth et al., 2014; Millán et al., 2014; Sobrino et al., 2008; Verin et al., 2010).

U većini slučajeva u regionima gde se lajšmanioza pasa javlja endemski, inficirane su i divlje kanide. Zbog toga kontrola i prevencija infekcije kod pasa verovatno nije dovoljna da spreči transmisiju *L. infantum* na ljude jer divlje kanide mogu predstavljati stalni izvor infekcije za peščane mušice na takvom terenu (Otranto & Dantas-torres, 2013). Opisani su i slučajevi infekcije lajšmanijama kod domaćih mačaka (Maia & Campino, 2011; Spada et al., 2016) i konja (Gama et al., 2014) sa razvojem kliničkih simptoma, mada uloga ovih životinja kao rezervoara uzročnika ovog oboljenja nije do kraja razjašnjena. Nedavna epidemija lajšmanioze kod ljudi u Španiji (Arce et al., 2013) koja nije bila u korelaciji sa porastom prevalencije ovog oboljenja kod pasa i mačaka (Miró et al., 2014) navela je na razmišljanje o ulozi kunića (*Oryctolagus cuniculus*) i zečeva (*Lepus* spp.) kao potencijalnih izvora infekcije u slučaju ove epidemije (Jiménez et al., 2014; Molina et al., 2012). Millán i sar. (2014) zaključuju da crni pacovi (*Rattus rattus*) i zečevi mogu doprineti održavanju lajšmanioze na određenom području. Rezultati prethodnih studija idu u prilog hipotezi koja opravdava postojanje silvatičnog ciklusa lajšmanioze. Najveći broj dosadašnjih

istraživanja u vezi lajšmanioze sproveden je u endemskim područjima, a sprovedene studije razmatraju pojedinačne ili ograničen broj faktora od značaja sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta za pojavu, širenje i održavanje ovog oboljenja. Otuda postoji potreba za daljim kliničkim, ekološkim i epidemiološkim studijama u vezi sa ovom značajnom vektorskom zoonozom na širem području. Ostaje da se istraži potencijalna uloga i drugih vrsta životinja u enzootskim ciklusima lajšmanioze.

Studije koje su se bavile ulogom šakala u epizootiologiji lajšmanioze ukazuju na prisustvo uzročnika ovog oboljenja u populaciji šakala (Baneth et al., 1998; Khan et al., 2012), a s obzirom da rezervoari nisu poznati kod nas, istraživanje uloge šakala u održavanju lajšmanioze u našoj zemlji ima poseban značaj.

### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija je imala za cilj definisanje uloge i značaja zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima prenosivih zoonoza (*Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burneti* i *Leishmania* spp.) na teritoriji Republike Srbije. Zbog naglog povećanja areala i brojnosti populacije šakala na teritoriji naše zemlje i malo dostupnih podataka o epizootičko-epidemiološkom značaju ove divlje kanide u održavanju vektorima prenosivih zoonoznih patogena, postojala je potreba za naučnim istraživanjem ovog tipa. Pored toga, s obzirom da sistematska istraživanja krpelja koji parazitiraju šakale nisu vršena, cilj disertacije je bio i prilog poznavanju faune krpelja koji parazitiraju šakale na istraživanim lokalitetima, utvrđivanje prisustva krpeljima prenosivih patogena u sakupljenim krpeljima (*Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burneti*) te tumačenje dobijenih rezultata sa veterinarsko-medicinskog aspekta.

U svrhu ostvarivanja zadatih ciljeva postavljeni su sledeći naučno-istraživački zadaci:

- Uzorkvanje tkiva odstreljenih šakala (slezina,) i ektoparazita krpelja, sa većeg broja lokaliteta na teritoriji Republike Srbije.
- Laboratorijska obrada sakupljenih uzoraka (identifikacija vrsta, pola i stadijuma krpelja, ekstrakcija DNK iz uzoraka tkiva i sakupljenih krpelja)

- Molekularna detekcija DNK patogena : (*Babesia spp.*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Francisella spp.*, *Bartonella spp.*, *Coxiella burnetii* i *Leishmania spp.*) u uzorcima šakala i krpelja.
- Genotipizacija i karakterizacija detektovanih patogena molekularnim metodama (sekvenciranje, RFLP).
- Statistička obrada dobijenih rezultata.

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1 Opis istraživanog područja

Uzorci tkiva slezine šakala sakupljeni su od životinja odstreljenih na širem području svakog od ukupno 10 analiziranih lokaliteta (Titel, Surčin, Veliko Gradište, Smederevo, Smederevska Palanka, Velika Plana, Svilajnac, Negotin, Zaječar, Bela Palanka). Po broju sakupljenih uzoraka ključno je pet lokaliteta: Veliko Gradište, Smederevo, Svilajnac, Velika Plana i Surčin. Područja analiziranih lokaliteta su raspoređeni na širokom prostoru trenutnog areala šakala u našoj zemlji (Ćirović i sar., 2008). Zajednička odlika ključnih izabranih ispitivanih lokaliteta je da se u njihovim blizinama nalaze veći rečni vodotokovi. Ispitivano područje Velikog Gradišta je blizu Dunava, područje Smedereva je na mestu gde se Velika Morava uliva u Dunav, Svilajnac je u blizini reke Resave, Velika Morava protiče kroz područje Velike Plane a područje Surčina je u blizini Save. Slivovi veliki reka su prepoznati kao put kojim šakali šire svoj areal i kolonizuju Evropu. Naročito se kao značajan put širenja šakala u Evropi ističe sliv reke Dunav (Zachos et al., 2009). Područja preostalih analiziranih lokaliteta su sa šireg areala šakala u našoj zemlji. Geografske odlike ključnih ispitivanih lokaliteta su da je rečna nizija prisutna na širem području lokaliteta Smederevo i Surčin dok je okolno pobrđe prisutno na preostalim ključnim lokalitetima. Na svim lokalitetima sa kojih potiču analizirani uzorci dominantno je prisutno poljoprivredno zemljište. Srbiju karakteriše umereno kontinentalna klima čije su odlike relativno hladne i umereno vlažne zime te umereno topla i sušna leta (Stevanović & Stevanović, 1995).

## 4.2 Prikupljanje tkiva šakala

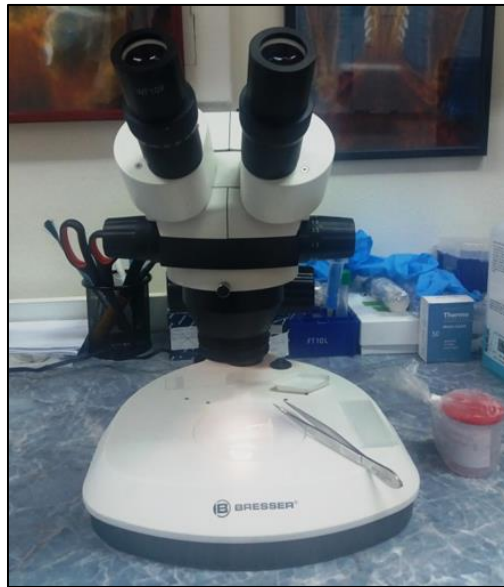
Uzorci tkiva sakupljani su neposredno po odstrelu šakala, a u slučaju životinja stradalih u saobraćaju u momentu kada je leš nađen (u okviru vremenskog perioda u kom nije došlo do promena na tkivima koje bi učinile uzorak nepodesnim za molekularne metode korišćene u ovoj studiji). Podaci o mestu odstrela ili mestu gde je nađena pregažena životinja, polu životinje i datum odstrela ili pretpostavljeno vreme smrti za životinje stradale u saobraćaju, zabeleženi su za svaku životinju. U cilju uzimanja adekvatnih uzoraka vršena je terenska obdukcija uz poštovanje principa obdukcione tehnike u datim uslovima. Na adekvatan način uzeti su uzorci tkiva slezine od svake životinje. Uzorci su stavljeni u adekvatno obeležene sterline bočice za urin i poštujući hladni lanac (medicinski transportni hladnjak) dopremljene u laboratoriju Grupe za medicinsku entomologiju, Instituta za medicinska istraživanja radi daljih analiza. Do laboratorijskih analiza uzorci tkiva su čuvani u zamrzivačima za duboko zamrzavanje na temperaturi od -80°C. Uzorci analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji sakupljeni su tokom perioda od četiri godine (januar 2010 god. – februar 2013 god.).

## 4.3 Prikupljanje krpelja sa šakala

U slučajevima gde je bilo moguće kratko vreme po odstrelu celo telo šakala je detaljno pregledano na prisusvo krpelja. Svi krpelji uočeni inspekcijom su uz pomoć entomološke pincete uklonjeni sa tela životinje i stavljeni u obeležene plastične tubice sa 70% alkoholom. Svaka tubica je adekvatno označena (kolektorski broj, lokalitet i datum, pol jedinke) i tako transportovana do laboratorije.

#### 4.3.1 Entomološki pregled krpelja

Koristeći stereo-mikroskop (58-06100, Bresser™) sa mogućnošću uvećanja do 45 puta, krpelji su identifikovani do nivoa vste uz pomoć ključeva za determinaciju (Estrada-Peña et al., 2004; Pomerancev, 1950; Walker et al., 2003), određeni su razvojni stadijumi (nimfe, mužjaci, ženke) i definisan je stepen nasisanosti (ne nasisani, umereno nasisani, nasisani) (Slika 8.).



**Slika 8. a-** prikaz stereo-mikroskopa korišćenog za entomološki pregled krpelja (58-06100, Bresser™),

### 4.4 Izolacija DNK i molekularna detekcija patogena u uzorcima tkiva šakala i krpelja

#### 4.4.1 Izolacija DNK iz slezine šakala

Izolacija DNK je rađena iz uzorka tkiva pojedinačnih životinja. Uz pomoć sterilnih krvnih lanceta je uzeta mala količina tkiva slezine (do 20 mg), i stavljena u plastičnu

tubicu od 1,5 ml (*Eppendorf*<sup>TM</sup>). Potom su tubice držane 15 minuta u zamrzivaču za duboko zamrzavanje ( na - 80 °C) a zatim je vršena homogenizacija uzorka uz pomoć plastičnih štapića predviđenih za ovu namenu (*Micropestle, Eppendorf*<sup>TM</sup>). Procedura izolacije ukupne DNK iz uzorka tkiva slezine izvedena je upotrebom komercijalnog kita za izolaciju DNK u sistemu sa kolonicama (*Gene Jet Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific*<sup>TM</sup>), po protokolu proizvođača za izolaciju DNK iz tkiva sisara.

Procedura se sastojala iz nekoliko koraka:

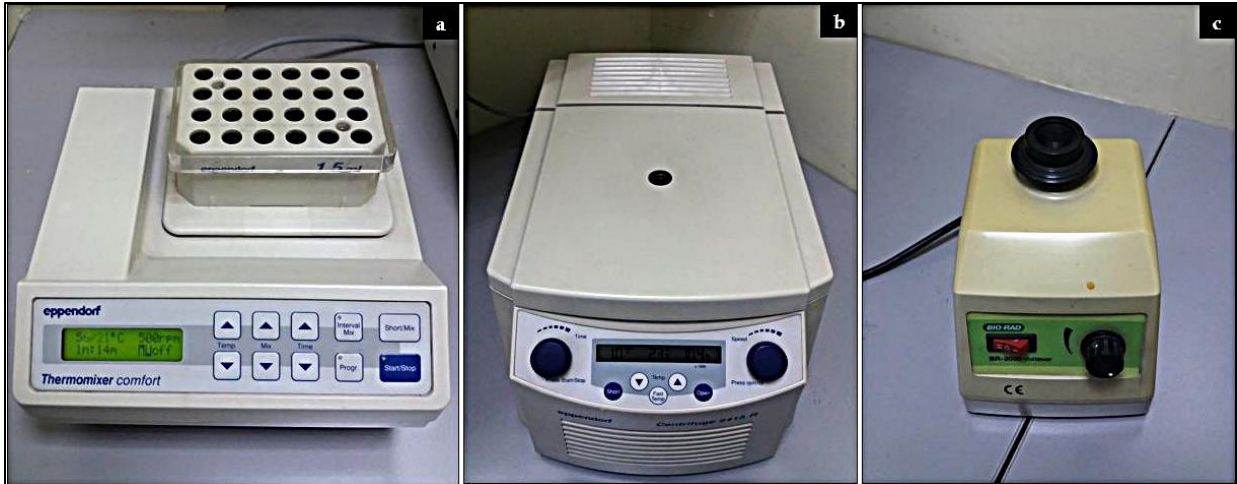
- U tubicu sa homogenizovanim tkivom slezine dodato je 180 µl rastvora za digestiju i 20 µl enzima proteinaze K. Sadržaj tubice je promešan na vortex mešalici do postizanja uniformne suspenzije i stavljen na inkubaciju u rotirajuće vodeno kupatilo (*Thermomixer comfort, Eppendorf*<sup>TM</sup>) na temperaturu od 56 °C u trajanju od 3 sata.
- Po završenoj inkubaciji u uzorke je dodato po 20 µl Rnaze A. Potom su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 10 minuta. Po završenoj inkubaciji dodato je 400 µl 50% etanola i uzorci su homogenizovani na vortex mešalici.
- Pripremljeni lizati uzoraka su zatim prebačeni pipetom u kolone za purifikaciju koje su sastavni deo kita za izolaciju a potom centrifugirane na 6000 x g u trajanju od 1 minut. Sadržaj koji se po centrifugiranju pojavljuje u tubici za sakupljanje je odbačen.
- Zatim je sledilo ispiranje uzoraka sa puferima (*Wash Buffer I, Wash Buffer II*). Prvo je u kolonice sa uzorkom dodavano 500 µl pufera za ispiranje I i uzorci su zatim centrifugirani na 8000 x g 1 minut. Sadržaj iz tubice za sakupljanje po centrifugiranju je odbacivan, nakon čega je u uzorke dodavan pufer za ispiranje II i uzorci su zatim centrifugirani na maksimalnoj brzini (≥ 12000 x g) u trajanju od 3 minuta.



- Po završenim koracima ispiranja, gornji deo kolone za izolaciju u kojoj je filter sa zadržanom DNK se prebacivao u nove plastične tubice od 1,5 ml a na centar filtera se pipetom dodavalo 200 µl pufera za eluciju DNK (*Elution Buffer*). Potom su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 2 minuta a zatim centrifugirani na 8000 x g u trajanju od 1 minut. Zatim je kolona sa filterom odstranjena a od izolovane DNK napravljeni su alikvoti i uzorci skladišteni na -20 °C do daljih analiza.

#### 4.4.2 Izolacija DNK iz krpelja

Po završenom entomološkom pregledu krpelji su čuvani u 70% etanolu do izolacije DNK. Pre same izolacije, krpelji su ispirani u sterilnoj vodi, sušeni na filter papiru pa zatim homogenizovani u 500 µl fosfatnog pufera (PBS) upotrebom sterilnih makazica i uz pomoć sterilnih plastičnih mikrotučkova (*Micropestle, Eppendorf™*). Po dobijanju homogenata alikvotirano je 200 µl u novu tubicu koja je predstavljala polaznu tačku za izolaciju DNK iz uzoraka krpelja. Ostatak homogenata krpelja čuvan je u zamrzivaču na -80°C da bi u slučaju potrebe bila moguća ponovna izolacija DNK iz svakog uzorka. Za izolaciju je korišćen isti komercijalni kit kao i za tkiva slezine (*Gene Jet Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific™*) po prethodno opisanoj proceduri s tom razlikom da je po potrebi (gust sadržaj, veći stadijum nasisanosti krpelja) vreme inkubacije produžavano sa 3 sata na 5 sati radi postizanja optimalne digestije. Prikaz opreme korišćene prilikom izolacije DNK iz uzoraka tkiva slezine i krpelja dat je na slici 9.



**Slika 9.** Oprema korišćena za ekstrakciju DNK iz uzoraka tkiva i krpelja; **a-** rotirajuće vodeno kupatilo- *Thermomixer comfort* (Eppendorf™), **b-** Centrifuga – 5415 R (Eppendorf™), **c-** Vortex mešalica - EV-100 (Bio-Rad™)

#### 4.4.3 Molekularne metode u detekciji i identifikaciji vrsta u okviru familije Anaplasmataceae i rodova *Babesia*, *Rickettsia*, *Francisella*, *Bartonella*, *Leishmania*, kao i *Borrelia burgdorferi* s.l. i *Coxiella burnetii*

##### 4.4.3.1 Detekcija *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp., i *Coxiella burnetii* u slezinama šakala

Za detekciju prisustva patogena u ispitivanim uzorcima korišćene su metoda lančane reakcije polimerizacije (eng. "*polymerase chain reaction*" – PCR) i metoda lančane reakcije polimerizacije u realnom vremenu (eng. "*real-time polymerase chain reaction*" – qPCR).

Metoda za simultanu detekciju više patogena u jednoj reakciji (multipleks qPCR) razvijen je u Laboratoriji za kliničku bakteriologiju, parazitologiju, zoonoze i geografsku medicinu, Univerziteta na Kritu (Grčka). Prajmeri i probe su izabrani na osnovu detaljne pretrage dostupne naučne literature. Prikaz korišćenih prajmera i proba dat je u tabeli 1. Za detekciju *Rickettsia* spp., korišćena su dva seta prajmera i proba sa ciljem povećanja senzitivnosti i specifičnosti metode. Više različitih prajmera i proba je korišćeno za identifikaciju vrsta u okviru roda *Anaplasma* (prajmeri i probe za: *A. marginale*, *A. centrale*,

*A. ovis* i *A. phagocytophilum*). U uzorku koji se testira limitirano je istovremeno prisustvo određenih parova prajmera i proba i to: parova za *F. turalensis* i *C. burnetii*, prajmera i proba za detekciju *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* i prajmera i proba za *A. phagocytophilum* i istovremeno prisustvo prajmera i proba za detekciju vrsta u okviru roda *Rickettsia*. Senzitivnost i specifičnost multipleks qPCR-a testirana je za svaki od navedenih patogena ponaosob. Određena je vrednost senzitivnosti od 200 fg DNK po reakciji. Pozitivni uzorci (poreklom od krpelja, krvi ljudi ili životinja) za koje je određena vrsta prisutnog patogena su korišćeni kao pozitivne kontrole. Analize su vršene na uređaju: *C1000 Touch*, *CFX96 thermal cycler* (*Biorad*<sup>TM</sup>). Ukupna zapremina testiranog uzorka bila je 20 µl.

Mešavina polimeraze i svih komponenti neophodnih za qPCR osim prajmera, proba i DNK uzorka koji se ispituje: *SsoFast Probes Supermix* (*Biorad*<sup>TM</sup>), je korišćena u zapremini od 10 µl, zajedno sa 0.6 µl ili 0.9 µl svakog prajmera koncentracije 10 µM (0.6 µl u slučaju prajmera za detekciju prisustva *F. turalensis* i *C. burnetii* a 0.9 µl u slučaju prajmera za detekciju *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *A. phagocytophilum* i *Bartonella* spp.) i 0.4 µl svake probe (10 µM) uz dodatak odgovarajuće količine sterilne vode za uporebu u molekularnim analizama i 2.5 µl izolovane DNK iz slezine koja se testira na prisustvo patogena. Korišćene su dve vrste negativne kontrole (DNK izolovana iz neinficiranih uzoraka i sterilna voda).

**Tabela 1.** Prajmeri i probe korišćeni za detekciju *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp., i *Coxiella burnetii* multiplex Real Time PCR-om u slezinama šakala

Patogen	Prajmer/proba	Sekvence prajmera i proba	Ciljni gen
<i>F. tularensis</i>	FrancF	5'-ACCCACAAGGAAGTGTAAGATTAC-3'	tul4
	FrancR	5'-AGTTGCCCAAGTTTTATCGTTC-3'	
	FrancP	<b>HEX</b> -CAATGGCAGGCTCCAGAAGGTTCTAA	
<i>Anaplasma</i> spp.*	AnapF	5'-AGAGTGGAAATTGGAAGCGAG-3'	msp4
	AnapR	5'-GGTCTCAGTAATGTTAGCGTCG-3'	
	AnapP	<b>FAM</b> -ACAGAAGGTTTGCTACTTTGGCGGA	
<i>A. phagocytophilum</i>	AnapphF	5'-CTGACTTGCCGTATCTCCTTAC-3'	msp4
	AnapphR	5'-CCTCCAGCTATTAAGATATTCAGG-3'	
	AnapphP	<b>FAM</b> -CTCGCCCCTAACCCAGCACA	
<i>C. burnetii</i>	CbF	5'-CGCTGCCAAAGTATCATTAGC-3'	com1
	CbR	5'-GCGGTTTGAAGGGTGATTG-3'	
	CbP	<b>HEX</b> -TGCTCAGTGTCGACGGCCAATTAT	
<i>Rickettsia</i> spp.	Rick1F	5'-GTCGCAAATGTTACGGTAC-3'	gltA
	Rick1R	5'-TTGTTCAAGGTCTTCGTGC-3'	
	Rick1P	<b>Texas Red®</b> -TCTTTCCATTGTGCCATCCAGCCT	
<i>Rickettsia</i> spp.	Rick2F	5'-AATAGCAAGAACCGTAGGIGG-3'	gltA
	Rick2R	5'-ACATAACCTGTCGGTCTCTGA-3'	
	Rick2P	<b>Texas Red®</b> - TGTCAGGTCTTCGTGCATTTCTTTCCA	
<i>Bartonella</i> spp.	BartoITSF	5'-GATGCCGGGAAGGTTTTTC-3'	ITS
	BartoITSR	5'-GCCTGGGAGGACTTGAACCT-3'	
	BartoP	<b>Cy5</b> -GCGCGCGCTTGATAAGCGTG	

#### 4.4.3.2 Detekcija *Leishmania* spp., u slezinama šakala

Za detekciju *Leishmania* spp., korišćen je protokol za qPCR sa upotrebom fluorescentne probe LEIS.P1, čija je ologonukleotidna sekvenca: 5'-CGG TTC GGT GTG TGG CGC C-3' specifična za konzervisani region gena za malu subjedinicu rRNK među različitim vrstama lajšmanija. Proba je na 5' kraju označena bojom FAM, 6-karboksi-fluorescein a na 3' kraju nalazi se „quencher“ boja TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin). Korišćeni su prajmeri: LEIS.U1 (5'-AAG TGC TTT CCC ATC GCA ACT-3') i LEIS.L1 (5'-GA- CGC ACT AAA CCC CTC CAA-3' (Wortmann et al., 2001). Analiza je vršena na qPCR mašini C1000 Touch, CFX96 thermal cycler (Biorad™), (Slika 10.). Ukupna zapremina PCR smeše bila je 20 µl. SsoFast Probes Supermix (Biorad™), je korišćen u zapremini od 10 µl, zajedno sa: 1.6 µl svakog prajmera koncentracije 10 µM, 0.2 µl fluorescentne probe (koncentracije 10 µM), 4.1 µl sterilne vode za uporebu u molekularnim analizama i 2.5 µl izolovane DNK iz slezine koja se testira na prisustvo patogena. DNK soja *Leishmania infantum* izolovanog iz krvi inficiranog čoveka je korišćena kao pozitivna kontrola. Korišćene su dve vrste negativnih kontrola (DNK izolovana iz neinficiranih uzoraka i sterilna voda).



**Slika 10.** Real Time PCR mašina na kojoj su vršene analize u ovoj studiji (C1000 Touch, CFX96 Thermal Cycler, Biorad™), Preuzeto sa: [scientificservices.eu/item/real-time-pcr-detection-system/1902](http://scientificservices.eu/item/real-time-pcr-detection-system/1902)

#### 4.4.3.3 Detekcija *Babesia* spp. i *Borrelia burgdorferi* s.l. u slezinama šakala

Detekcija prisustva DNK *Babesia* spp., i *Borrelia burgdorferi* s.l., u slezinama šakala vršena je konvencionalnim PCR-om po prethodno publikovanim protokolima.

Za detekciju *Babesia* spp., korišćeno je više parova prajmera i protokola. Prajmeri BabF (5'-GCG ATG GCC CAT TCA AGT TT-3') i BabR (5'-CGC CTG CTG CCT TCC TTA GA-3') koji umnožavaju fragment gena za 18S rRNK veličine 146 baznih parova korišćeni su za inicijalnu detekciju (Theodoropoulos et al., 2006). Svi pozitivni uzorci dobijeni ovim protokolom su potom pripremani za sekvenciranje umnožavanjem fragmenata gena za 18S rRNK i ssu-rDNK. Fragment gena za 18S rRNK dužine 487 bp je umnožavan prajmerima BJ1 (5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3') i BN2 (5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3') (Casati et al., 2006), dok je fragment dužine 1600 bp umnožen korišćenjem prajmera Nbab-1F (5'-AAG CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG CTT TT-3') i Nbab-1R (5'-CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC-3') (Oosthuizen et al., 2008). Fragment dužine oko 410bp gena za ssu-rDNK umnožavan je prajmerima PIRO-A (5'- AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGG G -3') i PIRO-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3') (Olmeda et al., 1997), Detekcija *Borrelia burgdorferi* s.l., vršena je umnožavanjem intergenskog regiona 5S-23S rRNK „nested“ protokolom (Masuzawa et al., 1996; Postić et al., 1994). Korišćeni su prajmeri komplementarni 3' kraju 5S rRNK (*rrf*) (RIS1 (5'-CTG CGA GTT CGC GGG AGA-3'), i RIS3; 5'-GGA GAG TAG GTT ATT GCC AGG-3') kao i 5' kraju 23S rRNK (*rri*) (RIS2; 5'-TCC TAG GCA TTC ACC ATA-3') i (RIS4; 5'-GAC TCT TAT TAC TTT GAC C-3').

Prikaz prajmera i temperatura na kojima je vršena hibridizacija prajmera u protokolima za detekciju DNK *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., konvencionalnim PCR-om u slezinama šakala dat je u tabeli 2.

**Tabela 2.** Prajmeri korišćeni za konvencionalni PCR u detekciji *Babesia* spp., i *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Ciljni gen	Veličina fragmenta	Hibridizacija (°C)
BabR BabF	CGCCTGCTGCCCTTCCTTAGA GCGATGGCCCATTC AAGTTT	18S rRNA <i>Babesia</i> spp.	146 bp	56
PIRO-A PIRO-B	AATACCCAATCCTGACACAGGG TTAAATACGAATGCCCCAAC	ssu-rDNK <i>Babesia</i> spp.	408 bp	52
BJ1 BN2	GTCTTGTAATTGGAATGATGG TAGTTTATGGTTAGGACTACG	18S rRNA <i>Babesia</i> spp.	487 bp	54
Nbab-1F Nbab-1R	AAGCCATGCATGTCTAAGTATA AGCTTTT CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAA GGTTCAC	18S rRNA <i>Babesia</i> spp.	1600 bp	55
RIS1 RIS2 RIS3 RIS4	CTGCGAGTTCGCGGGAGA TCCTAGGCATTCACCATA GGAGAGTAGGTTATTGCCAGG GACTCTTACTTTGACC	5S-23S rRNK intergenski region <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	~250 bp	55

#### 4.4.3.4 Detekcija i identifikacija vektorima prenosivih patogena u krpeljima sakupljenim sa šakala

Za detekciju DNK patogena u krpeljima, korišćena je metodologija konvencionalnog PCR-a.

Detekcija DNK *Babesia* spp., i *Borrelia burgdorferi* s.l., vršena je po protokolu koji je korišćen i za detekciju prisustva ovih patogena u tkivu slezine šakala.

Prajmeri EHR16SD (5'-GGT ACC YAC AGA AGA AGT CC-3') i EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TIT ACA GC-3'), koji se koriste za umnožavanje fragment gena za 16S rRNK u dužini od 345 bp kod vrsta familije Anaplasmataceae, korišćeni su za dokazivanje prisustva DNK rodova *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* po prethodno publikovanim protokolima (Brown et al., 2001; Hodžić et al., 2015b; Inokuma et al., 2001; Parola et al., 2000).

Pozitivni uzorci su potom analizirani korišćenjem protokola za „nested“ PCR za detekciju *A. phagocytophilum* upotrebom prajmera dizajniranih na osnovu visoko konzervativnog regiona *p44/msp2* paraloga (p3726F; 5'-GCT AAG GAG TTA GCT TAT GA-3'), (p3761F; 5'-CTG CTC T(T/G)G CCA A(A/G)A CCT C-3'), (p4183R ; 5'-CAA TAG T(C/T)T TAG CTA GTA ACC-3'), i (p4257R ; 5'-AGA AGA TCA TAA CAA GCA TTG-3') (Ohashi et al., 2005).

Prajmeri Rp CS.877p (5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3') i Rp CS.1258n (5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3') koji služe za umnožavanje fragmenta gena za citrat sintazu *Rickettsia* spp., veličine 380-397 bp (Eremeeva et al., 1994; Ishikura et al., 2003; Regnery et al., 1991; Roux et al., 1997) korišćeni su za dokazivanje prisustva riketecija u ispitivanim uzorcima.

Prajmeri TUL4-435 (5'-GCT GTA TCA TCA TTT AAT AAA CTG CTG-3') i TUL4-863; (5'-TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT-3') koji umnožavaju fragment od 400bp gena koji kodira lipoprotein od 17 kDa koji je konzerviran među različitim sojevima *F. tularensis* (Sjöstedt et al., 1997) korišćeni su za dokazivanje njenog prisustva.

Za detekciju vrsta roda *Bartonella* korišćeni su prajmeri Urbarto1 (5'-CTT CGT TTC TCT TTC TTC A-3') i Urbarto2 (5'-CTT CTC TTC ACA ATT TCA AT-3') koji umnožavaju fragment 16S-23S intergenskog regiona (ITS), veličine 639 bp po prethodno publikovanom protokolu (Raoult et al., 2006).

Prajmeri CB-1 (5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3') i CB-2 (5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3') koji umnožavaju 257 bp dugačak fragment gena za kodiranje superoksid dismutaze *C. burnetii* korišćeni su za dokazivanje njenog prisustva u ispitivanim uzorcima (Spyridaki et al. 1998).

Prikaz prajmera korišćenih u detekciji prisustva i identifikaciji vrsta familije Anaplasmataceae, *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp., i *Coxiella burnetii* u krpeljima sa šakala predstavljen je u tabeli 3.



**Tabela 3.** Prajmeri korišćeni za konvencionalni PCR u detekciji DNK patogena u krpeljima

Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Ciljni gen	Duži na fragmenta	Temperatura hibridizacije prajmera (°C)
EHR16SR EHR16SD	TAGCACTCATCGTITACAGC GGTACCYACAGAAGAAGTCC	16S rRNA fam. Anaplasmataceae	345 bp	53
P3726F p4257R p3761F p4183R	GCTAAGGAGTTAGCTTATGA AGAAGATCATAACAAGCATTG CTGCTCT(T/G)GCCAA(A/G)ACCTC CAATAGT(C/T)TTAGCTAGTAACC	p44/msp2 hipervarijabilni region A. <i>phagocytophilum</i>	536 bp 411 bp	58
Rp CS.877p RpCS.1258n	GGGGGCTGCTCACGGCGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	citrat sintaza <i>Rickettsia</i> spp.	380-397 bp	56
TUL4-435 TUL4-863	GCTGTATCATCATTTAATAAACTGCTG TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT	Lipoprotein 17-kDa	400 bp	55
Urbarto1 URBarto2	CTTCGTTTCTCTTTCTTCA CTTCICTTCACAATTTCAAT	16S-23S ITS <i>Bartonella</i> spp.	639 bp	45
CB-1 CB-2	ACTCAACGCACTGGAACCGC TAGCTGAAGCCAATTCGCC	superoksid dismutaza	257 bp	55

Za konvencionalni PCR korišćen je uređaj: *Veriti Thermal Cycler*, (*Applied Biosystems*, USA), (slika 11.). Za pripremu PCR reakcije korišćena je mešavina polimeraze i svih komponenti neophodnih za reakcionu smešu osim prajmera i DNK uzorka koji se ispituje: *PCR Master Mix (2X)*, (*Thermo Fisher Scientific™*), a reakciona smeša je pripremana po preporuci proizvođača hemikalija. To je podrazumevalo: 25 µl *PCR Master Mix (2X)*, po 3 µl svakog prajmera koncentracijem 10 µM, izolovanu DNK uzorka koji se ispituje (do 6 µl) i dodatak vode za molekularne analize do ukupne zapremine PCR smeše od 50 µl.

Detektovani pozitivni uzorci krpelja po prethodnom protokolu su zatim ponovo umnožavani korišćenjem jedinstvene komercijalne mešavine polimeraza: *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (*Thermo Fisher Scientific™*). Zbog malog stepena greške ovih polimeraza

prilikom ugradnje nukleotida u lanac koji sintetišu, dobijaju se PCR produkti pogodni za sekvenciranje.



**Slika 11.** PCR mašina za konvencionalni PCR (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems™) na kojoj su vršene analize u ovoj studiji

PCR reakcija prilikom korišćenja mešavine polimeraza: *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo Fisher Scientific™) formirana je od sledeći konstituenata: *10X High Fidelity PCR* pufer sa 10 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP smeša nukleotidnih baza (2 mM svake baze), po 0.3-1 mM oba prajmera, izolovanu DNK uzorka koji se ispituje, zatim mešavina polimeraza: *High Fidelity PCR Enzyme Mix* u količini od 1.25-2.5 u po reakciji i vodu za molekularne analize do ukupne zapremine reakcije od 50 µl. Uslovi pod kojima je vršeno umnožavanje fragmenata gena testiranih patogena u mašini za konvencionalni PCR, prilagođeni su detekciji prisustva DNK svakog patogena ponaosob. Uslovi su prvo postavljeni po preporuci proizvođača hemikalija. U slučaju kada je korišćena mešavina polimeraze i svih komponenti neophodnih za reakcionu smešu osim prajmera i DNK uzorka koji se ispituje: *PCR Master Mix (2X)*, (Thermo Fisher Scientific™) uslovi su bili sledeći: Inicijalna denaturacija u trajanju od 1 do 3 minuta na 95°C, potom 30-40 ciklusa pod uslovima: denaturacija 95°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacija prajmera na temperaturi za 5°C

nižoj od tačke topljenja prajmera (izračunata za sve korišćene prajmere) u trajanju od 30 sekundi, elongacija 72°C u trajanju od 1 minut po kb ciljnog fragmenta. Završna elongacija je vršena na 72°C u trajanju od 5 do 10 minuta.

Kada je za reakcionu smešu korišćena mešavina polimeraza: *High Fidelity PCR Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific™)*, početni uslovi za umnožavanje fragmenata gena testiranih patogena su bili: Inicijalna denaturacija u trajanju od 1 do 3 minuta na 94°C, potom 25-35 ciklusa pod uslovima: denaturacija 94°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacija prajmera na temperaturi za 5°C nižoj od tačke topljenja prajmera u trajanju od 30 sekundi, elongacija 72°C u trajanju od 1 minut po kb ciljnog fragmenta i završna elongacija na 72°C u trajanju od 5 do 10 minuta. Za detekciji svih patogena obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom čije je prisustvo dokazivano metodologijom konvencionalnog PCR-a vršena je optimizacija protokola do postizanja optimalnih uslova za izvođenje reakcije. Pored matematičkog određivanja optimalne temperature za vezivanje prajmera, rađen je gradijent temperature optimalne za hibridizaciju svih korišćenih prajmera sa pozitivnim kontrolama za sve testirane patogene.

Elektroforetsko razdvajanje dobijenih PCR produkata vršeno je korišćenjem aparature za horizontalnu gel elektorforezu, *Sub-Cell, GT, Bio-Rad™*, (Slika 12.). Za izradu gelova korišćena je *SeaKem, LE (Lonza™)* agarozna sa učešćem od 1-2% a bojenje vršeno etidijum bromidom (*Etidium Bromide Solution, 10mg/ml, Invitrogen™*) ili sa bojom: *Midori Green Advance (Nippon Genetics™)*. Vizuelizacija umnoženih PCR produkata vršena je pod UV svetlom u komori za ovu namenu (*BioDocAnalyze Darkhood, Biometra™*).



**Slika 12.** Sistem za horizontalnu gel elektroforezu (*Sub-Cell, GT, Bio-Rad<sup>TM</sup>*) korišćen u toku eksperimentalnog rada

#### 4.5 RFLP metoda korišćena u identifikaciji vrsta roda *Anaplasma* i vrsta u okviru *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa

Inicijalna determinacija vrsta *B. burgdorferi* s.l. kompleksa vršena je na osnovu polimorfizma dužina restrikcionih fragmenata (eng. "restriction fragment length polymorphism-RFLP") produkata PCR-a (Schwartz et al., 1992). Korišćeni su restrikcioni enzimi *MseI* i *DraI* po prethodno publikovanom protokolu (Güner et al., 2003; Postić et al., 1994).

U slučaju uzoraka tkiva šakala i krpelja pozitivnih na *Anaplasma* spp., pored sekvenciranja PCR produkata, primenjena je i RFLP metoda uz upotrebu komercijalno dostupnih restrikcionih enzima: *HaeIII* (*Fermentas<sup>TM</sup>*) i *ApoI* (*New England Biolabs<sup>TM</sup>*) na sve umnožene *msp4* fragmente gena. Metoda omogućava uvid u postojanje različitih vrsta u okviru *Anaplasma* spp, (*A. marginale*, *A. centrale* i *A. ovis*) (Psaroulaki et al., 2009).

#### 4.6 Sekvenciranje pozitivnih uzoraka

Za prečišćavanje i sekvencioniranje PCR produkata, pozitivnih na prisustvo DNK patogena koji su ispitivani, korišćena je komercijalna usluga firme Macrogen Europe (The Netherlands). Obrada dobijenih sekvenci urađena je u programima adekvatnim za bioinformatičku analizu (FinchTV™, BioEdit™, MEGA™). Identifikacija vrsta patogena utvrđena je na osnovu poređenja dobijenih obrađenih sekvenci sa do sada opisanim i deponovanim sekvencama u banci gena (National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] - [cited 2018 Nov 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

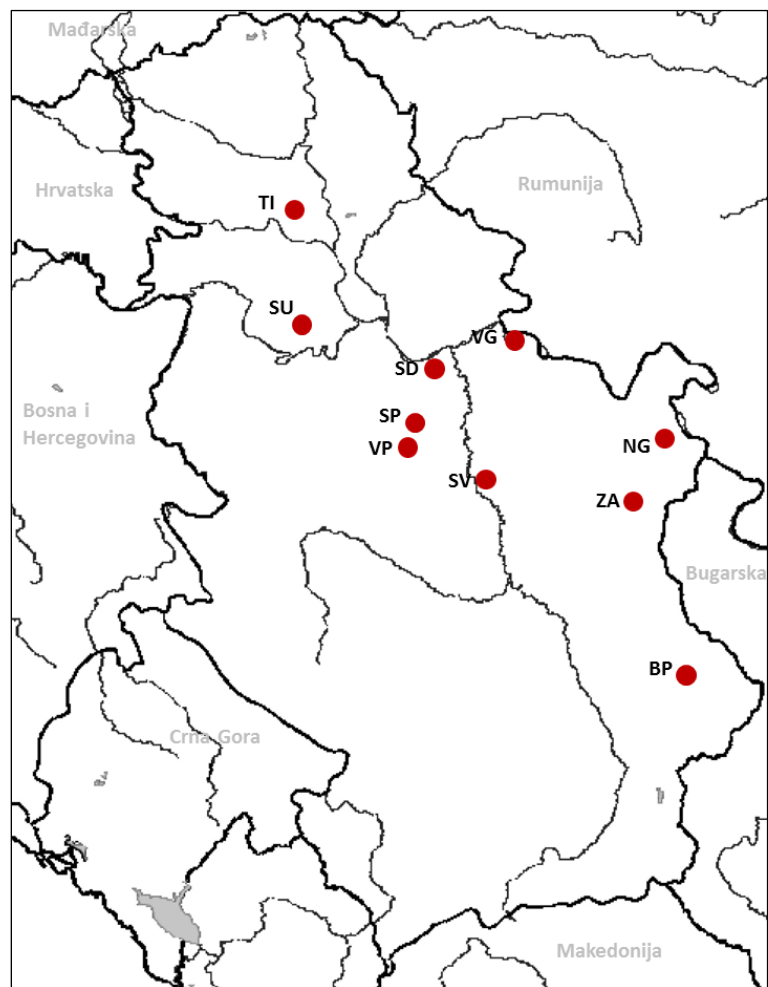
#### 4.7 Statistička analiza rezultata

Dobijeni rezultati istraživanja u okviru doktorske disertacije obrađeni su u statističkim programima (SPSS v.17.0,(IBM Corporation™) Excel, (Microsoft Corporation™)). Korišćeni su deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, medijana, minimalna, maksimalna vrednost,..), Hi-kvadrat test.

## 5. REZULTATI

### 5.1 Sakupljeni uzorci tkiva šakala

Uzorci tkiva slezine šakala analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji sakupljeni su tokom perioda od četiri godine (januar 2010 god. – februar 2013 god.) Za to vreme sakupljeni su uzorci od ukupno 216 jedinki šakala poreklom sa 10 lokaliteta širom teritorije Republike Srbije (slika 13).

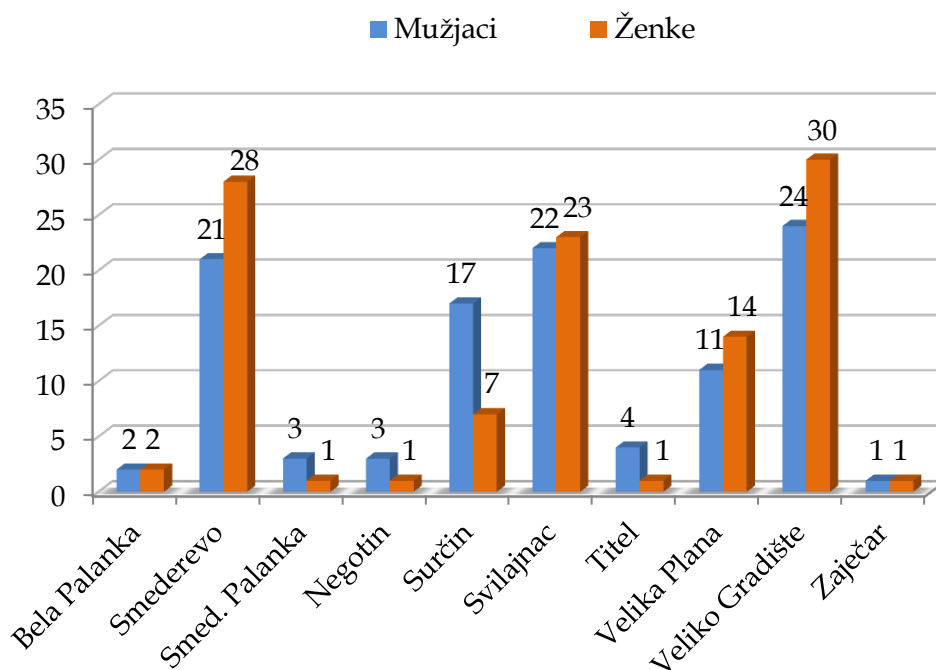


**Slika 13.** Mapa Srbije sa lokalitetima sa kojih su sakupljeni uzorci tkiva šakala. TI- Titel, SU- Surčin, VG- Veliko Gradište, SD- Smederevo, SP- Smederevska Palanka, VP- Velika Plana, SV- Svilajnac, NG- Negotin, ZA- Zaječar, BP- Bela Palanka

Od 216 analiziranih šakala, 108 je bilo muškog a 108 ženskog pola. Distribucija sakupljenih uzoraka u odnosu na pol životinja po lokalitetima prikazana je u tabeli 4 i na grafikonu 1.

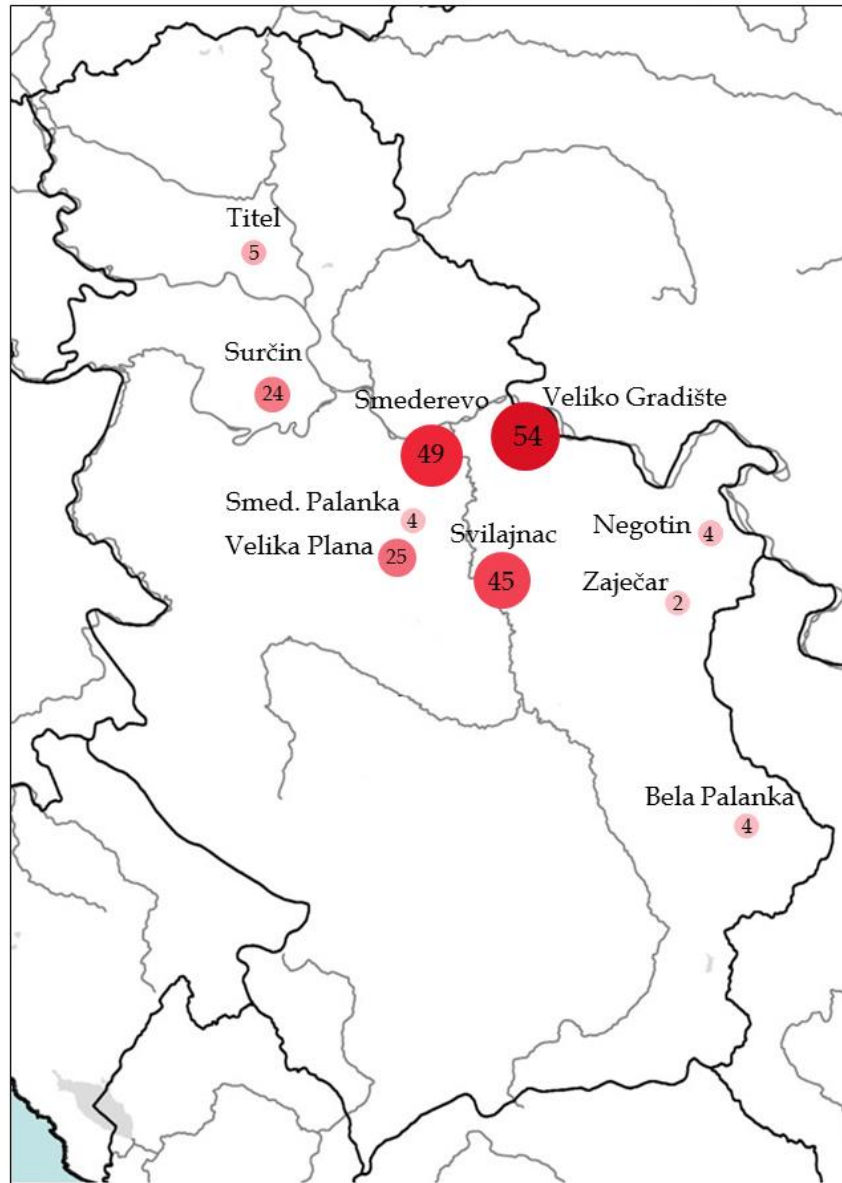
**Tabela 4.** Distribucija polova analiziranih šakala u odnosu na lokalitet izlovljavanja

Lokalitet	Mužjaci	Ženke	Ukupno
Bela Palanka	2	2	4
Smederevo	21	28	49
Smederevska Palanka	3	1	4
Negotin	3	1	4
Surčin	17	7	24
Svilajnac	22	23	45
Titel	4	1	5
Velika Plana	11	14	25
Veliko Gradište	24	30	54
Zaječar	1	1	2
<b>Ukupno</b>	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>216</b>



**Grafikon 1.** Prikaz distribucije polova analiziranih šakala u odnosu na lokalitet izlovljavanja

Najveći broj prikupljenih uzoraka (147/216, 68,1%) potiče sa tri lokaliteta: Veliko Gradište (54/216, 25%), Smederevo (49/216, 22,7%), Svilajnac (44/216, 20,4%).



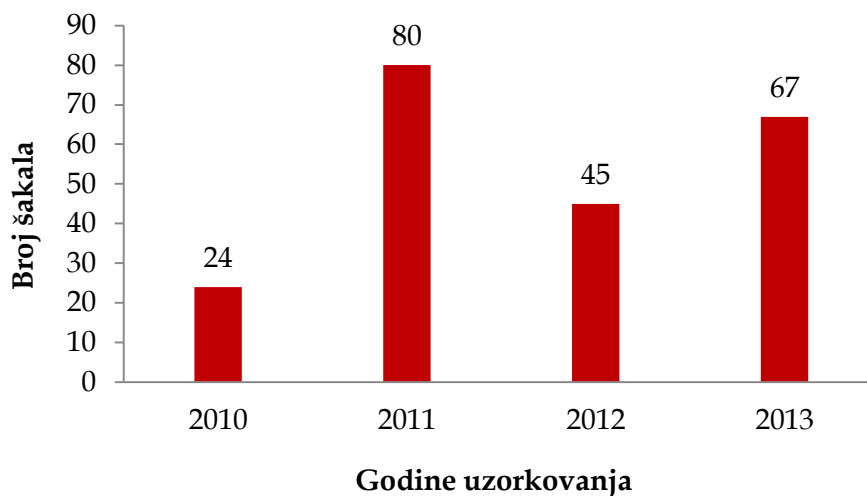
**Slika 14.** Prikaz veličine uzorka analiziranih šakala po lokalitetima (veličina crvenog kruga i intezitet boje u korelaciji su sa veličinom uzora)



Preostali uzorci (69/216, 31,9%) sakupljeni su na sedam lokaliteta: Velika Plana (25/216, 11,6%), Surčin (24/216, 11,1%), Titel (5/216, 2,3%), Bela Palanka, Smederevska Palanka, Negotin (po 4 uzorka, 12/216, 5,6%) i Zaječar (2/216, 0,9%). Srednja vrednost sakupljenog broja uzoraka po lokalitetima iznosi 18,2 a medijana 4,5. Vizuelni prikaz veličine uzorka dat je na slici 14. Najveći broj analiziranih uzoraka sakupljen je tokom 2011 godine (80/216, 37%) a najmanji tokom 2010 godine (24/216, 11,1%). Srednja vrednost sakupljenog broja uzoraka po godinama (od 2010 do 2013 god.) iznosi 54 a medijana 56. Prikaz broja sakupljenih uzoraka po godinama dat je u tabeli 5 i na grafikonu 2.

**Tabela 5.** Broj analiziranih šakala po godinama izlovljavanja

Godina	Broj uzoraka	%
2010	24	11,11
2011	80	37,04
2012	45	20,83
2013	67	31,02
<b>Ukupno</b>	<b>216</b>	<b>100</b>



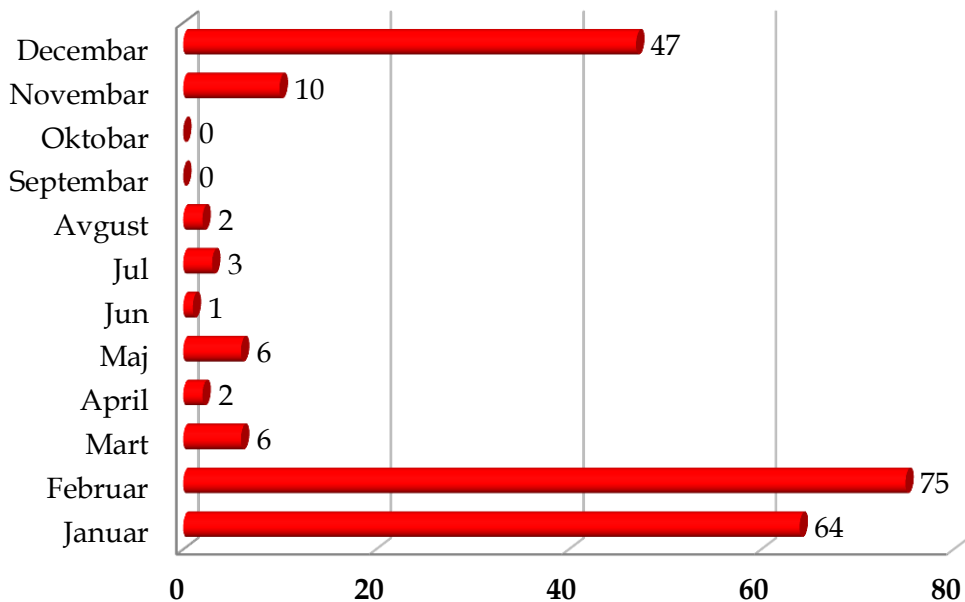
**Grafikon 2.** Prikaz broja analiziranih šakala po godinama izlovljavanja

Od ukupnog broja uzoraka najveći broj je sakupljen za vreme zimske sezone lova od novembra do februara (196/216, 90,7%). Septembar i oktobar su meseci tokom kojih nije

sakupljen ni jedan uzorak tokom četiri godine sakupljanja. Broj uzoraka sakupljen po mesecima dat je u tabeli 6, a grafički prikaz na grafikonu 3.

**Tabela 6.** Broj analiziranih šakala po mesecima izlovljavanja

Mesec	Broj šakala	%
Januar	64	29,63
Februar	75	34,72
Mart	6	2,78
April	2	0,93
Maj	6	2,78
Jun	1	0,46
Jul	3	1,39
Avgust	2	0,93
Septembar	0	0
Oktobar	0	0
Novembar	10	4,63
Decembar	47	21,76
<b>Ukupno</b>	<b>216</b>	<b>100</b>



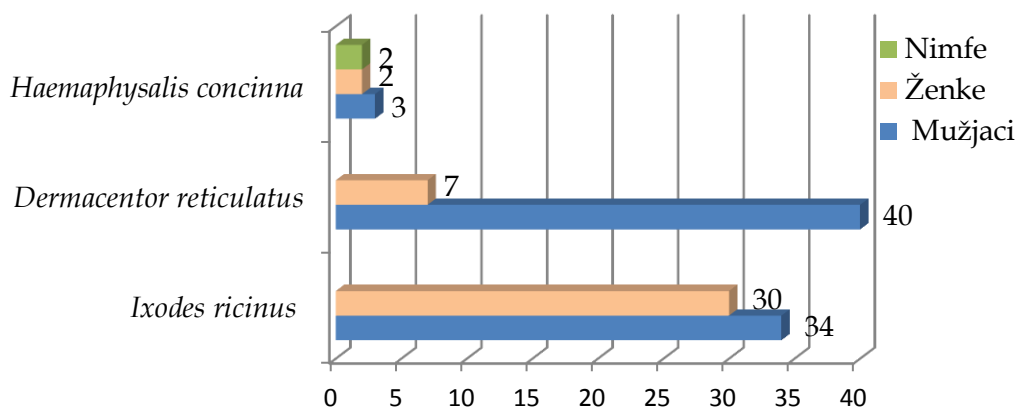
**Grafikon 3.** Prikaz broja analiziranih šakala po mesecima izlovljavanja

## 5.2 Sakupljeni krpelji sa odstreljenih šakala

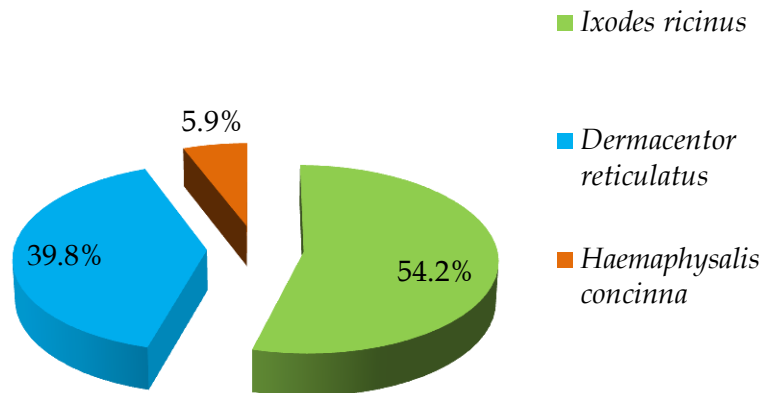
Krpelji analizirani u ovoj studiji sakupljeni su sa odstreljenih šakala u periodu od aprila 2012 do februara 2013 god. Ukupno je sakupljeno 118 jedinki krpelja. U analiziranom uzorku identifikovane su tri vrste: *I. ricinus* (64/118, 54.2%), *D. reticulatus* (47/118, 39.8%) i *H. concinna* (7/118, 5.9%). Sakupljene su dve nimfe vrste *H. concinna* dok su svi preostali krpelji bili adulti. Broj sakupljenih krpelja i odnos između polova i razvojnih stadijuma prikazan je u tabeli 7, i predstavljen na grafikonu 4, a procentualni odnos među identifikovanim vrstama krpelja prikazan je na grafikonu 5.

**Tabela 7.** Identifikovane vrste i broj sakupljenih krpelja sa odstreljenih šakala

Pol, stadijum	Vrste sakupljenih krpelja			Σ
	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Haemaphysalis concinna</i>	
Mušjaci	34	40	3	77
Ženke	30	7	2	39
Nimfe			2	2
<b>Ukupno</b>	<b>64</b>	<b>47</b>	<b>7</b>	<b>118</b>



**Grafikon 4.** Prikaz broja sakupljenih nimfi, mušjaka i ženki u okviru identifikovanih vrsta krpelja

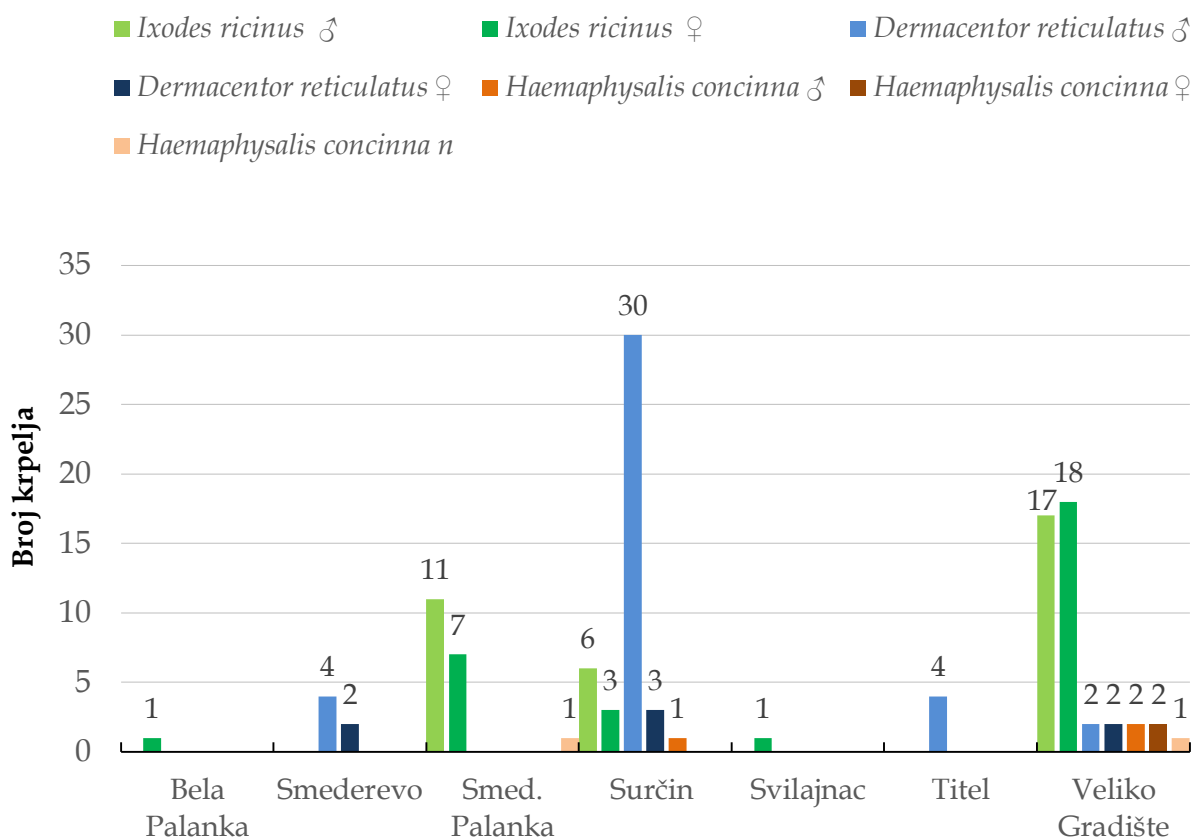


**Grafikon 5.** Procentualna zastupljenost vrsta krpelja u analiziranom uzorku

Od 10 lokaliteta sa kojih potiču odstreljeni šakali, krpelji su sakupljeni na sedam: Bela Palanka, Smederevo, Smederevska Palanka, Surčin, Svilajnac, Titel, Veliko Gradište (tabela 8, grafikon 6).

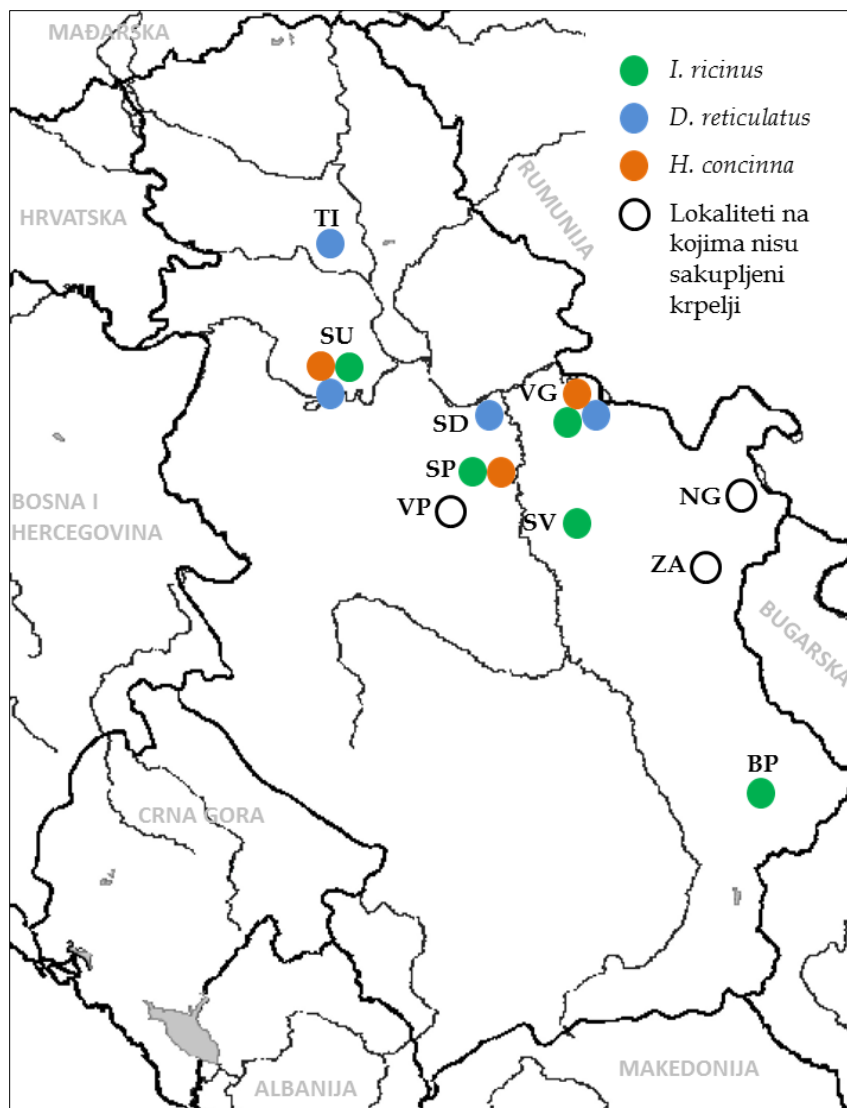
**Tabela 8.** Distribucija razvojnih stadijuma i polova među sakupljenim vrstama krpelja po lokalitetima.

Lokalitet	Vrsta krpelja i pol							Σ
	<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Dermacentor reticulatus</i>		<i>Haemaphysalis concinna</i>			
	mužjaci	ženke	mužjaci	ženke	mužjaci	ženke	nimfe	
Bela Palanka		1						1
Smederevo			4	2				6
Smed. Palanka	11	7					1	19
Surčin	6	3	30	3	1			43
Svilajnac		1						1
Titel			4					4
Veliko Gradište	17	18	2	2	2	2	1	44
<b>Ukupno</b>	<b>34</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>118</b>



**Grafikon 6.** Prikaz razvojnih stadijuma i polova u okviru identifikovanih vrsta krpelja po lokalitetima

Krpelji vrste *I. ricinus* su sakupljeni sa šakala na pet lokaliteta (Veliko Gradište, Smederevska Palanka, Svilajnac, Surčin, Bela Palanka), *D. reticulatus* na četiri (Veliko Gradište, Surčin, Smederevo, Titel) dok su jedinice vrste *H. concinna* sakupljene sa šakala odstreljenih na tri lokaliteta (Veliko Gradište, Surčin, Smederevska Palanka). Na dva lokaliteta (Surčin, Veliko Gradište) utvrđeno je prisustvo sve tri vrste krpelja *I. ricinus*, *D. reticulatus* i *H. concinna* dok sa lokaliteta Smederevska Palanka potiču jedinice dve vrste *I. ricinus* i *H. concinna*. Sa preostala četiri lokaliteta sakupljene su jedinice po jedne vrste krpelja i to *I. ricinus* na lokalitetima Svilajnac i Bela Palanka, a *D. reticulatus* na lokalitetima Titel i Smederevo. Prikaz distribucije vrsta krpelja sakupljenih sa šakala po lokalitetima dat je na slici 15.



**Slika 15.** Mapa sa lokalitetima i distribucijom vrsta krpelja sakupljenih sa izlovljenih šakala. TI- Titel, SU- Surčin, VG- Veliko Gradište, SD- Smederevo, SP- Smederevska Palanka, VP- Velika Plana, SV- Svilajnac, NG- Negotin, ZA- Zaječar, BP- Bela Palanka Zeleni kružići označavaju lokalitete na kojima su sakupljeni krpelji vrste *Ixodes ricinus*, plavi kružići lokalitete na kojima su sakupljeni krpelji vrste *Dermacentor reticulatus*, dok narandžasti kružići predstavljaju lokalitete na kojima su sakupljeni krpelji vrste *Haemaphysalis concinna*.

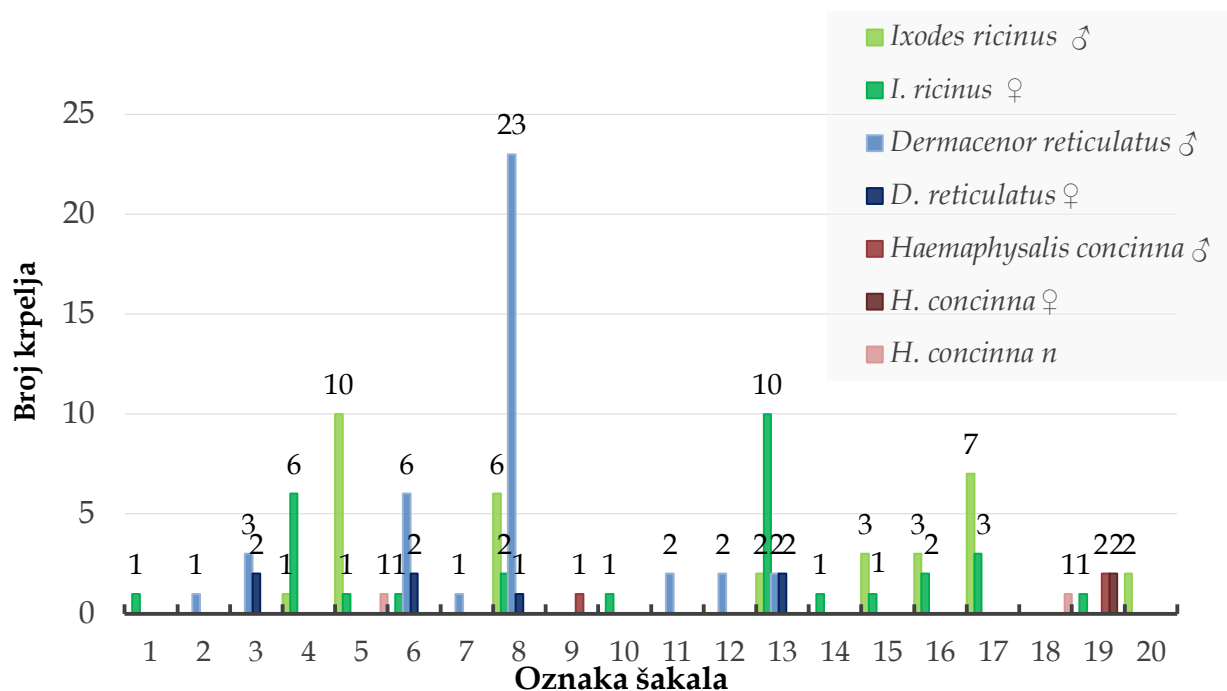
### 5.2.1 Infestacija šakala krpeljima

Ukupno 118 krpelja sakupljeno je sa 20 infestiranih životinja. Broj sakupljenih krpelja sa infestiranih životinja kretao se od jednog do 32 krpelja dok je srednja vrednost bila 5,9 a

medijana tri. Od 20 šakala sa kojih su sakupljeni krpelji, 15 je bilo infestirano samo sa jednom vrstom krpelja (sa osam šakala sakupljeni su krpelji vrste *I. ricinus*, pet šakala je bilo infestirano jedinkama vrste *D. reticulatus* a dva šakala jedinkama vrste *H. concinna*). Pet šakala je bilo infestirano jedinkama dve vrste krpelja istovremeno (tri životinje vrstama *I. ricinus* i *D. reticulatus* a dva šakala vrstama *I. ricinus* i *H. concinna*) (tabela 9, grafikon 7).

**Tabela 9.** Prikaz broja krpelja sakupljenih sa infestiranih šakala

Oznaka jedinke šakala	Vrsta, razvojni stadijum i broj sakupljenih krpelja							Ukupno
	<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Dermacentor reticulatus</i>		<i>Haemaphysalis concinna</i>			
	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke	Nimfe	
1		1						1
2			1					1
3			3	2				5
4	1	6						7
5	10	1					1	12
6		1	6	2				9
7			1					1
8	6	2	23	1				32
9							1	1
10		1						1
11			2					2
12			2					2
13	2	10	2	2				16
14		1						1
15	3	1						4
16	3	2						5
17	7	3						10
18							1	1
19		1			2	2		5
20	2							2



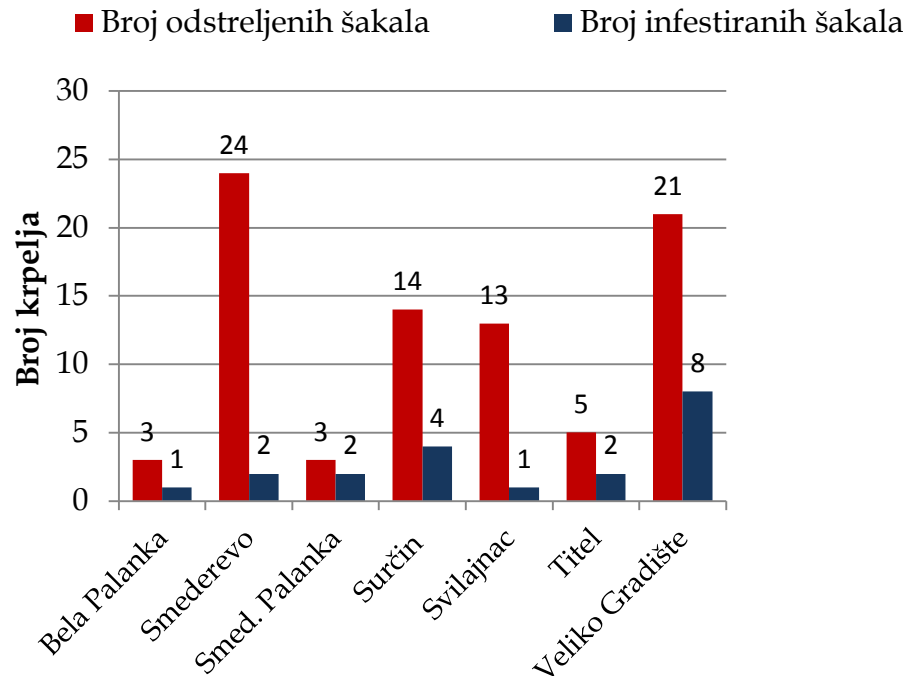
**Grafikon 7.** Prikaz infestiranosti šakala pojedinim vrstama krpelja u odnosu na stadijum i pol krpelja

Procenat šakala infestiranih krpeljima po lokalitetima kretao se od 7.7% na lokalitetu Svilajnac do 66.7% na lokalitetu Smederevska Palanka. Srednja vrednost broja infestiranih šakala po lokalitetu bila je 31.8% a medijana 33,3% (tabela 10, grafikon 8).

**Tabela 10.** Infestiranosti šakala krpeljima po lokalitetima (\* prikazan je broj odstreljenih šakala u periodu u kom su sakupljani krpelji: od aprila 2012. do februara 2013 godine).

Lokalitet	Broj odstreljenih šakala*	Broj infestiranih šakala	Procenat infestiranih šakala (%)
Bela Palanka	3	1	33.3
Smederevo	24	2	8.3
Smed. Palanka	3	2	66.7
Surčin	14	4	28.6
Svilajnac	13	1	7.7
Titel	5	2	40
Veliko Gradište	21	8	38.1
<b>Ukupno</b>	<b>83</b>	<b>20</b>	<b>20/83 (24,1)</b>





**Grafikon 8.** Prikaz odnosa neinfestiranih i infestiranih šakala po lokalitetima

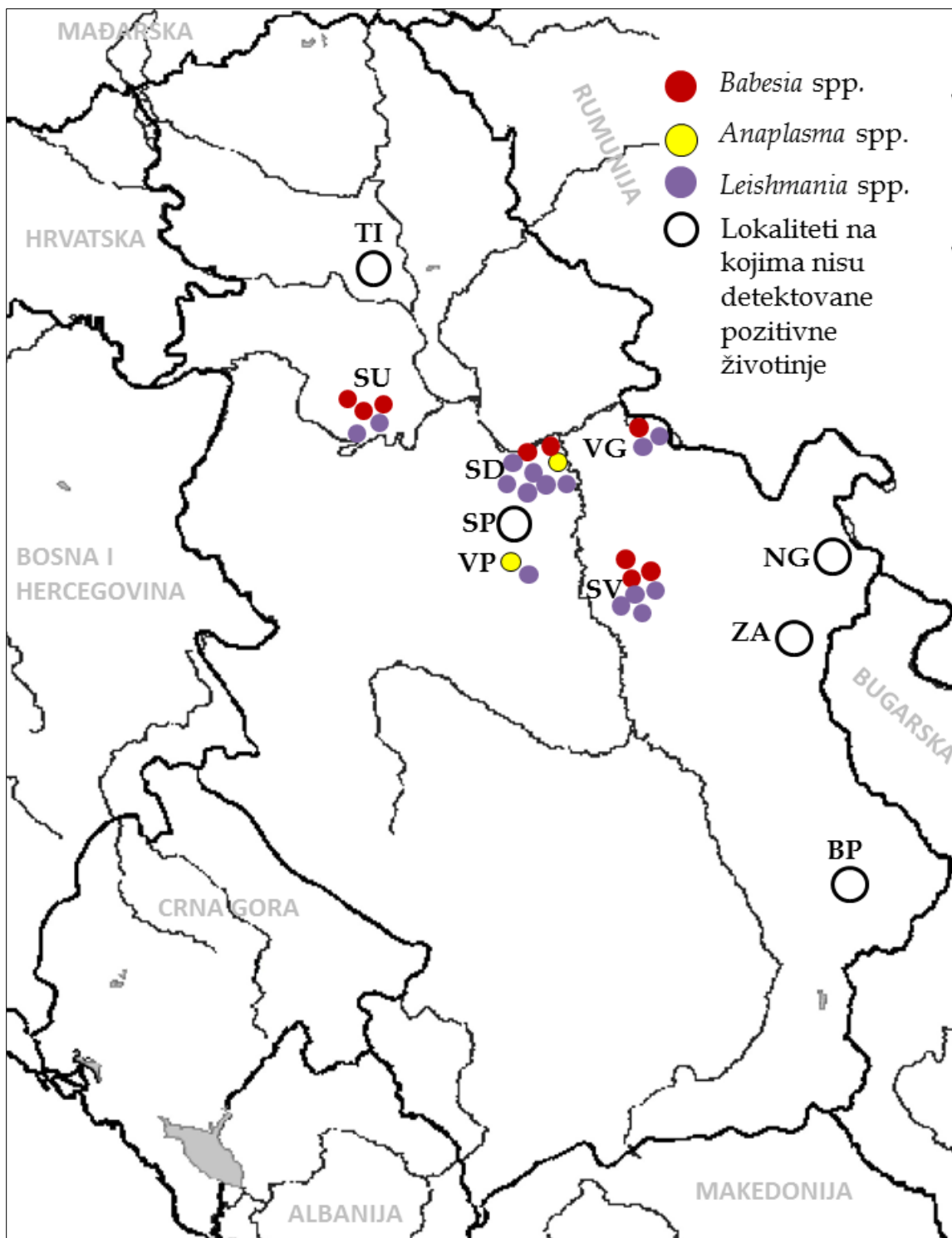
### 5.3 Molekularna detekcija patogena u analiziranim uzorcima

#### 5.3.1 Nalaz patogena u slezinama šakala

U okviru ove doktorske disertacije molekularnim metodama ukupno je testirano 216 uzoraka tkiva selzine šakala na prisustvo vektorima prenosivih uzročnika zoonoza: *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burneti* i *Leishmania* spp.. Od ukupnog broja testiranih uzoraka devet šakala (9/216, 4,2%) je bilo pozitivno na prisustvo DNK *Babesia* spp., dve životinje su pokazale pozitivan rezultat na prisustvo DNK *Anaplasma* spp. (2/216, 0,9%) dok je 15 jedinki bilo pozitivno na prisustvo *Leishmania* spp. (15/216, 6,9%). Zbirni prikaz rezultata detekcije prisustva DNK patogena u slezinama šakala dat je u tabeli 11, a prostorna distribucija pozitivnih životinja po lokalitetima na slici 16.

**Tabela 11.** Distribucija analiziranih šakala i prevalencija patogena detektovanih po mesecima, godinama, lokalitetima i polu šakala

Mesec izlovljavanja	Broj analiziranih šakala	Prevalencija patogena detektovanih u analiziranim šakalima		
		<i>Babesia</i> spp. (%)	<i>Anaplasma</i> spp. (%)	<i>Leishmania</i> spp. (%)
Jan	64	4 (6,3)	0	6 (9,4)
Feb	75	2 (2,7)	1 (1,3)	4 (5,3)
Mar	6	0	0	0
Apr	2	0	0	0
Maj	6	0	0	0
Jun	1	0	0	0
Jul	3	0	0	0
Avg	2	0	0	0
Sep	0	0	0	0
Okt	0	0	0	0
Nov	10	0	0	0
Dec	47	3 (6,4)	1 (2,1)	5 (10,6)
<b>Godina izlovljavanja</b>				
2010	24	1 (4,2)	0	2 (8,3)
2011	80	3 (3,8)	0	1 (1,3)
2012	45	2 (4,4)	1 (2,2)	2 (4,4)
2013	67	3 (4,5)	1 (1,5)	10 (14,9)
<b>Lokalitet izlovljavanja</b>				
Bela Palanka	4	0	0	0
Smederevo	49	2 (4,1)	1 (2)	6 (12,2)
Smed. Palanka	4	0	0	0
Negotin	4	0	0	0
Surčin	24	3 (12,5)	0	2 (8,3)
Svilajnac	45	3 (6,8)	0	4 (9,1)
Titel	5	0	0	0
Velika Plana	25	0	1 (4)	1 (4)
Veliko Gradište	54	1 (1,9)	0	2 (3,7)
Zaječar	2	0	0	0
<b>Pol životinje</b>				
Mušjaci	108	6 (5,6)	1 (0,9)	11 (10,2)
Ženke	108	3 (2,8)	1 (0,9)	4 (3,7)
<b>Ukupno</b>	<b>216</b>	<b>9 (4,2)</b>	<b>2 (0,9)</b>	<b>15 (6,9)</b>



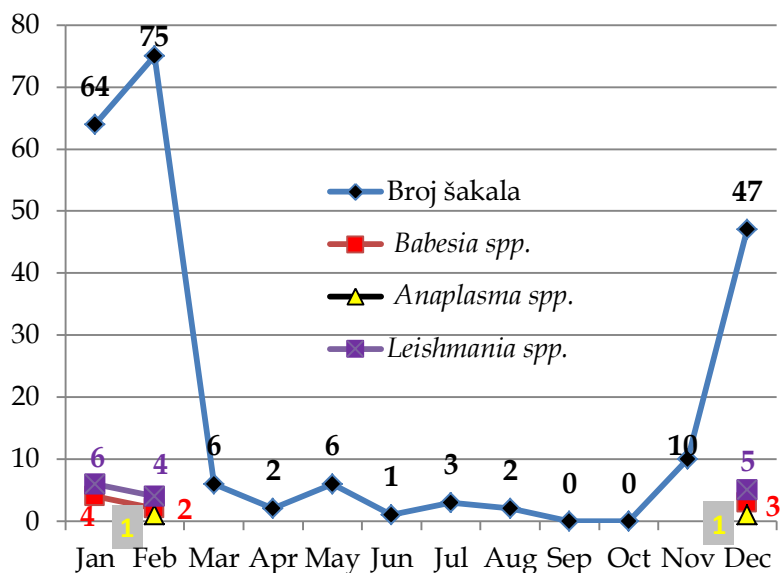
**Slika 16.** Distribucija šakala pozitivnih na prisustvo DNK *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. i *Leishmania* spp., po lokalitetima (Svaki kružić na mapi predstavlja po jednu pozitivnu životinju)

U analiziranim slezinama šakala nije detektovano prisustvo *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., i *Coxiella burneti*.

Svi uzorci pozitivni na prisustvo DNK testiranih patogena sakupljeni su od životinja izlovljenih u periodu od decembra do februara kada je i izlovljen najveći broj životinja (186/216, 86,1%) (Tabela 12, Grafikon 9.).

**Tabela 12.** Broj šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena po mesecima uzorkovanja

Mesec	Broj analiziranih šakala	Uzorcii slezine pozitivni na prisustvo DNK patogena		
		<i>Babesia</i> spp. (%)	<i>Anaplasma</i> spp. (%)	<i>Leishmania</i> spp. (%)
Januar	64	4 (6,3)	0 (0)	6 (9,4)
Februar	75	2 (2,7)	1 (1,3)	4 (5,3)
Decembar	47	3 (6,4)	1 (2,1)	5 (10,6)
<b>Ukupno</b>		<b>9</b>	<b>2</b>	<b>15</b>

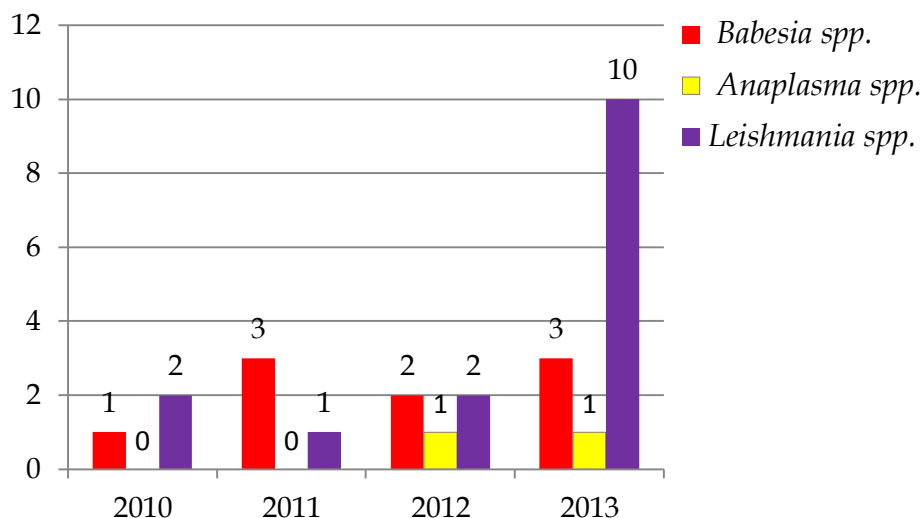


**Grafikon 9.** Prikaz broja šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena po mesecima uzorkovanja

Prevalencija *Babesia* spp. u analiziranim šakalima kretala se od 3,8% 2011 god. do 4,5% 2013 godine. Prosečna prevalencija *Babesia* spp. u analiziranom uzorku tokom četiri godine sakupljanja iznosi 4,2% a medijana 4,3%. Po jedan pozitivan uzorak na *Anaplasma* spp., detektovan je u 2012. (1/45, 2,2%) i 2013. godini (1/67, 1,5%). Prevalencija *Leishmania* spp. kod odstreljenih šakala po godinama kretala se od 1,3% (1/80) 2011. godine, do 14,9% (10/67) 2013 godine. Broj pozitivnih šakala na prisustvo DNK testiranih patogena po godinama sakupljanja dat je u tabeli 13, a prikaz na grafikonu 10.

**Tabela 13.** Broj analiziranih šakala pozitivnih na testirane patogene po godinama uzorkovanja

Godina	Broj analiziranih šakala	Uzorcii slezine pozitivni na prisustvo DNK patogena		
		<i>Babesia</i> spp. (%)	<i>Anaplasma</i> spp. (%)	<i>Leishmania</i> spp. (%)
2010	24	1 (4,2)	0 (0)	2 (8,3)
2011	80	3 (3,8)	0 (0)	1 (1,3)
2012	45	2 (4,4)	1 (2,2)	2 (4,4)
2013	67	3 (4,5)	1 (1,5)	10 (14,9)



**Grafikon 10.** Prikaz broja šakala pozitivnih na testirane patogene po godinama sakupljanja

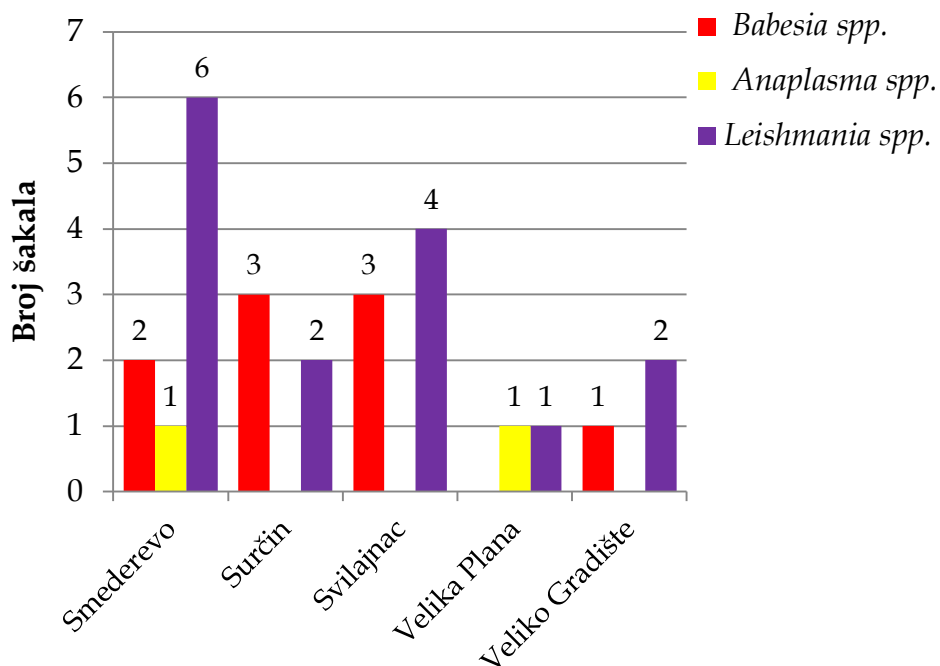
Iako broj analiziranih uzoraka tkiva slezine šakala nije značajno varirao od 2011 do 2013 godine, Hi-kvadrat testom (nivo statističke značajnosti  $P < 0.05$ ) potvrđeno je značajno povećanje broja pozitivnih uzoraka na *Leishmania* spp. u 2013. godini ( $p=0.011$ ).

Prisustvo DNK *Babesia* spp. detektovano je kod šakala odstreljenih na četiri lokaliteta: Surčin (3/24, 12,5%), Svilajnac (3/45, 6,8%), Smederevo (2/49, 4,1%) i na lokalitetu Veliko Gradište (1/54, 1,9%). Uzorci pozitivni na *Anaplasma* spp., detektovani su na dva lokaliteta: Velika Plana (1/25, 4%) i Smederevo (1/49, 2%) dok je DNK *Leishmania* spp. detektovana kod šakala odstreljenih na pet lokaliteta: Smederevo (12,2%, 6/49), Svilajnac (9,1%, 4/44), Surčin (8,3%, 2/24), Velika Plana (4%, 1/25), Veliko Gradište (3,7%, 2/54).

Broj šakala pozitivnih na prisustvo DNK testiranih patogena po lokalitetima dat je u tabeli 14, a prikaz na grafikonu 11.

**Tabela 14.** Broj analiziranih šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena po lokalitetima uzorkovanja

Lokalitet	Broj analiziranih šakala	Broj šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena		
		<i>Babesia</i> spp. (%)	<i>Anaplasma</i> spp. (%)	<i>Leishmania</i> spp. (%)
Smederevo	49	2 (4,1)	1 (2)	6 (12,2)
Surčin	24	3 (12,5)	0 (0)	2 (8,3)
Svilajnac	45	3 (6,8)	0 (0)	4 (9,1)
Velika Plana	25	0 (0)	1 (4)	1 (4)
Veliko Gradište	54	1 (1,9)	0 (0)	2 (3,7)

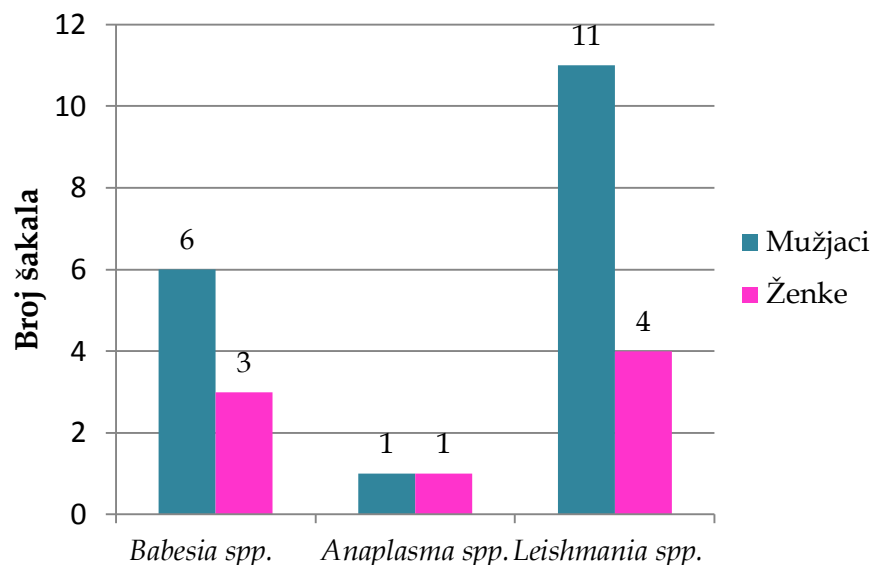


**Grafikon 11.** Prikaz broja analiziranih šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena po lokalitetima uzorkovanja

Prevalencija *Babesia* spp. po polovima analiziranih životinja bila je 5,6%, (6/216) kod mužijaka i 2,8% (3/216) kod ženki. Po jedna životinja muškog i ženskog pola su bile pozitivne na prisustvo DNK *Anaplasma* spp., dok je ukupno 11 mužjaka (10,2%, 11/216) i četiri ženke (3,7%, 4/216) bilo pozitivno na prisustvo DNK *Leishmania* spp. (tabela 15, grafikon 12)

**Tabela 15.** Broj analiziranih šakala pozitivnih na testirane patogene po polovima životinja

Pol	Ukupan broj šakala	Šakali pozitivni na prisustvo DNK patogena		
		<i>Babesia</i> spp. (%)	<i>Anaplasma</i> spp. (%)	<i>Leishmania</i> spp. (%)
Mušjaci	6 (5,6)	1 (0,9)	11 (10,2)	6 (5,6)
Ženke	3 (2,8)	1 (0,9)	4 (3,7)	3 (2,8)
<b>Ukupno</b>	<b>9 (4,2)</b>	<b>2 (0,9)</b>	<b>15 (6,9)</b>	<b>9 (4,2)</b>



**Grafikon 12.** Prikaz broja analiziranih šakala pozitivnih na prisustvo DNK patogena po polovima životinja

Hi-kvadrat testom je potvrđena statistički značajna razlika u prevalenciji između mužjaka i ženki za *Babesia* spp. ( $p=0.011$ ) i *Leishmania* spp. ( $p= 0.061$ ).

#### 5.3.1.1 Identifikovane vrste u okviru patogenih rodova čije je prisustvo dokazano u analiziranim uzorcima tkiva šakala

Uzorci kod kojih je utvrđeno prisustvo DNK *Babesia* spp. i *Anaplasma* spp., su sekvenirani metodom po Sangeru i izvršeno je poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u GenBank-u (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Na osnovu sličnosti sekvenci dobijenih u toku istraživanja sa prethodno publikovanim sekvencama izvršena je identifikacija vrste patogena. Identifikacija lajšmanija izvršena je do nivoa roda (*Leishmania* spp.).



Analizom je utvrđeno da su sekvence 18S rRNK gena svih devet uzoraka pozitivnih na DNK *Babesia* spp. međusobno identične i identifikovane kao *B. canis*. Reprezentativna sekvenca 18S rRNK gena dužine od 1455 bp je deponovana u GenBank pod pristupnim brojem KY747491 (slika 17).

```
>KY747491.1 Babesia canis small subunit ribosomal RNA gene, partial
sequence

CAGTTATAGTTTATTTGGTATTCATTTTCCATGGATAACCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACACGTTT
GAGGTCTTTTGACCGCGTTTATTAGTTTGAACCCGCGCTTGGCTTTCGGTGATTCATAATAAACTGGC
GAATCGCATTTAGCGATGGACCATTCAAGTTTCTGACCCATCAGCTTGACGGTAGGGTATTGGCCTAC
CGAGGCAGCAACGGGTAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAAGAAATAA
CAATACAGGGCGAATGTCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGA
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTT
AAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGCGTTGACGGTTTGACCATTGGTTGGTTATTTTCGTTTTTCGCTTT
TGGGAATTTCCCTTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCA
GCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAG
GAACGGTTGGGGGCATTCGTATTTAACTGTGAGAGGTGAAATTCCTAGATTTGTTAAAGACGAACTAC
TGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG
ATACCGTCGTAGTCCTAACCATAAACTATGCCGACTAGTGATTGGAGGTGCTCGTTTTTTTGACCCCTT
CAGGAACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAA
GGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTC
ACCAGGTCCAGACAAACGGTAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCTTTGGGTGGTGGTGC
ATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGC
TAACTAGTGCCGTTATTTGAGTTTCCGGTTGCTTCTTAGAGGGACTTTGGGGCGCTAAGCCCTGAGG
AAGTTTAAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCTGCACGCGCGCTACACTGATG
CATTCATCGAGTTTATTCCTTGCCGAGAGGTCTAGGTAATCTTTAGTATGCATCGTGACGGGGATTG
ATTTTTGTAATCTAAATCATGAACGAGGAATGCCTAGTATGCGCAAGTCATCAGCTTGTGCAGATTA
CGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCC
```

**Slika 17.** FASTA format 18S rRNK sekvence *B. canis* deponovane u GenBank

Deponovana sekvenca je 100% identična sa sekvencama koje su dobijene iz vukova (KY359360) i prirodno inficiranih pasa (AY072926) u Hrvatskoj i kod konja u Italiji (KX839231).

Nakon sekvenciranja fragmenta gena za 16S rRNK uzoraka pozitivnih na DNK *Anaplasma* spp., utvrđeno je da su obe sekvence međusobno identične. Reprezentativna sekvenca je deponovana u banci gena pod pristupnim brojem MF076944 (Slika 18). Na osnovu poređenja sa prethodno publikovanim sekvencama u uzorcima analiziranim

tokom ovog istraživanja utvrđeno je prisustvo DNK *A. phagocytophilum*. Ustanovljena je sličnost od 100% sa sekvencama uzoraka poreklom iz više različitih domaćina: ljudi, psi, rakuni, mačke, lisice, ovce, glodari, iksodidnih krpelja i zemalja: Japan, Južna Koreja, Hrvatska, Austrija, Švajcarska, Francuska, Norveška, SAD, Brazil) (Sekvence deponovane pod pristupnim brojevima: MH482862, MG519284, MG976767, LC334014, MF076944, MF582329, MF351965, MF351964, KY458571, KX180948, KY114936, KU559922, KP306523, KP306520, KP306518, CP015376, KT986058, KT454992, KU513794, KR611719, KP276588, KP642755, KR021166).

```
>MF076944.1 Anaplasma phagocytophilum isolate RS12813 16S ribosomal
RNA gene, partial sequence

GTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTT
GTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTT
AACCCCTGGAGCTGCTTTTAAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCCTAGTGTAG
AGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGC
TGAGGTGCGAAAGCGTGGG
```

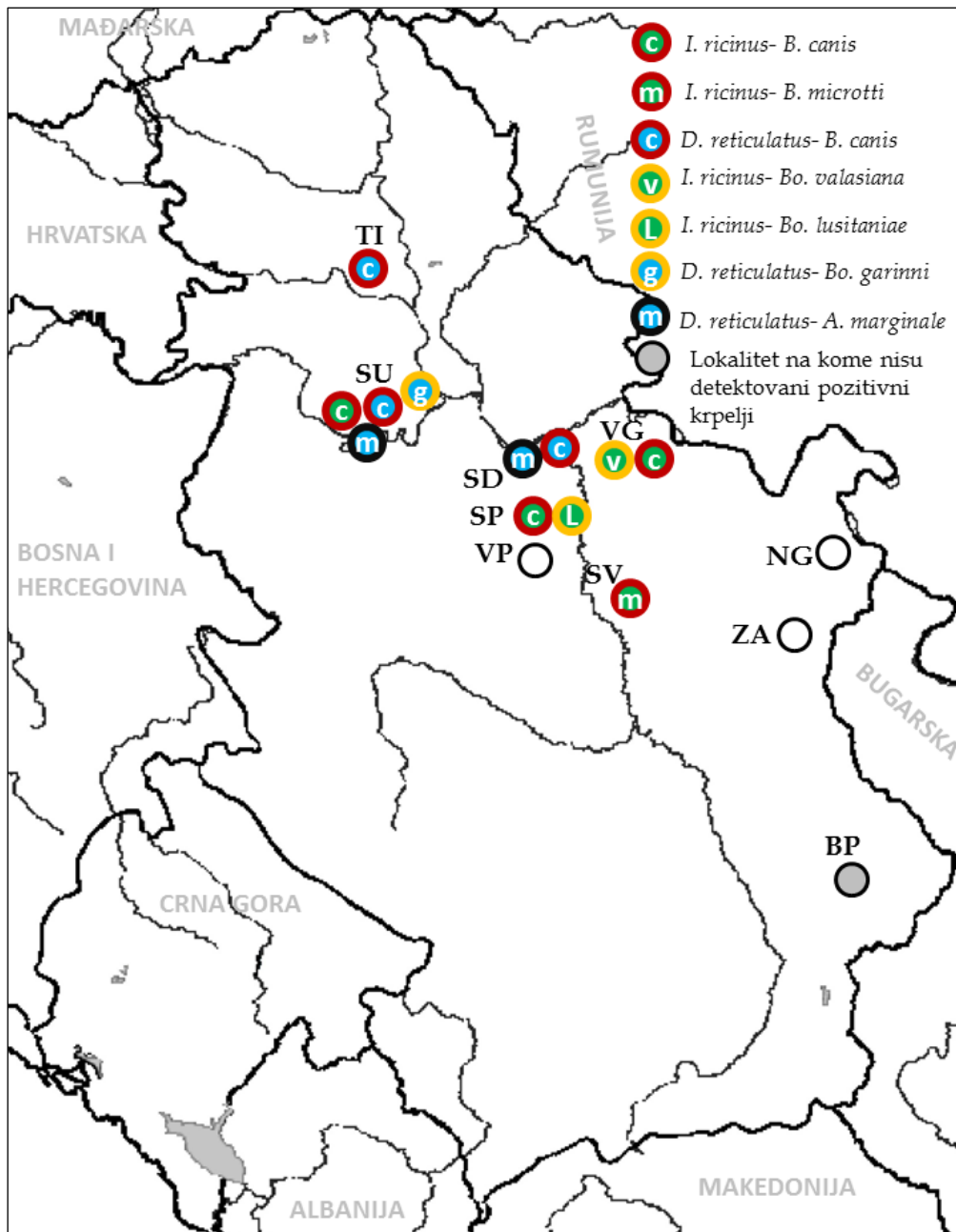
**Slika 18.** FASTA format reprezentativne sekvence fragmenta gena za 16S rRNK *A. phagocytophilum* deponovane u GenBank

### 5.3.2 Nalaz patogena u krpeljima sakupljenim sa šakala

U krpeljima sakupljenim sa šakala detektovano je prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l., *Babesia* spp., i *Anaplasma* spp., dok prisustvo *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp. i *Coxiella burnetii* nije utvrđeno. Svi uzorci krpelja pozitivni na prisustvo DNK patogena su sekvencirani metodom po Sangeru čime je identifikovana vrsta prisutnog patogena. Zbirni prikaz rezultata prisustva DNK patogena u krpeljima obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom dat je u tabeli 16, a prostorna distribucija vrsta krpelja pozitivnih na patogena data je na slici 19.

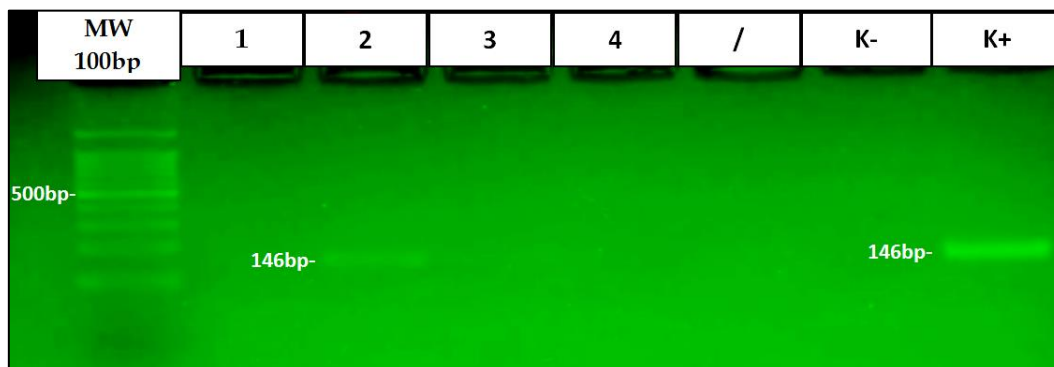
**Tabela 16.** Prevalencija patogena detektovanih PCR metodom u krpeljima sakupljenim sa šakala

Vrste krpelja	Broj sakupljenih krpelja				Babesia spp.								Borrelia burgdorferi s.l.								Anaplasma spp.				
					Ba. canis				Ba. microti				Bo. garinii				Bo. valasiana				Bo. lusitaniae				A. marginale
	♂	♀	n	Σ	♂	♀	n	Σ (%)	♂	♀	n	Σ (%)	♂	♀	n	Σ (%)	♂	♀	n	Σ (%)	♂	♀	n	Σ (%)	
<i>Ixodes ricinus</i>	34	30		64 (54.2)		6		6 (9.4)		1		1 (1.6)			2		2 (3.1)		2		2 (3.1)				
<i>Dermacentor reticulatus</i>	40	7		47 (39.8)	7	1		8 (17)				1		1 (2.1)							3			3 (6.4)	
<i>Haemaphysalis concinna</i>	3	2	2	7 (5.9)																					
<b>Ukupno</b>	77	39	2	118	7	7		14 (11.9)		1		1 (0,8)		1		1 (0,8)		2		2 (1,7)				3 (2,5)	



**Slika 19.** Prostorna distribucija pojedinih vrsta krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l. i *Anaplasma* spp.,  
 (○ - Lokaliteti na kojima nisu sakupljen krpelji sa šakala)

Od 118 analiziranih krpelja 15 je bilo pozitivno na prisustvo DNK *Babesia* spp., (15/118, 12,7%). Prikaz agaroznog gela sa pozitivnim uzorkom dat je na slici 20.



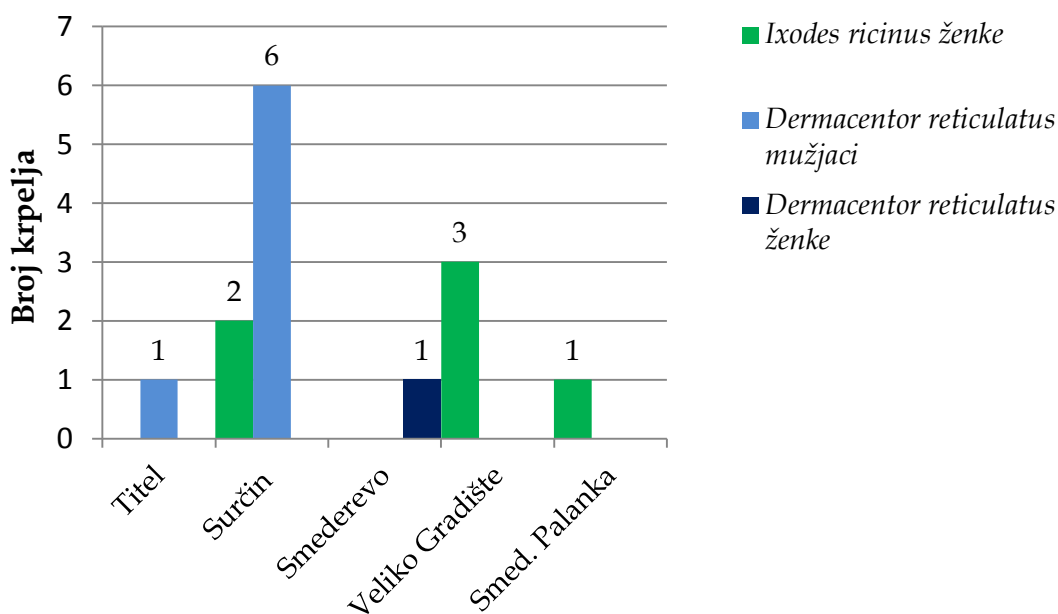
**Slika 20.** Izgled reprezentativnog gela sa pozitivnim uzorkom krpelja (uzorak označen brojem 2) na *Babesia* spp., obojenog „Midori Green“ bojom (Nippon Genetics, Japan). K<sup>-</sup> negativna kontrola, K<sup>+</sup> pozitivna kontrola MW 100bp-marker molekulske mase

Nakon sekvenciranja i na osnovu sličnosti dobijenih sekvenci gena za 18S rRNK sa sekvencama deponovanim u banci gena potvrđeno je prisustvo dve vrste roda *Babesia*: *B. canis* i *B. microti*. Potvrđena je identičnost 18S rRNA sekvence između *B. canis* detektovane kod šakala i 18S rRNA sekvence dobijene iz *D. reticulatus* krpelja poreklom sa te životinje. Prisustvo DNK *B. canis* je detektovano u krpeljima prikupljenim sa sedam šakala.

*B. canis* je detektovana kod šest ženki vrste *I. ricinus* koje su sakupljene sa pet šakala odstreljenih na jednom od tri lokaliteta: Smederevska Palanka, Surčin, Veliko Gradište. DNK *B. canis* potvrđena je i kod jedne ženke i sedam mužjaka vrste *D. reticulatus* koji potiču sa ukupno četiri šakala koji su odstreljeni na jednom od tri lokaliteta: Smederevo, Surčin, Titel. Jedan šakal sa lokaliteta Surčin imao je na sebi jednu ženku *I. ricinus* i jednog mužjaka *D. reticulatus* koji su bili pozitivni na prisustvo *B. canis*. Broj pozitivnih krpelja na *Babesia* spp. po lokalitetima dat je u tabeli 17, a prikaz na grafikonu 13.

**Tabela 17.** Krpelji pozitivni na prisustvo DNK *Babesia canis* po lokalitetima sakupljanja

Lokalitet	Broj šakala sa kojih su prikupljeni inficirani krpelji	Vrsta krpelja			
		<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Dermacentor reticulatus</i>	
		Mužjaci	Ženke	Mužjaci	Ženke
Titel	1			1	
Surčin	2		2	6	
Smederevo	1				1
Veliko Gradište	2		3		
Smed. Palanka	1		1		
<b>Ukupno</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>1</b>



**Grafikon 13.** Prikaz vrsta krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *B. canis* po lokalitetima sakupljanja

Prisustvo DNK *B. microti* potvrđeno je kod jedne ženke vrste *I. ricinus* koja je sakupljena na lokalitetu Svilajnac. Reprezentativne sekvence *B. canis* (pristupni

broj KY828593) i *B. microti* ( pristupni broj KY828448) su deponovane u banci gena (Slika 21).

```

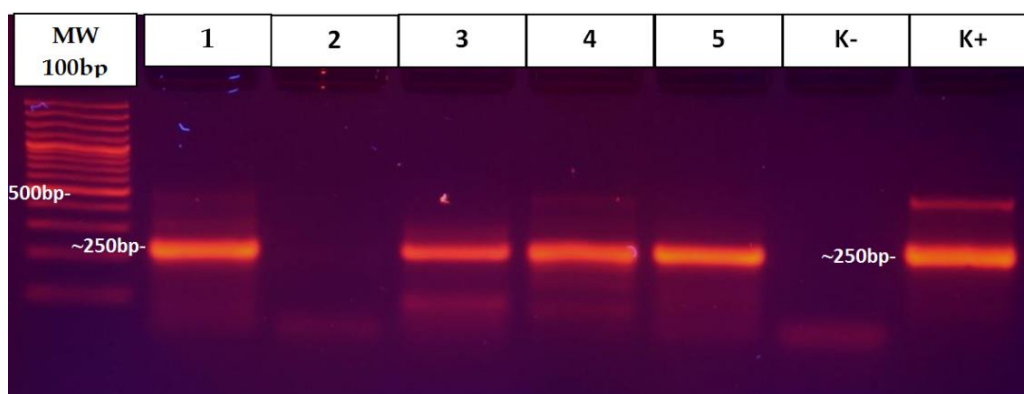
>KY828593.1 Babesia canis isolate BabLME2 small subunit ribosomal
RNA gene, partial sequence
CTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGT
ATTTTTGCGTTGACGGTTTGACCAATTTGGTTGGTTATTTGCTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTT
ACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCACAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGT
AGGACTTTGGTTCTATTTTTGTTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATT
CGTATTTAAAGAAA

>KY828448.1 Babesia microti isolate BabLME1 small subunit ribosomal
RNA gene, partial sequence
ATGTAATTGGAATGATGGGAATCTAAACCCTTCCCAGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGTTGTTGCAGTTAAGAAGCTCGTAGTTGAA
TTTTCTGCCTTGTCATTAATCTCGCTTCCGAGCGTTTTTTTTATTGGCTTGGCATCTTCTGGATTTGGTG
CCTTCGGGTACTATTTTCCAGGATTTACTTTGAGAAAAGTAGAGTGTTCAAACAGGCATTTCGCCTTG
AATACTACAGCATGGAATAATGAAGTAGGACTTTGGTTCTATTTTTGTTGGTTATTGAGCCAGAGTAAT
GGTTAATAGGAGCAGTTGGGGGCATTTCGTATTTAAA

```

**Slika 21.** FASTA format deponovanih reprezentativnih sekvenci *Babesia canis* i *Babesia microti* iz krpelja

U analiziranom uzorku krpelja kod pet jedinki (5/118, 4,2%) je detektovano prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l. Na slici 22., prikazan je reprezentativan agarozni gel sa pozitivnim uzorcima krpelja na prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l.



**Slika 22.** Izgled reprezentativnog gela sa pozitivnim uzorcima krpelja na prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l. (pozitivni uzorci su označeni brojevima 1,3,4,5) Za bojenje umnoženih fragmenata korišćen je etidijum-bromid. K- negativna kontrola, K+ pozitivna kontrola MW 100bp- marker molekulske mase

Sekvenciranjem PCR produkata umnoženog 5S-23S rRNK intergenskog regiona *Borrelia burgdorferi* s.l. i analizom dobijenih sekvenci identifikovano je prisustvo tri vrste kompleksa *Borrelia burgdorferi* s.l. : *Bo. garinii*, *Bo. valaisiana* i *Bo. lusitaniae*. DNK *Bo. garinii* detektovana je kod jednog mužjaka vrste *D. reticulatus* sakupljenog sa šakala na lokalitetu Surčin. Dobijena sekvenca dužine od 210 bp je deponovana u banci gena pod pristupnim brojem KY863460 (slika 23). Prisustvo DNK *Bo. valaisiana* je detektovano kod dva mužjaka vrste *I. ricinus* sakupljenih sa jednog šakala na lokalitetu Veliko Gradište. Reprezentativna sekvenca dužine 214bp je deponovana u banci gena pod pristupnim brojem KY863459 (slika 23). DNK *Bo. lusitaniae* je potvrđena kod dva mužjaka vrste *I. ricinus* sakupljenih sa šakala na lokalitetu Smederevska Palanka.

Kod tri mužjaka vrste *D. reticulatus* detektovano je prisustvo DNK *Anaplasma* spp. RFLP analizom dobijenih PCR produkata potvrđeno je prisustvo *A. marginale* u sva tri uzorka. Dva krpelja pozitivna na prisustvo *A. marginale* potiču sa jednog šakala sa lokaliteta Surčin, dok je jedan pozitivan krpelj sakupljen sa šakala odstreljenog na lokalitetu Smederevo.

```

>KY863460.1 Borreliella garinii 5S-23S ribosomal RNA intergenic
spacer, partial sequence

ATTTTTTATGTTTTTAGATGTTTCATGTTTTTGAATGTTTTATTCGAATAATATAAAAAATAAAATATA
TATTGACATGGATTAACAAGATATATATTATTCATGTTGTATAAACAAATTGGCAAAATAGAGAT
GGAAGATAAAAAATATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTGGCATTACCCCTACCCCCAC
ACCCCA

>KY863459.1 Borreliella valaisiana 5S-23S ribosomal RNA intergenic
spacer, partial sequence

ATTTTTTATATTTTTTTAATGTTTCATGTTTTTGAATGTTTTATTCAAATAATGTAAAAATAAAATAG
ATATTGACATGGATTGAACAAAAGATATATATTATTTTATGTTGCATAAACAAATTGGCAAAATAGAG
ATGGAAGATAAAAAATATGGTCAAAGTAATAAGAGTCTATGGTGAATGCCTAGGACCTGGCAATACCCCT
ACTCCCCAAA

```

**Slika 23.** FASTA format deponovanih reprezentativnih sekvenci *Borrelia garinii* i *Borrelia valaisiana* iz krpelja



## 6. DISKUSIJA

Istraživanjima sporvedenim u sklopu ove doktorske disertacije, po prvi put je u Srbiji sistematski sagledan epizootiološko-epidemiološki značaja zlatnog šakala (*Canis aureus*) kroz utvrđivanje prisustva vektorima prenosivih uzročnika zoonoza (*Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leishmania* spp.) u uzorcima slezine šakala i krpeljima koji su sa njih sakupljeni.

Sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta, studije ovog karaktera su od velikog značaja jer mogu da ukažu na ulogu vrste koja se ispituje u enzootskim ciklusima kruženja vektorima prenosivih patogena na istraživanom području. Iako su divlje kanide prepoznate kao pogodne vrste za epizootiološko-epidemiološki nadzor ekosistema („sentinel“) (Aguirre, 2009), a šakli prepoznati kao domaćini rezervoari većeg broja ekto- i endoparazita (Gherman & Mihalca, 2017), malo je dostupnih podataka o ulozi šakala u širenju i održavanju vektorima prenosivih patogena u Evropi. Istraživači iz Rumunije nedavno su molekularnim metodama (PCR, sekvenciranje) dokazali prisustvo *B. canis* i *L. infantum* kod šakala i ukazali na njihov mogući značaj u održavanju glavnog uzročnika babezioze pasa i potencijalnu ulogu kao domaćina rezervoara za *L. infantum* (Mitková et al., 2017b). Istraživanja sprovedena u našoj zemlji ukazala su na značaj šakala kao domaćina rezervoara za uzročnike parazitskih zoonoza koji se prenose u lancima ishrane: *Trichinella spiralis*, *T. britovi* (Ćirović et al., 2015), *Echinococcus multilocularis* (Lalošević et al., 2016), ali do sada nije ispitivan značaj šakala u širenju i održavanju vektorima prenosivih uzročnika zoonoza. Takođe ni sistematske faunističke studije krpelja koji parazitiraju na šakalima u našoj zemlji do sada nisu vršene. Zbog epizootiološko-epidemiološkog značaja krpelja (Jongejan & Uilenberg, 2004) i širenja areala zlatnog šakala u zemljama Jugoistočne Evrope (Krofel et al.,

2017), prilog poznavanje faune krpelja koja parazitira na šakalima je takođe od posebne važnosti jer krpelji kao vektori predstavljaju veoma važan element u enzootiskim transmissionim ciklusima vektorima prenosivih patogeni.

\*\*\*

Na osnovu prethodnih istraživanja u Evropi do sada je utvrđeno osam vrsta krpelja koji parazitiraju na šakalima: *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. punctata*, *H. concinna* i *Rhipicephalus sanguineus* s.l (D'Amico et al., 2017; Duscher et al., 2013; Farkas et al., 2014; Hornok et al., 2013; Stojanov et al., 2014). Navedene vrste krpelja prisustne su i u našoj zemlji, a u različitim studijama koje se bave prevalencijom krpeljima prenosivih patogeni, u njima je potvrđeno prisustvo većeg broja uzročnika oboljenja ljudi i životinja od kojih su pojedini sa zoonoznim potencijalom: *A. phagocytophilum*, *A. ovis*, *F. tularensis*, *Rickettsia* sp., *B. burgdorferi* s.l., *Coxiella burnetii*, *B. canis* (Milutinović et al., 2006, 2008, 2012; Tomanović et al., 2009, 2010, 2013; Mihaljica et al. 2012; Potkonjak et al., 2016;). Do danas, studije koje se sistematski bave faunom krpelja koji parazitiraju šakale u našoj zemlji nisu rađene. Prethodno je potvrđen nalaz krpelja vrsta *I. ricinus*, *D. marginatus* i *R. sanguineus* s.l kod šakala odstreljenih na lokalitetima u Vojvodini (Stojanov et al., 2014). Prikupljeni krpelji sa šakala analizirani u okviru ove doktorske disertacije pripadaju jednoj od tri vrste: *I. ricinus*, *D. reticulatus*, *H. concinna*, za koje je prethodno potvrđeno da mogu biti ektoparaziti šakala u Evropi (Gherman & Mihalca, 2017). *I. ricinus* je vrsta krpelja koja je najčešće nalažena na šakalima analiziranim u sklopu ove doktorske disertacije (54,2%) što je u skladu sa prethodnim nalazom kada je od ukupnog broja krpelja sakupljenih sa šakala njih 55% pripadalo ovoj vrsti. Odstreljeni šakali bili su poreklom sa jednog od tri lokaliteta u Vojvodini: Ruma, Pećinci, Titel (Stojanov et al., 2014). Naš nalaz potvrđuje da šakali predstavljaju dobre domaćine za navedene vrste krpelja na području naše zemlje, i da pored epizootiološko-epidemiološkog značaja koji

šakali imaju kao potencijalni rezervoari za patogene koje prenose pomenute vrste krpelja, može im se pripisati i uloga za mehaničko prenošenje i širenje areala ovih vrsta krpelja na širem području. S obzirom da šakali žive u blizini naselja povećava se verovatnoća da ovi krpelji neku od faza svog životnog ciklusa obave i na domaćim životinjama ili ljudima, naročito *I. ricinus*, kao najčešći ektoparazit čoveka, čime se značaj šakala u enzootskim ciklusima vektorima prenosivih uzročnika zoonoza dodatno naglašava. U krpeljima sakupljenim sa šakala u ovoj studiji, potvrđeno je prisustvo DNK *B. canis*, *B. microti*, *A. marginale*, *Bo. garinii*, *Bo. lusitaniae* i *Bo. valaisiana*.

\*\*\*

Epizootiološko-epidemiološki značaj divljih kanida kao potencijalnih rezervoara za različite vrste *Babesia* prepoznat je u ranijim studijama. Sa ovog aspekta, u Evropi su najbolje istražene lisice. Dosadašnje studije ukazuju da lisice nemaju ulogu u održavanju *B. canis* u prirodi (Cardoso et al., 2013; Hodžić et al., 2015a). Od mnogobrojnih sprovedenih studija u Evropi o ulozi lisica u eko-epidemiologiji *Babesia* spp. i analizama velikog broja uzoraka, DNK *B. canis* je molekularnim metodama do sada potvrđena samo dva puta u celom svetu. Prvi nalaz kod jedne lisice prijavili su istraživači iz Portugala (Cardoso et al., 2013), a drugi nalaz *B. canis* potvrđen je takođe kod jedne lisice u Bosni i Hercegovini (Hodžić et al., 2015a). Objavljeni rezultati skorašnje studije koja se bavila ulogom lisica kao potencijalnih rezervoara za *Babesia* spp. u Srbiji, potvrdili su prisustvo *B. canis* kod jedne lisice što predstavlja treći nalaz do sada u svetu (Juwaid et al., 2019). Mnogo veći značaj se pridaje lisicama kao potencijalnim rezervoarima za *B. microti*-like sp. (Otranto et al., 2015a). Poslednjih godina je molekularnim metodama potvrđeno prisustvo DNK *B. microti*-like kod lisica u više zemalja sa različitim prevalencijama: od 72% u Severozapadnoj Španiji (Checa et al., 2018), 69.2% u Portugalu (Cardoso et al., 2013), 50% u Austriji (Duscher et al., 2014), 46.4% u Nemačkoj (Najm et al., 2014), 31.9% u Bosni i Hercegovini (Hodžić et al., 2015a), 20% u Mađarskoj

(Farkas et al., 2015), 14.6% u Velikoj Britaniji (Bartley et al., 2016), 5.2% u Hrvatskoj (Dezek et al., 2010), 0.98% u Italiji (Zanet et al., 2014). DNK *B. microti*-like potvrđena je i kod lisica u Severnoj Americi sa prevalencijom od 39% (Birkenheuer et al., 2010) i Izraelu (19%) (Margalit Levi et al., 2018). Nedavno istraživanje sprovedeno kod lisica u našoj zemlji, potvrdilo je prisustvo DNK *B. microti*-like kod 28.7% analiziranih životinja (Juwaid et al., 2019). Visoka prevalencija *B. microti*-like i odsustvo kliničkih simptoma kod lisica u Evropi, ukazuju na njihovu ulogu kao rezervoara za ovu vrstu babezija (Checa et al., 2018).

Za razliku od lisica, malo podataka postoji o ulozi drugih divljih kanida u epizootologiji vektorima prenosivih bolesti pa tako i babezioze. Nedavno sprovedeno istraživanje u Hrvatskoj ukazuje na ulogu vukova kao potencijalnih rezervoara za *B. canis*. Od 107 slobodno živećih vukova analiziranih na prisustvo piroplazmi, 21 životinja (19,6%) je bila pozitivna na prisustvo DNK *B. canis*. Obdukovane životinje nisu pokazivale znakove hemolitičke bolesti što ukazuje na ograničenu patogenost *B. canis* kod slobodno živećih vukova (Beck et al., 2017). Potvrđeno je da vukovi držani u zarobljeništvu mogu da obole od babezioze (Erdélyi et al., 2014; Karbowiak et al., 2008). Istraživači u Mađarskoj su potvrdili prisustvo *B. canis* kao uzročnika fatalne babezioze kod dva vuka držana na ograničenom području (Erdélyi et al., 2014).

\*\*\*

Iako poslednjih decenija šakali povećavaju brojnost populacije i areal rasprostranjenja u Evropi (Trouwborst et al., 2015), postoji mali broj istraživanja o ulozi ove vrste u epizootologiji vektorima prenosivih bolesti (Duscher et al., 2013; Farkas et al., 2014). U Rumuniji, *B. canis* je potvrđena kod šakala sa prevalencijom od 8.9% (Mitková et al., 2017) dok je *B. rossi* je čest nalaz kod prugastog šakala (*Canis adustus*) u Africi (Penzhorn, 2011). Do danas nije poznat patogeni potencijal *B. canis* kod šakala a nedavno sprovedena studija u

Rumuniji ukazala je na njihovu ulogu kao prirodnih domaćina rezervoara ove parazitske protozoe (Mitková et al., 2017). Naši rezultati predstavljaju prvi nalaz *B. canis* kod šakala u Srbiji, a generalno drugi molekularno potvrđen nalaz u svetu posle potvrđenog prisustva *B. canis* kod šakala iz Rumunije (Mitková et al., 2017).

U okviru rezultata istraživanja ove doktorske disertacije, PCR-om je utvrđena ukupna prevalencija od 4,2% (9/216) na *B. canis* u analiziranim uzorcima slezine šakala. Šakali pozitivni na prisustvo DNK *B. canis* potiču sa lokaliteta: Surčin (12,5%, 3/24), Svilajnac (6,8%, 3/44), Smederevo (4,1%, 2/49), Veliko Gradište (1,9%, 1/54). Udaljenost između najudaljenijih područja lokaliteta na kojima su detektovani pozitivni šakali (Surčin-Svilajnac, Surčin-Veliko Gradište) je oko 130km što ukazuje na širu distribuciju *B. canis* kod šakala na teritoriji naše zemlje a time i na veći epizootiološki značaj šakala kao domaćina rezervoara na teritoriji naše zemlje. Jedan od značajnih nalaza dobijen u sklopu ove teze je i identičnost 18S rRNA sekvence između *B. canis* detektovane kod šakala i *D. reticulatus* krpelja poreklom sa te životinje. Na osnovu ovog nalaza može se postaviti osnovana hipoteza da su šakali i *D. reticulatus* krpelji koji parazitiraju na njima elementi silvatičnog enzootskog ciklusa *B. canis*, i da s obzirom na život šakala u neposrednoj blizini naselja i domaćih životinja (Ćirović et al., 2018; Giannatos, 2004) predstavljaju potencijalno značajne prirodne domaćine rezervoare koji omogućavaju transmisiju ovog patogena iz silvatičnog u urbani ciklus.

Rezultati istraživanja o ulozi lisica kao potencijalnih rezervoara za *Babesia* spp. koje je sprovedeno nedavno u Srbiji, ukazuje da lisice verovatno nisu kompetentni rezervoari za *B. canis* (Juwaid et al., 2019), što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija u drugim evropskim zemljama (Cardoso et al., 2013; Hodžić et al., 2015a). Od 129 analiziranih uzoraka tkiva slezine, samo jedna lisica je bila pozitivna na *B. canis* dok je na prisustvo DNK *B. vulpes* bilo pozitivno 37 lisica (28.7%). Takođe, u ovoj studiji je potvrđena visoka stopa

prevalencije (61.2%) kod analiziranih lisica na *Hepatozoon canis* (Juwaid et al., 2019). Rezultati istraživanja dobijeni u sklopu ove doktorske disertacije (Sukara et al., 2018), zajedno sa rezultatima dobijenim tokom istraživanja uloge lisica u održavanju *Babesia* spp., u našoj zemlji (Juwaid et al., 2019) i rezultatima prethodnih istraživanja šakala (Mitková et al., 2017) i lisica u Evropi (Cardoso et al., 2013; Hodžić et al., 2015) daju nam osnov za postavljanje hipoteze da su šakali odgovorni za održavanje *B. canis* u silvatičnom ciklusu na teritoriji naše zemlje.

\*\*\*

Prevalencija na prisustvo DNK *B. canis* kod analiziranih krpelja u sklopu ove doktorske disertacije bila je 17% kod *D. reticulatus* krpelja i 9,4% kod krpelja vrste *I. ricinus*. Prisustvo *B. canis* u *D. reticulatus* krpeljima je potvrđeno u mnogim zemljama širom Evrope (Jongejan et al., 2015; Kubelová et al., 2011). *B. canis* je najznačajniji patogen koji se prenosi na životinje ovom vrstom krpelja s obzirom na posledice nastale patogenim delovanjem ove protozoe kod inficiranih domaćina i uzimajući u obzir široku geografsku distribuciju *D. reticulatus* krpelja. U Srbiji, prisustvo DNK *B. canis* prethodno je potvrđeno kod *D. reticulatus* krpelja sakupljenih sa vegetacije (Mihaljica et al., 2012; Tomanović et al., 2013) i sa infestiranih pasa (Potkonjak et al., 2016a). *B. canis* je takođe dokazana kao najčešći uzročnik babezioze pasa u Srbiji (Davitkov et al., 2015). Kod jedne ženke vrste *I. ricinus* sakupljene sa šakala u ovoj studiji, potvrđeno je prisustvo *B. microti*, vrste sa zoonotskim potencijalom i predominantnim uzročnikom humane babezioze u SAD (Homer et al., 2000). U poslednjih desetak godina, humana babezioza izazvana ovim uzročnikom prijavljena je u više evropskih zemalja (Arsuaga et al., 2016; Hildebrandt et al., 2007; Moniuszko-Malinowska et al., 2016). Molekularna detekcija DNK *B. microti* kod nasisane *I. ricinus* ženke sakupljene sa šakala na lokalitetu Svilajnac u centralnoj Srbiji, predstavlja drugi nalaz ovog patogena u krpeljima kod nas. Prethodno je ovaj patogen potvrđen kod jednog *I. ricinus* krpelja sakupljenog sa vegetacije u

Vojvodini (Potkonjak et al., 2016). *B. microti* potvrđena je sa prevalencijom od 1,9% u krvi pasa iz južne Srbije, tačnije u iz Niša i okoline (Gabrielli et al., 2015). Rezultati našeg istraživanja ukazuju na širu distribuciju *B. microti*, tj. prisustvo ovog zoonoznog patogena i u centralnoj Srbiji. Naš nalaz i rezultati prethodnih studija dokaz su da ovaj patogen cirkuliše na teritoriji naše zemlje i da postoji potencijalni rizik za pojavu babezioze u humanoj populaciji u Srbiji.

Potrebna su dalja istraživanja kako bi se potpuno razjasnila uloga šakala u održavanju parazitskih protozoa i kako bi se potvrdio značaj šakala kao domaćina rezervoara koji predstavljaju sponu između silvatičnog i urbanog enzootskog ciklusa za *B. canis*. Takođe, istraživanja o ulozi vukova u održavanju *Babesia* spp., u našoj zemlji do danas nisu vršena. S obzirom da su vukovi autohtona divlja kanida u Srbiji, buduća istraživanja treba da pruže potpuniju epizootiološku sliku silvatičnog ciklusa *Babesia* spp.. Neophodna su i dalja istraživanja uloge različitih vrsta krpelja u eko-epidemiologiji parazitskih protozoa pa tako i *Babesia* spp. Takođe, s obzirom da do danas nije potvrđen ni jedan slučaj humane babezioze u našoj zemlji, a da dostupni epizootiološki podaci ukazuju na prisutnost *B. microti*, neophodne su epidemiološke studije kojima bi se istražio značaj *B. microti* kao uzročnika humane babezioze u našoj zemlji.

\*\*\*

*Anaplasma marginale* i *A. phagocytophilum* su značajni patogeni posmatrano sa aspekta humane i veterinarske medicine. Za vrste u okviru roda *Anaplasma* ne postoji stroga specifičnost za određenog domaćina, jer je infekcija ovim mikroorganizmima dokazana kod većeg broja divljih preživara, drugih divljih i domaćih životinja, te se *A. phagocytophilum* smatra emergentnim, globalno raširenim zoonotskim patogenom koji se prenosi krpeljima (de La Fuente et al., 2006). Otuda postoji potreba za daljim epizootiološko-epidemiološkim istraživanjima i otkrivanjem novih potencijalnih domaćina rezervoara *A. phagocytophilum* u cilju sprovođenja adekvatnih preventivnih mera radi zaštite

zdravlja životinja i ljudi. Sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta značaj divljih kanida u održavanju *A. phagocytophilum* u Evropi najbolje je izučen kod lisica. O ulozi lisica kao potencijalnih rezervoara za *A. phagocytophilum* svedoči potvrda prisustva DNK ovog zoonoznog patogena kod lisica iz Poljske (2,7%), Češke (4,0%), Italije (16.6%) (Ebani et al., 2011; Hulinska et al., 2004; Karbowiak et al., 2009). Opisan je i jedan slučaj akutne granulocitne anaplazmoze kod vuka držanog u zarobljeništvu u Austriji (Leschnik et al., 2012). Nema dostupnih podataka o ulozi šakala kao potencijalnih domaćina rezervoara za *A. phagocytophilum* u Evropi. Samo je jedna studija do sad potvrdila relativno visoku seroprevalenciju od 26,4% na *A. phagocytophilum* (ranije poznata kao *E. phagocytophila*) kod šakala (*Canis aureus syriacus*) u Izraelu (Waner et al., 1999).

Eko-epidemiologija *A. phagocytophilum* u našoj zemlji je u velikoj meri nepoznata i nedovoljno istražena. Glavni vektori *A. phagocytophilum* u Evropi su krpelji vrste *I. ricinus* (Stuen et al., 2013a) koji je ujedno i najabudantnija vrsta u našoj zemlji (Milutinović et al., 1996; Milutinović et al., 2012; Milutinović & Radulović, 2002). Milutinović i sar. (2008) su po prvi put u Srbiji molekularnim metodama potvrdili prisustvo *A. phagocytophilum* kod *I. ricinus* krpelja sakupjenih sa vegetacije na više lokaliteta u Centralnoj Srbiji, na teritorije Vojvodine i na lokalitetima u okolini grada Beograda. Istraživanja su ukazala na široku distribuciju *A. phagocytophilum* kod vrste krpelja koja je prepoznata kao glavni vektor ovog zoonoznog agensa. Zabeležena je prosečna prevalencija od 13.9% među analiziranim *I. ricinus* krpeljima na prisustvo DNK *A. phagocytophilum*, dok je kod 4,9% krpelja potvrđena koinfekcija sa *A. phagocytophilum* i vrstama kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato (Milutinović et al., 2008). Tomanović sa sar. (2010) analizom sekvenci *p44/msp2* paraloga *A. phagocytophilum* ukazuje na infektivni potencijal izolata dobijenih iz *I. ricinus* krpelja u Srbiji. Na osnovu komparativne filogenetske analize sa ostalim izolatima u svetu, ustanovljena je velika sličnost izolata *A. phagocytophilum* iz Srbije sa izolatima koji su potvrđeni kao uzročnici anaplazmoze čoveka i ovaca



(Tomanović et al. 2010). Takođe, Tomanović i sar. (2013) ukazuju da se *A. phagocytophilum* može naći u koinfekciji sa *Coxiella burnetii* i *A. ovis* kod *I. ricinus* krpelja i potvrđuju prisustvo DNK *A. phagocytophilum* kod vrsta *D. reticulatus* i *H. concinna* sakupljenih sa vegetacije (Tomanović et al., 2013). Do sada u našoj zemlji nije zvanično potvrđen ni jedan slučaj humane granulocitne anaplazmoze (HGA), oboljenja koje kod ljudi izaziva *A. phagocytophilum* (Dumler, 2005). Do sada su opisana jedino dva slučaja oboljenja od humane monocitne erlihioza (HME), čiji je uzročnik *Ehrlichia chaffeensis*, koja priada uzročnicima iz familije Anaplasmataceae (Arsić et al., 2014; Đokić et al., 2006). Postoji mogućnost da se HGA javlja u našoj zemlji u okviru febrilna stanja nejasne etiologije ali da zbog nespecifičnih simptoma bolest ostaje nedijagnostikovana.

Serološke studije vršene kod pasa u našoj zemlji ukazuju na njihovu izloženost *A. phagocytophilum*. Testom indirektno imunoflorescencije (IFAT) kod analiziranih pasa sa teritorije Vojvodine potvrđena je seroprevalencija od 15,5% (Potkonjak et al., 2015b), dok je primenom istog testa kod pasa sa teritorije grada Beograda (kod pasa lotalica, pasa iz azila i lovačkih pasa) potvrđena seroprevalencija od 26.1% (Kovačević Filipović et al., 2018). Razlika u prevalenciji između ove dve studije se može tumačiti većim stepenom izloženosti ispitivane populacije pasa sa teritorije grada Beograda krpeljima u odnosu na ispitivanu populaciju pasa sa područja Vojvodine jer su studijom bili obuhvaćeni psi kućni ljubimci držani u kućnim uslovima ili slobodno (Potkonjak et al., 2015b). Potkonjak sa sar. (2016) je dokazao prisustvo DNK *A. phagocytophilum* kod jednog krpelja vrste *I. ricinus* sakupljenog sa psa ali do danas u Srbiji nije direktno potvrđeno prisustvo DNK *A. phagocytophilum* molekularnim metodama kod pasa. Iako prethodne studije ukazuju na izloženost pasa uzočniku anaplazmoze, u našoj zemlji do danas ne postoje potvrđeni slučajevi ovog oboljenja.

Rezultati nedavno sprovedene studije kod muznih krava držanih na pašnjacima u našoj zemlji, potvrdili su prisustvo antitelana na *A. phagocytophilum* kod 2,45% testiranih životinja sa područja lokaliteta Gruža i Požarevac. Sve životinje analizirane na prisustvo DNK *A. phagocytophilum* (qPCR) u ovoj studiji su bile negativne. Sa ispitivanih životinja su sakupljene tri vrste krpelja: *I. ricinus* kao najabudantnija vrsta, zatim *H. punctata* i *D. marginatus* (Vasić et al., 2018). Epizootološka istraživanja o ulozi drugih vrsta domaćih i divljih sisara u održavanju *A. phagocytophilum* u našoj zemlji do danas nisu sprovedena.

U krpeljima sakupljenim sa šakala koji su analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji nije dokazano prisustvo DNK *A. phagocytophilum* ali je istraživanje pokazalo da je 0,9% analiziranih uzoraka tkiva slezine šakala pozitivno na prisustvo DNK ovog zoonoznog patogena. Ovaj nalaz je prvi dokaz prisustva ovog patogena koji je potvrđen PCR-om kod šakala uopšte i predstavlja prilog širem poznavanju eko-epidemiologiji *A. phagocytophilum* u našoj zemlji. Ukupno su dve životinje bile pozitivne koje su poreklom sa lokaliteta Smederevo i Velika Plana. Činjenice da areal šakala obuhvata preko dve trećine teritorije naše zemlje (Ćirović et al., 2018) i da je vrsta koja prestavlja dobrog domaćina za više vrsta krpelja među kojima je i *I. ricinus* (Stojanov et al., 2014; Sukara et al., 2018), zajedno sa potvrđenim prisustvom DNK *A. phagocytophilum* kod šakala analiziranih u sklopu ove doktorske disertacije, daju nam osnova da zaključimo da šakali imaju ulogu u održavanju ovog uzročnika u Srbiji. Neophodna su dalja istraživanja kako šakala tako i drugih divljih kanida (lisice, vukovi) na teritoriji naše zemlje kako bi se potpuno rasvetlila uloga ovih životinja u enzootskim ciklusima *A. phagocytophilum*.

*A. marginale* je globalno raširen krpeljima prenosiv patogen od velikog ekonomskog značaja u govedarskoj proizvodnji (Jongejan & Uilenberg, 2004). Uzročnik je anaplazmoze goveda u tropskim i subtropskim regionima Amerike, Azije, Australije, Afrike i Evrope (Aubry & Geale, 2011). Bolest ima endemski karakter u zemljama na Balkanu koje pripadaju Mediteranskom pojasu a

registrovani su slučajevi ove bolesti i severnije, kod goveda iz Švajcarske (Hofmann-Lehmann et al., 2004), Mađarske (Hornok et al., 2007), a dokazana izloženost *A. marginale* i kod goveda iz Austrije (Baumgartner et al., 1992). *A. ovis*, uzročnik anaplazmoze kod ovaca, jelena i koza, nije infektivna za goveda (Aubry & Geale, 2011). *A. marginale* nije strogo specifična u izboru domaćina i njeno prisustvo je potvrđeno kod više vrsta divljih preživara (Kuttler, 1984). Kod inficiranih domaćina rezervoara, *A. marginale* može da perzistira ne izazivajući nikakve kliničke simptome, čime takve životinje predstavljaju izvor infekcije za artropodne vektore (Kocan et al., 2004). *I. ricinus*, zatim vrste krpelja iz rodova: *Boophilus*, *Rhipicephalus* te pojedini vrste iz roda *Dermacentor*, prepoznate su kao glavni vektori *A. marginale* (Kocan et al., 2004; Živković et al., 2007). Faunističke studije ukazuju da je *I. ricinus* najabundantnija vrsta kod nas, kao i da je najčešće nalažena vrsta kao ektoparazit kod različitih domaćina (goveda, ovce, koze, konji) (Milutinović & Radulović, 2002). Pored *I. ricinus*-a, kao ektoparaziti goveda u našoj zemlji potvrđene su i vrste: *R. bursa*, *D. marginatus*, *R. (Boophilus) annulatus*, *H. punctata*, *D. reticulatus* i *R. sanguineus* (Milutinović & Radulović, 2002). Do danas, u krpeljima sa teritorije naše zemlje prethodno nije potvrđeno prisustvo *A. marginale*, dok je prisustvo *A. ovis* potvrđeno kod *I. ricinus* i *H. concinna* krpelja sakupljenih sa vegetacije (Tomanović et al., 2013). Od kako je 2007. godine dokazano da je *D. reticulatus* kompetentni vektor za *A. marginale* (Živković et al., 2007), prisustvo ovog patogena u *D. reticulatus* krpeljima potvrđeno je u dve skorašnje studije. Istraživači iz Mađarske detektovali su *A. marginale* u krpeljima sakupljenim sa goveda posle enzootskog pojavljivanja anaplazmoze goveda u ovoj zemlji. Infekcija je u pojedinim slučajevima imala smrtni ishod (Mangold et al., 2010). U istraživanju sprovedenom u Francuskoj *A. marginale* je detektovana u *D. reticulatus* krpeljima sa prevalencijom od 0,5% (Bonnet et al., 2013). U okviru istraživanja ove doktorske disertacije, zabeležena je prevalencija od 6,4% među *D. reticulatus* krpeljima sakupljenim sa šakala na prisustvo DNK *A. marginale* i time po prvi put potvrđeno prisustvo ovog patogena u našoj zemlji. Pozitivni

krpelji potiču sa lokaliteta: Surčin i Smederevo. Slučajevi anaplazmoze goveda do sada nisu potvrđeni u našoj zemlji. Smatra se da anaplazmoza goveda trenutno nije oboljenje od značaja u Republici Srbiji (Dimitrijević & Ilić, 2011). S obzirom na globalne klimatskih promena i širenja areala krpelja kao vektora, jasno je da će u vremenu koje dolazi epizootiološka slika i distribucija ovog oboljenja u Evropi biti promenjena (Hornok et al., 2012; Kocan et al., 2003). Nedavno je zvanično potvrđen i prvi slučaj anaplazmoze goveda u Hrvatskoj. Iz uzorka tkiva uginule životinje nested PCR-om je potvrđeno prisustvo *A. marginale* (OIE 2018), Dokaz prisustva *A. marginale* kod kompetentnog vektora u našoj zemlji (Sukara et al., 2018) zajedno sa trenutnom epizootiološkom situacija u regionu ukazuju na mogućnost pojave anaplazmoze goveda i u našoj zemlji. Buduća serološka istraživanja kod goveda u našoj zemlji treba da ukažu na stepen izloženosti ovom patogenu a opravdana sumnja na ovo oboljenje može da se postavi kod goveda koja ispoljavaju simptome anemije sa povišenom telesnom temperaturom a anamnestički podaci upućuju da je životinja bila izložena ubodima krpelja ili se oni nađu prilikom kliničkog pregleda na oboleloj životinji.

\*\*\*

Među analiziranim krpeljima sakupljenim sa šakala koji su analizirani na prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l., potvrđeno je prisustvo *B. garinii* kod *D. reticulatus* krpelja i *B. valaisiana* i *B. lusitaniae* kod *I. ricinus* krpelja sakupljenih sa ukupno pet analiziranih šakala. Nalaz *B. garinii* u prethodnim studijama je obično vezan za krpelje vrste *I. ricinus*. Do sada, prisustvo *B. garinii* kod *D. reticulatus* krpelja potvrđeno je po našim saznanjima samo jednom, i to u regionu Zapadnog Sibira u Rusiji (Rar et al., 2005). Dokaz prisustva *B. garinii* kod *D. reticulatus* krpelja sakupljenih sa šakala u našoj studiji sam po sebi ne podržava niti implicira ulogu *D. reticulatus* kao vektora za ovu vrstu *Borrelia*, nego predstavlja potvrdu prethodnom rezultatu o prisustvu patogena kod ove vrste krpelja. Prethodna istraživanja sprovedena u našoj zemlji, pokazala su da

je *B. lusitaniae* najčešće prisutna vrsta borelija u *I. ricinus* krpeljima sakupljenim sa vegetacije (Tomanović et al., 2008). Nalaz *B. garinii* i *B. lusitaniae* kod mužjaka *I. ricinus* sakupljenih sa šakala, s obzirom da se mužjaci ne hrane krvlju domaćina, potvrđuje prisutnost i cirkulaciju navedenih vrsta borelija u krpeljima sa vegetacije i ne ukazuje na ulogu šakala kao domaćina rezervoara za detektovane vrste kompleksa *Borrelia burgdorferi* s.l. Pomenute vrste *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa su detektovane u prethodnim studijama kod krpelja sakupljenih sa vegetacije na teritoriji naše zemlje (Milutinović et al., 2008; Tomanović et al., 2014).

Do danas, ne postoje dostupni podaci o prisustvu pojedinih vrsta *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa kod šakala u Evropi niti je poznat njihov značaj u epizootologiji lajmske bolesti. Malo je dostupnih podataka i o ulozi drugih divljih kanida u eko-epidemiologiji uzročnika lajmske bolesti. Rezultati nedavno sprovedene studije u Rumuniji ukazala su na ograničenu ulogu lisica u održavanju *Borrelia burgdorferi* s.l. Kod tri od ukupno 353 (1,42%) uzorka srčanog mišića lisica dokazano je prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* s.l. (Dumitrache et al., 2015).

Malo je dostupnih epizootioloških podataka o ulozi pojedinih vrsta životinja u održavanju uzročnika lajmske bolesti. Do sada je potvrđen relativno visok stepen izloženosti pasa sa teritorije grada Beograda vrstama iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa. Seroprevalencija kod prirodno izloženih pasa je iznosila 25% i istraživanje je ukazalo na pse kao dobre „sentinel“ vrste za uzročnike lajmske bolesti na ispitivanom području (Obrenović et al., 2015). Uloga pasa kao potencijalnih domaćina rezervoara za uzročnike lajmske bolesti u našoj zemlji je ostala nepoznata do danas. Takođe, oboljenje pasa uzrokovano vrstama iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa u Srbiji do sada nije potvrđeno. Značaj borelioze je u velikoj meri nepoznat i kod pasa u Evropi (Leschnik et al., 2010). Potrebna su dalja istraživanja kako šakala i drugih divljih kanida, tako i

ostalnih domaćih i divljih životinja kako bi se rasvetlela njihova potencijalna uloga kao prirodnih domaćina rezervoara za uzročnike lajmske bolesti.

\*\*\*

Domaći psi su prepoznati kao glavni rezervoari lajšmanioze u južnim delovima Evrope. U zemljama Mediteranskog basena prevalencija kod pasa dobijena primenom molekularnih metoda se kreće od 5 do 30% zavisno od regiona (Cardoso et al., 2009), dok serološka ispitivanja kod pasa u pojedinim endemskim žarištima lajšmanioze beleže prevalenciju od preko 70% (Cabral et al., 1998). U ovakvim regionima psi su obično hronično inficirani tokom celog života, i samo manji broj njih razvije ozbiljnije simptome bolesti (Baneth et al., 2008; Oliva et al., 2006). Postojanje drugih kičmenjaka rezervoara, više puta je predloženo nakon loših rezultata kontrolnih mera koje su podrazumevale aktivnosti vezane za umanjenje uticaja pasa kao rezervoara uzročnika lajšmanioze (Millán et al., 2014). U prilog ovoj hipotezi ide i to da je po danas najšire prihvaćenoj teoriji, evolucija *Leishmania* spp. vezana za edentantne sisare i glodare (Steverding, 2017). Pored toga, peščane mušice koriste jazbine divljih životinja kao mesta za polaganje jaja i dalji razvoj, dok široko prisustvo flebotomine *P. perniciosus* u urbanom i slivatičnom ciklusu može predstavljati jedan od glavnih faktora koji omogućava preklapanje ova dva ciklusa (Felicangeli, 2004). Sve prethodno navedeno podržava hipotezu o postojanju rezervoara uzročnika lajšmanioze i u silvatičnom ciklusu.

Značaj divljih životinja u održavanju i širenju uzročnika lajšmanioze prepoznat je u zemljama širom sveta a među važnim potencijalnim rezervoarima ovih parazita pored ostalih životinja nalaze se i divlje kanide (Millán et al., 2014; Preadynhmacuk, 2010). Prva epizootiološka istraživanja lajšmanioze kod divljih životinja sproveo je Rioux sa saradnicima 1968. godine u Francuskoj. Od svih analiziranih uzoraka (1130 različitih životinja), infekcija lajšmanijama potvrđena

je samo kod dve lisice od kojih je jedna pokazivala kliničke simptome oboljenja (Rioux et al., 1968). U drugoj studiji Rioux-a i saradnika pokazana je mogućnost izolacije *Leishmania* spp. iz krvi eksperimentalno inficiranih lisica i time je zaključeno da lisice mogu biti rezervoari za infekciju flebotomina sa *Leishmania* spp. (Rioux et al., 1971). U kasnijim studijama, detektovane su različite seroprevalencije kod lisica zavisno od regiona, studije i primenjene metode, od 0% do 18% u Italiji (Mancianti et al., 1994; Verin et al., 2010), 2,1%- 17,9% u Španiji (Fisa et al., 1999; Sobrino et al., 2008), 5,6%-60% u Portugalu (Abranches et al., 1983; Semião-santos et al., 1996). U slučaju primene molekularnih metoda, dobijene su prevalencije od 9% u Francuskoj (Davoust et al., 2014), 14%, 29% i 74,6% u različitim delovima Španije (Criado-Fornelio et al., 2000; Del Río et al., 2014; Sobrino et al., 2008), 20,8%, 40%, 52,2% u studijama sprovedenim u Italiji (Dipineto et al., 2007; Piantedosi et al., 2016; Verin et al., 2010), 59,5% u Grčkoj (Karayiannis et al., 2015). Iako su pojedine studije potvrdile visoku prevalenciju kod lisica u pojedinim zemljama Evrope, treba imati u vidu da to nije dovoljno da bi se potvrdila uloga neke vrste kao rezervoara (Quinnell & Courtena, 2009). Rezultati nekoliko studija u kojima su korišćene serološke i molekularne metode simultano u cilju određivanja prevalencije lajšmanija kod lisica, pokazuju veće vrednosti u slučaju primene molekularnih metoda u odnosu na seroprevalenciju (Sobrino et al., 2008; Verin et al., 2010). Ovi nalazi su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim kod pasa i ljudi kod kojih je dobro poznato postojanje hronične subkliničke infekcije (Baneth et al., 2008; Michel et al., 2011; Solano-gallego et al., 2011). Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da lisice imaju određen stepen rezistencije na infekciju sa *L. infantum*.

Vuk (*Canis lupus*) je najbliži divlji srodnik domaćim psima i s obzirom na to verovatno i pogodan domaćin za lajšmanije u slivatičnom ciklusu. U prilog ovome idu i rezultati studija koji ukazuju na mogućnost da vukovi i psi koji žive na istom geografskom području budu inficirani sa istim patogenima (Beck et al., 2017; Millán et al., 2016; Oleaga et al., 2015). Epizootiološke studije o ulozi

vukova u transmisionim ciklusima lajšmanija u Evropi su novijeg datuma i do sada je sprovedeno samo nekoliko studija. Najveći broj istraživanja sproveden je na Iberijskom poluostrvu, gde lajšmanioza pasa i ljudi ima endemski karakter. Sastre i sar. (2008) kod vukova iz Španije i Portugala držanih u zarobljeništvu detektovali su prisustvo DNK *L. infantum* u uzorcima krvi kod tri od 33 analizirane životinje (9%). U drugoj studiji, Sobrino i sar. (2008), su kod odstreljenih slobodnoživećih vukova iz Španije detektovali prevalenciju od 20,5%. U skorašnjoj studiji sprovedenoj takođe u Španiji, zabeležena je prevalencija od 33% na prisustvo DNK *L. infantum* kod 102 analizirana vuka iz severnog dela zemlje koje se ne smatra endemskim područjem lajšmanioze. Ovo istraživanje ukazalo je na porast prevalencije kod vukova u poslednjih decenija na istraživanom području i označilo vukove kao sentinel vrstu za lajšmaniozu na datom terenu (Oleaga et al., 2018). Infekcija vukova sa *L. infantum* serološki je dokazana i u Iranu. Analizom krvnih seruma poreklom od deset vukova, kod jednog je dokazano prisustvo *L. infantum* sa sve tri korišćene metode: direktna aglutinacija, ELISA i IFA (Mohebbali et al., 2005). Lezije karakteristične za visceralnu lajšmaniozu opisane su prvi put kod jednog vuka iz Hrvatske, a prisustvo *L. infantum* kod ove životinje potvrđeno je PCR-om što ukazuje na mogućnost oboljevanja vukova od lajšmanioze izazvane ovom vrstom koja je dominantni uzročnik lajšmanioze pasa u Evropi (Beck et al., 2008). Rezultati navedenih studija ukazuju na potencijalnu ulogu vukova kao rezervoara *L. infantum* i ukazuju na potrebu za istraživanjima na širem području Evrope.

\*\*\*

Omnivorni način ishrane šakala i njihova sposobnost brzog prilagođavanja novim habitatima, kako ruralnim tako i urbanim, dovodi ih u neposrednu blizinu životinja koje žive u kontaktu sa čovekom te tako postoji mogućnost za transmisiju patogena kojima su šakali rezervoari domaćim životinjama i posledično ljudima. Ako se uzme u obzir prisutnost krpelja i drugih



ektoparazita na šakalima, ispunjeni su i svi preduslovi za potencijalno formiranje enzootskih ciklusa za uzročnike zoonoza koje se prenose vektorima sa šakala na druge životinje i čoveka (Gherman & Mihalca, 2017; Tomassone et al., 2018). Iako je autohtona divlja kanida u Evropi pored lisice i vuka, o epizootiološko-epidemiološkom značaju šakala u enzootskim ciklusima lajšmanioze ima najmanje dostupnih podataka. Istraživači iz Španije, opisali su patomorfološke promene kod jednog šakala iz zoološkog vrta u Malagi koje odgovaraju visceralnoj lajšmaniozi. Posmatranjem histoloških preparata promenjenih organa uočene su karakteristične forme, amastigoti *Leishmania* spp. (Hervás et al., 1996). Analiza krvnih seruma poreklom od 13 šakala odstreljenih u Mađarskoj, u regionu koji je u blizini severne granice naše zemlje (Baranya), nije pokazala prisustvo *Leishmania* spp. Pored šakala analizirane su i lisice i domaći psi, kod kojih takođe nije potvrđeno prisustvo lajšmanija. Na osnovu ovih nalaza istraživači zaključuju da u Mađarskoj ne postoji osnova za pojavu autohtonih slučajeva lajšmanioze ali da je neophodno dalje praćenje epizootiološko-epidemiološke situacije (Farkas et al., 2011). Već naredne godine je objavljena studija koja po prvi put ukazuje na postojanje autohtone lajšmanioze kod pasa u Mađarskoj (Tánczos et al., 2012). Skorašnje istraživanje u Rumuniji, potvrdilo je prisustvo *L. infantum* kod jednog od 36 analiziranih šakala. Šakal je odstreljen na lokalitetu koji je u blizini Bugarske granice (Mitková et al., 2017). Iako se Rumunija ne smatra endemskim područjem lajšmanioze u poslednjih 80 godina, 2014. godine je potvrđen prvi autohtoni slučaj oboljenja kod jednog psa (Mircean et al., 2014). Molekularno-serološko istraživanje sprovedeno dve godine kasnije kod pasa u istoj zemlji pokazalo je izloženost populacije pasa u ovoj zemlji *L. infantum*. Potvrđena je seroprevalencija od 3,7% dok je kod još 5% pasa utvrđen granični titar. PCR-om je potvrđena prevalencija od 10% (Dumitrache et al., 2016). Data je hipoteza po kojoj je ovakva epizootiološka situacija kod pasa možda u vezi sa širenjem šakala i njegovom ulogom kao potencijalnog rezervoara lajšmanioze (Mitková et al., 2017).

Istraživanja sprovedena u zemljama van evropskog kontinenta takođe ukazuju na epizootiološki značaj šakala u širenju i održavanju uzročnika lajšmanioze (Strelkova et al., 2015). Direktno ili indirektno prisustvo *Leishmania* spp. potvrđeno je kod šakala u više azijskih zemalja: Iranu (Hamidi et al., 1982; Mohebbali et al., 2016, 2005; Nadim et al., 1978a), Bangladešu (Khan et al., 2012), Gruziji (Babuadze et al., 2014), Iraku (Niazi, 1980), Izraelu (Baneth et al., 1998; Shamir et al., 2001; Talmi-Frank et al., 2010). Takođe *L. infantum* izolovana i kod uhvaćenog slobodnoživećeg šakala u Alžiru. Zbog velike brojnosti i široke distribucije šakala u Severnoj Africi, pridaje im se značaj kao važnim potencijalnim rezervoarima uzročnika lajšmanioze i u ovom delu sveta (Bessad et al., 2012).

Još su istraživanja sprovedena 1970. godine označila divlje kanide kao verovatne rezervoare *Leishmania* spp. i izvor infekcije za domaće kanide i ljude u Iranu, jer je pregledom razmaza koštane srži i slezina kod tada odstreljenih šakala i lisica detektovano prisustvo amastigota *Leishmania* spp. (Nadim et al., 1978b). Naredno istraživanje šakala kao potencijalnih rezervoara lajšmanioze u Iranu sprovedeno je 1982. godine kada je na osnovu mikroskopskog pregleda preparata i biološkog ogleada potvrđeno prisustvo *Leishmania* spp. kod četiri od 161 analiziranog šakala (2,5%), dok je seroprevalencija bila 12,5% (6/48). Parazitološka i serološka istraživanja sprovedena od 1999-2003. godine među domaćim psima i divljim kanidama (šakali, lisice, vukovi) pokazala su da je prevalencija na *Leishmania* spp. kod pasa 14.2%, a kod analiziranih divljih kanida po 10%. Biohemijskim i molekularnim tehnikama potvrđeno je da se u deset od 11 slučajeva kada je bilo moguće odrediti vrstu parazita radilo o *L. infantum*, dok je infekcija sa *L. tropica* potvrđena kod jednog psa (Mohebbali et al., 2005). Istraživanje sprovedeno nekoliko godina kasnije u istoj zemlji, potvrdilo je seroprevalenciju od 11,6% među analiziranim šakalima i ukazalo na njihovu značaj u epizootiologiji lajšmanioze u ovoj zemlji. Pretpostavljeno je da u regionima Irana gde se lajšmanioza javlja endemski, uzročnik cirkuliše između

divljih i domaćih kanida (Moheballi et al., 2016). Epizootiološko istraživanje sprovedeno u Iraku ukazalo je na značajno veću seroprevalenciju na *Leishmania* spp. među analiziranim šakalima u odnosu na lisice i domaće pse. Vrednost seroprevalencije kod šakala bila je 59,6%, kod lisica 8,9% a kod domaćih pasa 10,8%. Navedeni rezultati dali su osnov da se šakali proglašavaju za glavne rezervoare u endemskim područjima visceralne lajšmanioze u Iraku (Niazi, 1980). Nedavno sprovedeno epizootiološko-epidemiološko istraživanje u Gruziji upućuje na veći značaj pasa lotalica i kućnih ljubimaca kao potencijalnih rezervoara uzročnika lajšmanioze u nekoliko endemskih regiona lajšmanioze u ovoj zemlji. Ukupna seroprevalencija na *Leishmania* spp. kod divljih kanida u ovoj studiji bila je 2,6%. Analizirano je ukupno 38 lisica i 39 šakala a po jedna životinja je bila pozitivna. Ukupna seroprevalencija kod vlasničkih pasa bila je 23,7% a kod pasa lotalica 16% (Babuadze et al., 2014).

Pojava lajšmanioze kod jednog deteta i pet pasa sredinom devedesetih godina u centralnom Izraelu, na području gde se ova bolest nije ranije javljala, inicirala je epizootiološko istraživanje kod domaćih i divljih kanida u cilju otkrivanja rezervoara uzročnika lajšmanioze na datom terenu. Otkrivena seroprevalencija kod šakala od 7,6% (4/53) te ubrzana rekolonizacija staništa ove vrste nakon skoro potpunog istrebljenja, ukazala je na potencijalni značaj šakala u širenju i održavanju *L. infantum* na istraživanom području (Baneth et al., 1998). U kasnije sprovedenoj studiji među zdravim, slobodnoživećim šakalima u Izraelu, zabeležena je seroprevalencija od 6,5% (3/46) (Shamir et al., 2001), dok je istraživanjem sprovedenim 2010. godine među analiziranim šakalima potvrđena prevalencija od 7,8% (6/77). Pet od šest pozitivnih šakala, bilo je inficirano sa *L. tropica*. S obzirom na to da inficirane životinje nisu pokazivale kliničke simptome, zaključeno je da šakali mogu biti prirodni domaćini i potencijalni rezervoari i za *L. tropica* (Talmi-Frank et al., 2010). Rezultati oba navedena istraživanja su slični rezultatima do kojih smo došli u sklopi istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom (6,9%).

\*\*\*

Globalne klimatske promene poslednjih decenija pogoduju širenju areala vektora i uslovljavaju njihovu pojavi u regionima sveta gde do sada nisu bili prisutni. Potvrđeno je prisustvo flebotomina u centralnoj Evropi, severno od Alpa, iako se donedavno smatralo da granica areala njihovog rasprostranjenja ne seže toliko ka severu Evrope (Aspöck et al., 2008; Ivović et al., 2015; Naucke & Pesson, 2000; Poepl et al., 2013).

Sumnja na postojanje autohtonih slučajeva lajšmanioze kod ljudi potvrđena je u Nemačkoj kod obolelog deteta koje nikada nije napuštalo teritoriju zemlje (Bogdan et al., 2001). Slučaj oboljenja jedne žene od kutane lajšmanioze u mestu u blizini Londona, u Velikoj Britaniji takođe je okarakterisan kao autohtoni slučaj (Darné & Sinclair, 2006). S obzirom na očigledne epizootičko-epidemiološke promene u pogledu rasprostranjenja lajšmanioze u Evropi, poslednjih decenija postoji opravdana potreba za intenzivnijim epizootičkim izučavanjima ovog oboljenja i konstantnim epidemiološkim nadzorom u zemljama i regionima gde autohtona lajšmanioza do sada nije bila prisutna.

U bivšoj Jugoslaviji visceralna lajšmanioza se javljala endemski u južnoj Srbiji, Makedoniji, priobalju Crne Gore, Hercegovini i Dalmaciji (Petrović, 1980). Prvi autohtoni slučajevi visceralne lajšmanioze u Srbiji potvrđeni su 1945. godine u Nišu i na lokalitetu Dobrič (Simić, 1957). U periodu od 1945 do 1955. godine u Srbiji su zabeležena tri epidemijaska talasa visceralne lajšmanioze a pojedini slučajevi i u okolini Beograda. Zabeleženo je da je 1946. godine prijavljen 161 slučaj a 1953. godine obolela su 234 pacijenta, da bi u naredne tri godine bilo zabeleženo samo 17 slučajeva, što se objašnjava merama koje su bile preduzete u cilju eradikacije vektora malarije (Milovanović & Popović, 1960; Simić, 1957). Istraživanja sprovedena u Nišu i okolini 1955. godine u cilju otkrivanja rezervoara, pokazala su da je preko 2% pasa asimptomatski inficirano lajšmanijama (Simić, 1957). Retki autohtoni slučajevi lajšmanioze zabeleženi su 1968. i 1969. godine u Nišu gde je potvrđeno prisustvo flebotomina: *P. major*, *P.*

*simici* i *P. perfiliewi* (Petrović, 1980). Prema epidemiološkim podacima u Srbiji i Crnoj Gori je u periodu od 1991 do 2000. godine zabeleženo 39 slučajeva visceralne lajšmanioze, od čega je 38 bilo autohtonog porekla, a samo jedan slučaj je bio importovan. U centralnoj Srbiji 2007. godine, zabeležena je stopa incidencije od 0.01/100.000 stanovnika kada je put transmisije bio verovatno zoonotski, sa inficiranih životinja rezervoara ali je izvor infekcije ostao nepoznat. U periodu od 2001–2007. godine od 134 slučaja sa sumnjom na lajšmaniozu analizirana u parazitološkoj laboratoriji Instituta za infektivne i tropske bolesti u Beogradu, kod 22 pacijenta od kojih je većina bila na letovanju u priobalju Crne Gore (16 pacijenata), dokazano je prisustvo *Leishmania* spp. u bojenim razmazima koštane srži. Jedan slučaj je bio poreklom iz južne Srbije bez istorije putovanja u neko od poznatih enzootskih područija što ukazuje na ponovnu pojavu autohtone lajšmanioze u nekadašnjem endemskom području. Preostali slučajevi su bili poreklom sa lokaliteta iz Hercegovine (3 pacijenta) i Kosova (1 pacijent), dok je jedan slučaj bio importovan iz neke od južnoevropskih zemalja (Dakić et al., 2009). Nedavna retrospektivna molekularna studija potvrdila je da su dva pacijenta (iz 2003. i 2006. godine) kod kojih je bila postavljena dijagnoza lajšmanioze u kliničkom centru Srbije, bila inficirana sa *L. infantum* (Dakić et al., 2016). Prvi slučaj visceralne lajšmanioze u koinfekciji sa HIV-om nedavno je potvrđen i kod jednog pacijenta iz Niša čime je potvrđen značaj lajšmanioze kao oportunističke infekcije kod imunokompromitovanih pacijenata i u našoj zemlji. PCR-om je dokazana infekcija sa *L. infantum* (Marjanović et al., 2012).

Prethodna faunistička istraživanja na teritoriji Srbije potvrdila su prisustvo: *Phlebotomus papatasi*, *P. sergenti* (dokazanih vektora za *L. major*), *P. perfiliewi*, *P. tobbi*, *P. neglectus*, *P. balcanicus* (vektora *L. infantum*) i *P. simici* (Mišćević et al., 1998; Živković, 1967). Nedavno je u Vojvodini potvrđeno i prisustvo *P. mascittii*, vrste čiji vektorski potencijal nije dokazan ali se veruje da ima značaj u transmisiji uzročnika lajšmanioze (Melaun et al., 2014). Nedavna istraživanja iz

Austrije (Obwaller et al., 2016) i Italije (S Zanet et al., 2014) potvrdila su prisustvo DNK *L. infantum* kod *P. mascittii* što ne dokazuje ali ide u prilog mogućnosti da je ova flebotomina kompetentni vektor za *L. infantum*. Vaselek i sar. su 2017. godine, po prvi put u Srbiji, dokazali prisustvo DNK *L. infantum* kod flebotomine *P. papatasi* koja je predominantno prisutna vrsta u Vojvodini. Iako se radi o nekompetentnom vektoru za ovu *Leishmania* sp. ovaj nalaz ima epizootiološko-epidemiološki značaj jer ukazuje na prisutnost glavnog uzročnika visceralne lajšmanioze pasa i uzročnika kutane i visceralne lajšmanioze čoveka u severnoj Srbiji. Nekompetentni vektor se verovatno inficirao sa *L. infantum* prilikom uzimanja krvnog obrkoka na inficiranom domaćinu. Ovo istraživanje potvrdilo je i prisustvo još tri vrste flebotomina na lokalitetima sa teritorije Vojvodine: *P. perfiliewi*, *P. neglectus*, dokazanih vektora za *L. infantum* čije je prisustvo dokazano i u ranijim studijama i po prvi put u Srbiji prisustvo *P. mascitti* (Mišćević et al., 1998; Vaselek et al., 2017).

Poslednjih godina opisani su potencijalni autohtoni slučajevi oboljenja pasa od lajšmanioze u severnoj Srbiji. U tri odvojena slučaja, psi sa kliničkim simptomima koji odgovaraju lajšmaniozi (epistaksis, kaheksija, bledilo vidljivih sluznica, problemi sa kožom, slepilo, letargija) bili su seropozitivni na uzročnika bolesti. Oboleli psi prethodno nisu napuštali teritoriju naše zemlje. Iako dijagnoza nije definitivno potvrđena (pregledom razmaza koštane srži, dokazivanjem prisustva uzročnika molekularnim metodama) psi su lečeni kao oboleli od lajšmanioze i terapija je dovela do poboljšanja zdravstvenog stanja (Savić-Jevđenić et al., 2007; Savić et al., 2010). Savić i sar. su 2015. godine sprovode opsežnije serološko ispitivanje kod pasa u severnoj Srbiji na prisutnost antitela protiv uzročnika lajšmanioze. Tom prilikom od 170 analiziranih životinja, njih 18 je bilo seropozitivno. Tri pozitivne životinje su imale kožne lezije koje se dovode u vezu sa lajšmaniozom, a pri tome analizirani psi nikada nisu napuštale teritoriju Srbije. Seroprevalencija na lajšmanije kod grupe lovačkih i vojnih pasa iznosila je 10.12%, kod pasa iz azila

10.33%, dok je kod pasa kućnih ljubimaca vrednost bila 11.11%. Nepostojanje statističke značajnosti u vrednostima prevalencije među različitim grupama pasa ukazalo je na konstantu izloženost populacije pasa uzročniku lajšmanioze u severnoj Srbiji i dalo osnovanu sumnju za postojanje autohtonih slučajeva lajšmanioze pasa u Vojvodini.

Molekularno-epizootiološka istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije potvrdila su ukupnu prevalenciju od 6,9% na *Leishmania* spp. kod šakala sa teritorije Republike Srbije. Od ukupno 216 analiziranih životinja njih 15 je bilo pozitivno na prisustvo DNK lajšmanija. Iako je broj analiziranih uzoraka po godinama od 2011 do 2013. godine bio približno sličan, u 2013. godini zabeležen je značajan porast vrednosti prevalencije od 14,9% što ukazuje na šakale kao potencijalne rezervoare uzročnika lajšmanioze u silvatičnom ciklusu na teritoriji naše zemlje. Statistički značajna razlika u prevalenciji kod mužijaka u odnosu na ženke među analiziranim šakalima daje prostor za razmišljanje da li pol jedinke ima uticaja na pojavu uzročnika kod potencijalnih domaćina rezervoara tj. da li su u pitanju određene bihevijoralne ili razlike imunološke prirode. Seroprevalencija kod mužijaka šakala je bila veća u odnosu na ženke i u istraživanju sprovedenom u Iranu (Niazi, 1980).

Iako je na osnovu svega prethodno navedenog lajšmanioza očigledno oboljenje koje danas zaslužuje poseban epizootiološko-epidemiološki nadzor i u našoj zemlji, istraživanja životinja potencijalnih rezervoara na teritoriji naše zemlje do sada nisu sistematski sprovedena i tačna uloga pojedinih vrsta u širenju i održavanju uzročnika lajšmanioze ostala je nepoznata do danas. Povećanje brojnosti i širenje areala šakala u Srbiji (Milenković & Paunović, 2003), život u neposrednoj blizini domaćih životinja i čoveka, filogenetska bliskost sa domaćim psima, te dokazano prisustvo *Leishmania* spp. kod šakala na više lokaliteta u centralnoj Srbiji i Vojvodini u sklopu ove doktorske disertacije (Ćirović et al., 2014), ukazuju na značaj ove vrste kao potencijalnog rezervoara uzročnika lajšmanioze u Srbiji. Na osnovu pomenutih činjenica i trenutne

epizootiološko-epidemiološke situacije u našoj zemlji i regionu, može se zaključiti da postoje svi preduslovi za pojavu autohtonih slučajeva oboljenja pasa i ljudi od lajšmanioze na široj teritoriji naše zemlje nego što se do sada mislilo. S obzirom na stalne promene faktora koji više ili manje utiču na promenu epizootiološko-epidemiološke situacije na određenoj teritoriji, postoji potreba za kontinuiranim nadzorom određenih oboljenja. Lajšmanioza očigledno više nije egzotična bolest vezana samo za južne krajeve naše zemlje, nego oboljenje koja će u godinama koje dolaze predstavljati ozbiljniju pretnju po zdravlje ljudi i životinja na široj teritoriji naše zemlje. Iz ovog proizilazi potreba za daljim istraživanjima svih faktora vezanih za nastanak, širenje i održavanje lajšmanioze u Srbiji kao i izradu određenih programa prevencije i zaštite od ove značajne vektorima prenosive bolesti.

\*\*\*

Nedavno istraživanje sprovedeno u Srbiji u cilju procene značaja populacije šakala kao "čistača ekosistema," pokazalo je njihovu pozitivnu ulogu u uklanjanju otpada životinjskog porekla i kontroli populacije štetnih glodara. Ako se korist od uklanjanja otpada životinjskog porekla koju šakali obave u toku jedne godine izraz i u novcu, dobije se vrednost od preko 0,5 miliona evra (Ćirović et al., 2016). Međutim, šakali su prepoznati i kao potencijalni domaćini rezervoari većeg broja patogena sa zoonotskim potencijalom (Ćirović et al., 2015; Gherman & Mihalca, 2017; Lalošević et al., 2016; Széll et al., 2013).

U sklopu rezultata ove doktorske disertacije ukazano je na potencijalnu ulogu šakala kao domaćina rezervoara za *B. canis*, glavnog uzročnika babezioze pasa u Evropi, zatim za *A. phagocytophilum*, široko rasprostranjenog i značajnog patogena sa aspekta humane i veterinarske medicine i skrenuta je pažnja na šakale kao potencijalne rezervoare uzročnika lajšmanioze u našoj zemlji. Prisustvo i drugih patogena (*B. microti*, *Borrelia burgdorferi* s.l. i *A. marginale*) čije



je prisustvo potvrđeno u krpeljima sakupljenim sa šakala u našem istraživanju, zahteva i dalja epizootiološko-epidemiološka istraživanja oboljenja koja navedeni patogeni izazivaju. Zbog svega navedenog od velikog su značaja dalja ekološka i epizootiološko-epidemiološkog istraživanja šakala u cilju tačne spoznaje njihove uloge u ekosistemu s obzirom da su vrsta u ekspanziji i da žive često u blizini domaćih životinja i ljudi.

## 7. ZAKLJUČCI

Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije po prvi put u Srbiji su analizirala epizootiološko-epidemiološki značaj šakala kao potencijalnih rezervoara zoonoznih uzročnika koji se prenose vektorima. Na osnovu dobijenih rezultata mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Šakali predstavljaju dobre domaćine za više vrsta krpelja sa dokazanim epizootiološko-epidemiološkim značajem. U našem istraživanju potvrđeno je prisustvo tri vrste krpelja koji parazitiraju na šakalima u Republici Srbiji: *Ixodes ricinus* (54,2%), *Dermacentor reticulatus* (39,8%) i *Haemaphysalis concinna* (5,9%). U krpeljim sakupljenim sa šakala u našoj studiji potvrđeno je prisustvo većeg broja patogena sa zoonotskim potencijalom: *B. canis*, *B. microti*, vrsta iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa (*B. garinii*, *B. valasiana*, *B. lusitaniae*) i *A. marginale*.
2. Rezultati naših istraživanja po prvi put potvrđuju prisustvo *B. canis* kod šakala na teritoriji Srbije i upućuju na potencijalnu ulogu ove vrste u održavanju *B. canis* u silvatičnom ciklusu u našoj zemlji. Molekularnim metodama potvrđena je prevalencija od 4,2% (9/216).
3. Identičnost 18S rRNK sekvence *B. canis* potvrđene kod jednog šakala i *D. reticulatus* krpelja koji je parazitirao na toj životinji, direktno ukazuje na mogućnost postojanja silvatičnog enzootskog transmissionog ciklusa na relaciji domaćin šakal-kompetentni vektor.
4. Potvrđeno prisustvo *B. canis* kod *Ixodes ricinus* (9,4%) i *Dermacentor reticulatus* (17%) krpelja sakupljenih sa šakala u ovoj studiji, ukazuje na mogućnost za prenos ove protozoe posredstvom navedenih krpelja, dokazanih vektora *B. canis* na populaciju domaćih pasa s obzirom na prisustvo šakala u suburbanim zonama.

5. Kod jedne ženke vrste *I. ricinus* sakupljenje sa šakala u ovoj studiji potvrđeno je prisustvo zoonozne *B. microti*. Ovo je prvi dokaz prisustva ovog patogena kod krpelja u centralnoj Srbiji, čime je potvrđena šira distribucija glavnog uzročnika humane babezioze kod nas nego što se mislilo do sad. S obzirom da *B. microti* očigledno cirkuliše na teritoriji naše zemlje ukazano je na potencijalni rizik od pojave ovog oboljenja kod ljudi i u našoj zemlji.
6. Rezultatima naših istraživanja po prvi put je dokazano prisustvo DNK *A. phagocytophilum* molekularnim metodama kod šakala uopšte. Navedeni nalaz ukazuje na potencijalni značaj šakala kao vrste rezervoara u enzootskim ciklusima anaplazmoze izazvane *A. phagocytophilum*. Potvrđena je prevalencija od 0,9% (2/216).
7. Pored toga, kod tri mužjaka vrste *D. reticulatus* sakupljena sa šakala potvrđeno je prisustvo *A. marginale*, značajnog uzročnika babezioze goveda u Mediteranskom regionu. Ovo je prva potvrda prisustva *A. marginale* kod *D. reticulatus* u Srbiji dokazana molekularnim metodama i ukazuje na potencijalni rizik od pojave anaplazmote goveda na teritoriji Republike Srbije .
8. Iako kod analiziranih šakala nije potvrđeno prisustvo vrsta *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa, potvrđeno je prisustvo *B. garinii* kod mužjaka *D. reticulatus*, i *B. valasiana* i *B. lusitaniae* kod mužjaka vrste *I. ricinus* sakupljenih sa šakala. Nalaz ne ukazuje na ulogu šakala u održavanju uzročnika lajmske bolesti ali šakali mehaničkim prenošenjem krpelja inficiranih borelijama mogu indirektno da utiču na epizootologiju i epidemiologiju ovog oboljenja.
9. Potvrđena relativno visoka prevalencija na *Leishmania* spp. kod šakala analiziranih u ovoj doktorskoj disertaciji (15/216, 6,9%), s obzirom na opštu epizootiološko-epidemiološku situaciju po pitanju lajšmanioze u našoj zemlji, ukazuje na šakale kao važne rezervoare uzročnika lajšmanioze u silvatičnom ciklus u Srbiji.
10. Kod analiziranih šakala i krpelja sakupljenih sa njih u ovoj studiji, nije dokazano prisustvo *Rickettsia* spp. *Coxiella burnetii*, *Francisella* spp. i

*Bartonella* spp., čime nije potvrđen potencijalni epizootiološko-epidemiološki značaj šakala u održavanju nabrojanih zoonoznih patogena.

11. Zbog dinamičnih promena epizootiološko-epidemiološke situacije na određenoj teritoriji kroz vreme, naš nalaz ne predstavlja konačnu sliku nego trenutnu epizootiološku situaciju. Neophodna su dalja istraživanja i monitoring nabrojanih patogenih mikroorganizama kod šakala i drugih divljih i domaćih životinja u cilju praćenja epizootiološke situacije u dužem vremenskom periodu radi izrade adekvatnih planova prevencije i suzbijanja pojedinih bolesti od interesa.

## 8. LITERATURA

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G., Forsman, M., 2003. *Survival and Growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 600–606. doi:10.1128/AEM.69.1.600-606.2003
- Abranches, P., Conceição Silva, F.M., Ribeiro, M.M.S., Lopes, F.J., Teixeira Gomes, L., 1983. *Kala azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolation of a Leishmania from a fox. Kala azar Port. IV. wild Reserv. Isol. a Leishmania from a fox.* 77, 420–421.
- Adaszek, Ł., Martinez, A.C., Winiarczyk, S., 2011. *The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland*. *Vet. Parasitol.* 181, 160–165. doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.059
- Afzelius, A., 1921. *Erythema chronicum migrans*. *Acta Derm Venereol* 2, 120–125.
- Aguirre, A.A., 2016. *Parasitic diseases of wildlife and domestic animals: new trends of disease emergence*.
- Aguirre, A.A., 2009. *Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective*. *Parasites vectors* 2, S7. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S7
- Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M.F., Sparagano, O., Luisa, M., Parpaglia, P., Cubeddu, T., Pintori, G., Pittau, M., 2005. *Equine and Canine Anaplasma phagocytophilum Strains Isolated on the Island of Sardinia ( Italy ) Are Phylogenetically Related to Pathogenic Strains from the United States* 71, 6418–6422. doi:10.1128/AEM.71.10.6418
- Alkan, C., Bichaud, L., De Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E.A., Charrel, R.N., 2013. *Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures*. *Antiviral Res.* 100, 54–74. doi:10.1016/j.antiviral.2013.07.005
- Alten, B., Maia, C., Afonso, M.O., Campino, L., Jiménez, M., González, E., Molina, R., Bañuls, A.L., Prudhomme, J., Vergnes, B., Toty, C., Cassan, C., Rahola, N., Thierry, M., Sereno, D., Bongiorno, G., Bianchi, R., Khoury, C., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., Christodoulou, V., Mazeris, A., Karakus, M., Ozbek, Y., Arserim, S.K., Erisoz Kasap, O., Gunay, F., Oguz, G., Kaynas, S., Tsertsivadze, N., Tskhvaradze, L., Giorgobiani, E., Gramiccia, M., Volf, P., Gradoni, L., 2016. *Seasonal Dynamics of Phlebotomine Sand Fly Species Proven Vectors of Mediterranean Leishmaniasis Caused by Leishmania infantum*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004458. doi:10.1371/journal.pntd.0004458
- Anderson, A., Bijlmer, H., Fournier, P.-E., Graves, S., Hartzell, J., Kersh, G.J., Limonard, G., Marrie, T.J., Massung, R.F., McQuiston, J.H., Nicholson, W.L.,

- Paddock, C.D., Sexton, D.J., 2013. *Diagnosis and Management of Q Fever – United States, 2013 Recommendations from CDC and the Q Fever Working Group Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff MMWR Editorial Board. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 62.
- Angelakis, E., Waton, J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouard, S., Dellamonica, P., 2010. *Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy Caused by Bartonella henselae after Tick Bite* 50, 549–551. doi:10.1086/650172
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. *Re-emergence of Leishmaniasis in Spain: Community outbreak in Madrid, Spain, 2009 TO 2012. Eurosurveillance* 18, 1–9. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20546
- Arnold, J., Humer, A., Heltai, M., Murariu, D., Spassov, N., Hackländer, K., 2012. *Current status and distribution of golden jackals Canis aureus in Europe. Mamm. Rev.* 42, 1–11. doi:10.1111/j.1365-2907.2011.00185.x
- Arsić, B., Gligić, A., Ristanović, E., Lako, B., Potkonjak, A., Peruničić, M., Pavlović, M., 2014. *A case of human monocytic ehrlichiosis in Serbia. Srp. Arh. Celok. Lek.* 142, 79–82. doi:10.2298/SARH1402079A
- Arsuaga, M., Gonzalez, L.M., Lobo, C.A., de la Calle, F., Bautista, J.M., Azcárate, I.G., Puente, S., Montero, E., 2016. *First Report of Babesia microti-Caused Babesiosis in Spain. Vector Borne Zoonotic Dis.* 16, 677–9. doi:10.1089/vbz.2016.1946
- Aspöck, H., Gerersdorfer, T., Formayer, H., Walochnik, J., 2008. *Wiener klinische Wochenschrift Sandflies and sandfly-borne infections of humans in Central Europe in the light of climate change* 24–29. doi:10.1007/s00508-008-1072-8
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. *A review of Bovine anaplasmosis. Transbound. Emerg. Dis.* 58, 1–30. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x
- Babuadze, G., Alvar, J., Argaw, D., Koning, H.P. De, Iosava, M., Kekelidze, M., Tsertsvadze, N., Tsereteli, D., Chakhunashvili, G., 2014. *Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Georgia* 8, 1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0002725
- Baldwin, C.J., Panciera, R.J., Morton, R.J., Cowell, A.K., Waurzyniak, B.J., 1991. *Acute tularemia in three domestic cats. J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199, 1602–5.
- Baneth, G., 2018. *Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. Vet. Parasitol.* 254, 58–63. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.001
- Baneth, G., Dank, G., Keren-Kornblatt, E., Sekeles, E., Adini, I., Eisenberger, C.L., Schnur, L.F., King, R., Jaffe, C.L., 1998. *Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 722–5.
- Baneth, G., Florin-Christensen, M., Cardoso, L., Schnittger, L., 2015. *Reclassification*

- of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasites and Vectors* 8, 1–7. doi:10.1186/s13071-015-0830-5
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis : part one. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- Baneth, G., Nasereddin, A., Abdeen, Z., Jaffe, C.L., 2014. *Leishmania tropica* infection in wild and domestic canines 7, 3305. doi:10.1186/1756-3305-7-S1-O27
- Baneth, G., Thamsborg, S.M., Otranto, D., Guillot, J., Blaga, R., Deplazes, P., Solano-Gallego, L., 2016. Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. *J. Comp. Pathol.* 155, S54–S74. doi:10.1016/j.jcpa.2015.10.179
- Bartley, P.M., Hamilton, C., Wilson, C., Innes, E.A., Katzer, F., 2016. Detection of *Babesia annae* DNA in lung exudate samples from Red foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. *Parasites and Vectors* 9, 1–8. doi:10.1186/s13071-016-1364-1
- Bates, P.A., 2009. Europe PMC Funders Group *Leishmania* sand fly interaction : progress and challenges 11, 340–344. doi:10.1016/j.mib.2008.06.003.*Leishmania*
- Baumgartner, W., Schlerka, G., Fumicz, M., Stöger, J., Awad-Masalmeh, M., Schuller, W., Weber, P., 1992. Seroprevalence survey for *Anaplasma marginale*-infection of Austrian cattle. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 39, 97–104.
- Beck, A., Beck, R., Kusak, J., Gudan, A., Martinković, F., Artuković, B., Hohšteter, M., Huber, Đ., Marinculić, A., Grabarević, Ž., 2008. A Case of Visceral Leishmaniosis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *J. Wildl. Dis.* 44, 451–456. doi:10.7589/0090-3558-44.2.451
- Beck, A., Huber, D., Polkinghorne, A., Kurilj, A.G., Benko, V., Mrljak, V., Reljić, S., Kusak, J., Reil, I., Beck, R., 2017. The prevalence and impact of *Babesia canis* and *Theileria* sp. in free-ranging grey wolf (*Canis lupus*) populations in Croatia. *Parasites and Vectors* 10. doi:10.1186/s13071-017-2106-8
- Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živočnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int. J. Parasitol.* 39, 843–848. doi:10.1016/j.ijpara.2008.12.005
- Bern, C., Maguire, J.H., Alvar, J., 2008. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis 2. doi:10.1371/journal.pntd.0000313
- Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G., Harrat, Z., 2012. *Leishmania infantum* MON-1 isolé d'un chacal doré (*Canis aureus*) en Grande Kabylie (Algérie). *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* 105, 5–7. doi:10.1007/s13149-011-0182-4
- Beugnet, F., 2013. *Guide to vector borne diseases of pets. France* by Merial, Lyon.
- Billeter, S.A., Levy, M.G., Chomel, B.B., Breitschwerdt, E.B., 2008. *Vector*

- transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22, 1–15. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x
- Binnington, K.C., Kemp, D.H., 1980. Role of Tick Salivary Glands in Feeding and Disease Transmission. *Adv. Parasitol.* 18, 315–339. doi:10.1016/S0065-308X(08)60403-0
- Birkenheuer, A.J., Correa, M.T., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2005. Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dog bites: 150 cases (2000-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227, 942–947. doi:10.2460/javma.2005.227.942
- Birkenheuer, A.J., Horney, B., Bailey, M., Scott, M., Sherbert, B., Catto, V., Marr, H.S., Camacho, A.T., Ballman, A.E., 2010. *Babesia microti*-like infections are prevalent in North American foxes. *Vet. Parasitol.* 172, 179–182. doi:10.1016/j.vetpar.2010.05.020
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172–4177. doi:10.1128/JCM.41.9.4172-4177.2003
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2004. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. *Vet. Parasitol.* 124, 151–160. doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.008
- Bogdan, C., Schönian, G., Bañuls, A.L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rölinghoff, M., Mertens, R., 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 32, 302–6. doi:10.1086/318476
- Bogunović, D., 2018. Molekularna i serološka istraživanja prisustva bakterije *Coxiella burnetii* u tkivima pasa i krpeljima (Acari: Ixodidae) sakupljenim sa ispitivanih životinja. Doktorska disertacija. Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
- Bogunović, D., Stević, N., Sidi-Boumedine, K., Mišić, D., Tomanović, S., Kulišić, Z., Magaš, V., Radojičić, S., 2018. Molecular evidence of *q* fever agent *Coxiella burnetii* in ixodid ticks collected from stray dogs in belgrade (Serbia). *Acta Vet. Brno.* 68, 257–268. doi:10.2478/acve-2018-0023
- Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicollet, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., Maingourd, C., Alongi, A., Torina, A., Fernández de Mera, I.G., Vicente, J., George, J.-C., Vayssier-Taussat, M., Joncour, G., 2013. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Adult *Dermacentor* spp. Ticks from Nine Collection Sites in France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 226–236. doi:10.1089/vbz.2011.0933
- Boussaa, S., Guernaoui, S., Pesson, B., Boumezzough, A., 2005. Seasonal fluctuations



- of phlebotomine sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the urban area of Marrakech, Morocco. *Acta Trop.* 95, 86–91. doi:10.1016/j.actatropica.2005.05.002
- Breitschwerdt, E.B., 2017. Bartonellosis , *One Health and all creatures great and small*. doi:10.1111/vde.12413
- Breitschwerdt, E.B., 2014. Bartonellosis: One Health Perspectives for an Emerging Infectious Disease 55. doi:10.1093/ilar/ilu015
- Breitschwerdt, E.B., Kordick, D.L., 2000. Bartonella Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 428–438. doi:10.1128/CMR.13.3.428
- Breitschwerdt, E.B., Linder, K.L., Day, M.J., Maggi, R.G., 2013. Koch ' s Postulates and the Pathogenesis of Comparative Infectious Disease Causation Associated with Bartonella species. *J. Comp. Pathol.* 148, 115–125. doi:10.1016/j.jcpa.2012.12.003
- Breitschwerdt, E.B., Maggi, R.G., Chomel, B.B., Lappin, M.R., 2010. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* 20, 8–30. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x
- Brickner, I., 2000. The impact of domestic dogs (*Canis familiaris*) on wildlife welfare and conservation: a literature review. *Prof. Yoram Yom-Tov* 31.
- Brown, G.K., Martin, a R., Roberts, T.K., Aitken, R.J., 2001. Detection of Ehrlichia platys in dogs in Australia. *Aust. Vet. J.* 79, 554–8. doi:10.1128/JCM.42.7.3333
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A Dog-Related Outbreak of Q Fever 1994–1996.
- Cabannes, A., Pelse, H., Appriou, F.L.M., 2002. Séroprévalence de la babésiose canine dans le Sud-Ouest de la France 27–28.
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniosis: Strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173–180. doi:10.1016/S0304-4017(97)00208-2
- Camacho, A.T., Guitián, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Goethert, H.K., Telford, S.R., 2001. Infection of dogs in north-west Spain with a Babesia microti-like agent. *Vet. Rec.* 149, 552–555. doi:10.1136/vr.149.18.552
- Caminopetros, J., 1948. La fièvre Q en Grèce. Le lait source de l'infection pour l'homme et les animaux. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 23, 107–108.
- Capelli, G., Ravagnan, S., Montarsi, F., Ciocchetta, S., Cazzin, S., Porcellato, E., Babiker, A.M., Cassini, R., Salviato, A., Cattoli, G., Otranto, D., 2012. Occurrence and identification of risk areas of Ixodes ricinus-borne pathogens: A cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. *Parasites and Vectors* 5, 61. doi:10.1186/1756-3305-5-61

- Cardoso, L., Cortes, H.C.E., Reis, A., Rodrigues, P., Simões, M., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., Talmi-Frank, D., Eyal, O., Solano-Gallego, L., Baneth, G., 2013. Prevalence of *Babesia microti*-like infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Vet. Parasitol.* 196, 90–95. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.060
- Cardoso, L., Costa, Á., Tuna, J., Vieira, L., Eyal, O., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2008. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 156, 199–204. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.027
- Cardoso, L., Pennisi, M.G., Solano-gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Veterinary Parasitology Directions for the diagnosis , clinical staging , treatment and prevention of canine leishmaniosis 165, 1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
- Carvalho, C.L., Lopes de Carvalho, I., Zé-Zé, L., Nuncio, M.S., Duarte, E.L., 2014. Tularaemia: A challenging zoonosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 85–96. doi:10.1016/j.cimid.2014.01.002
- Carvalho, I.L. De, Milhano, N., Santos, A.S., Almeida, V., Barros, S.C., Sousa, R. De, Nuncio, M.S., 2008. Detection of *Borrelia lusitaniae* , *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis* , and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Collected in Madeira Island, Portugal. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 575–580. doi:10.1089/vbz.2007.0245
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, J.C., 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 65–70.
- Cassini, R., Zanutto, S., di Regalbono, A.F., Gabrielli, S., Calderini, P., Moretti, A., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2009. Canine piroplasmosis in Italy: epidemiological aspects in vertebrate and invertebrate hosts. *Vet. Parasitol.* 165, 30–35. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.044
- Checa, R., López-Beceiro, A.M., Montoya, A., Barrera, J.P., Ortega, N., Gálvez, R., Marino, V., González, J., Olmeda, Á.S., Fidalgo, L.E., Miró, G., 2018. *Babesia microti*-like piroplasm (syn. *Babesia vulpes*) infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in NW Spain (Galicia) and its relationship with *Ixodes hexagonus*. *Vet. Parasitol.* 252, 22–28. doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.011
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Williams, C., Wey, A.C., Henn, J.B., Maggi, R., Carrasco, S., Mazet, J., Boulouis, H.J., Maillard, R., Breitschwerdt, E.B., 2009. Bartonella Endocarditis A Pathology Shared by Animal Reservoirs and Patients 126, 120–126. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04523.x
- Christenson, B., 1984. An Outbreak of Tularemia in the Northern Part of Central Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* 16, 285–290. doi:10.3109/00365548409070402
- Christova, I.V.A., Schouls, L.E.O., Pol, I.V.A.N.D.E., Park, J., Panayotov, S., Lefterova, V., Kantardjiev, T., Dumler, J.S., 2001. High Prevalence of

*Granulocytic Ehrlichiae and Borrelia burgdorferi Sensu Lato in Ixodes ricinus Ticks from Bulgaria* 39, 4172–4174. doi:10.1128/JCM.39.11.4172

- Cinco, M., Padovan, D., Murgia, R., Maroll, M., Frusteri, L., Heldtander, M., Johansson, K.E., Engvall, E.O., 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*
- Ćirović, D., Chochlakis, D., Tomanović, S., Sukara, R., Penezić, A., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., 2014. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/728516
- Ćirović, D., Milenković, M., Paunović, M., 2006. Morphometry of the golden jackal *Canis aureus* from Serbia, in: *80 Jahrestagung*. Kiel, Germany, p. 9.
- Ćirović, D., Penezić, A., Krofel, M., 2016. Jackals as cleaners: Ecosystem services provided by a mesocarnivore in human-dominated landscapes. *Biol. Conserv.* 199, 51–55. doi:10.1016/j.biocon.2016.04.027
- Ćirović, D., Penezić, A., Milenković, M., Paunović, M., 2008. Present distribution and factors of range spread of golden jackal (*Canis aureus* L. 1758) in Serbia, in: *In Proceedings of the International Conference on Large Carnivores*. Žagubica, Serbia.
- Ćirović, D., Penezić, A., Plečaš, M., 2018. Šakal (*Canis aureus*) u predelima sa dominantnim antropogenim uticajem, in: Pokorny, B., Kmetec, U. (Eds.), 10. Slovenski lovski dan, Šakal v Sloveniji in Na Balkanu: Stanje in Upravljalovski Izzivi. Lovska zveza Slovenije, Koper, 6. oktobar 2018, pp. 13–14.
- Ćirović, D., Teodorović, V., Vasilev, D., Marković, M., Čosoć, N., Dimitrijević, M., Klun, I., Djurković-Djaković, O., 2015. A large-scale study of the *Trichinella* genus in the golden jackal (*Canis aureus*) population in Serbia. *Vet. Parasitol.* 212, 253–256. doi:10.1016/j.vetpar.2015.07.022
- Claborn, D.M., 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *J. Glob. Infect. Dis.* 2, 127–34. doi:10.4103/0974-777X.62866
- Clark, K.L., Leydet, B., Hartman, S., 2013. Lyme borreliosis in human patients in Florida and Georgia, USA. *Int. J. Med. Sci.* 10, 915–931. doi:10.7150/ijms.6273
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A., 2009. Hemoprotozoa of domestic animals in France: Prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* 159, 73–76. doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.012
- Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog. *Vet. Parasitol.* 117, 123–129. doi:10.1016/j.vetpar.2003.08.006
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E.,

- Roldan-Soriano, M.A., Diaz-Sanchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet. Parasitol.* 92, 245–251. doi:10.1016/S0304-4017(00)00329-0
- Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J.C., Jefferies, R., Irwin, P., 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Vet. Parasitol.* 144, 261–269. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.042
- Criado, A., Martinez, J., Buling, A., Barba, J.C., Merino, S., Jefferies, R., Irwin, P.J., 2006. New data on epizootiology and genetics of piroplasms based on sequences of small ribosomal subunit and cytochrome b genes. *Vet. Parasitol.* 142, 238–247. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.004
- D'Amico, G., Dumitrache, M.O., Matei, I.A., Ionică, A.M., Gherman, C.M., Sándor, A.D., Modrý, D., Mihalca, A.D., 2017. Ixodid ticks parasitizing wild carnivores in Romania. *Exp. Appl. Acarol.* 139–149. doi:10.1007/s10493-017-0108-z
- Dakić, Z., Nielsen, H.V., Pavlović, M., Poluga, J., Stevanović, G., Lavadinović, L., Milošević, B., Pelemiš, M., Urošević, A., Jovanović, S., Stensvold, C.R., 2016. Retrospective PCR-based species identification of *Leishmania* in two patients with visceral leishmaniasis in Serbia. *JMM Case Reports* 3, e005063. doi:10.1099/jmmcr.0.005063
- Dakić, Z.D., Pelemis, M.R., Stevanović, G.D., Poluga, J.L., Lavadinović, L.S., Milosević, I.S., Indjić, N.K., Ofori-Belić, I.V., Pavlović, M.D., 2009a. Epidemiology and diagnostics of visceral leishmaniasis in Serbia. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 1173–1176. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02768.x
- Dantas-Torres, F., 2015. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 4, 452–461. doi:10.1016/j.ijppaw.2015.07.001
- Dantas-Torres, F., 2011. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.* 27, 155–159. doi:10.1016/j.pt.2010.12.006
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437–446. doi:10.1016/j.pt.2012.07.003
- Dantas-torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet. Parasitol.* 208, 9–13. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.014
- Darné, S., Sinclair, S.A., 2006. A sandfly in Surrey? A case of cutaneous leishmaniasis

- in the United Kingdom without history of recent travel to an endemic area. *Clin. Exp. Dermatol.* 31, 155–156. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01984.x
- Davis, G., Cox, H., Parker, R., Dyer, R., 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Heal. Reports* 2259.
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2015. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Vet. Hung.* 63, 199–208. doi:10.1556/AVet.2015.017
- Davoust, B., Mary, C., Marié, J.-L., 2014. Detection of *Leishmania* in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) from Southeastern France Using Real-time Quantitative PCR. *J. Wildl. Dis.* 50, 130–132. doi:10.7589/2013-07-190
- De Carvalho, I.L., Escudero, R., García-Amil, C., Falcão, H., Anda, P., Nuncio, M.S., 2007. *Francisella tularensis*, Portugal [13]. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 666–667. doi:10.3201/eid1304.060714
- de la Fuente, J., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci. Volume*, 6938. doi:10.2741/3200
- de La Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M., 2006. Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitol. Res.* 100, 85–91. doi:10.1007/s00436-006-0244-6
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2014. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev. Vet. Med.* 113, 430–435. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.12.001
- Dennis, D.T., Inglesby, T. V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Tonat, K., for the Working Group on Civilian Biodefense, 2001. Tularemia as a Biological Weapon. *JAMA* 285, 2763. doi:10.1001/jama.285.21.2763
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P.E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe : a review 1–8.
- Derrick, E., 1937. "Q" Fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med. J. Aust.* 2, 281–299.
- Dezek, D., Vojta, L., Čurković, S., Lipej, Z., Mihaljević, Ž., Coetnić, Ž., Beck, R., 2010. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Vet. Parasitol.* 172, 333–336. doi:10.1016/j.vetpar.2010.05.022

- Dimitrijević, S., Ilić, T., 2011. *Klinička parazitologija. Fakultet veterinarske medicine, Beograd.*
- Dipineto, L., Manna, L., Baiano, A., Gala, M., Fioretti, A., Gravino, A.E., Menna, L.F., 2007. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Southern Italy. *J. Wildl. Dis.* 43, 518–520. doi:10.7589/0090-3558-43.3.518
- Divers, T.J., Gardner, R.B., Madigan, J.E., Witonsky, S.G., Bertone, J.J., Swinebroad, E.L., Schutzer, S.E., Johnson, A.L., 2018. *Borrelia burgdorferi* Infection and Lyme Disease in North American Horses: A Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 617–632. doi:10.1111/jvim.15042
- Eremeeva, M., Yu, X., Raoult, D., 1994. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of *Differentiation among Spotted Fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified* 32, 803–810.
- Dokić, M., Čurčić, P., Darko, N., Branislav, L., Vesna, B., Rajić-Dimitrijević, R., Hristović, D., 2006. *Humana erlihioza. Vojnosanit. Pregl.* 63, 403–408.
- Dreher, U.M., Fuente, J. De, Meli, M.L., Pusterla, N., Kocan, K.M., Woldehiwet, Z., Braun, U., Regula, G., Staerk, K.D.C., Lutz, H., 2005. Serologic Cross-Reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* 12, 1177–1183. doi:10.1128/CDLI.12.10.1177
- Duha, D., Tozon, N., Petrovec, M., Strašek, K., Avšič-Županc, T., 2004. Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35, 239–250. doi:10.1051/vetres:2004018
- Dumitrache, M.O., Matei, I.A., Ionică, A.M., Kalmár, Z., D'Amico, G., Sikó-Barabási, S., Ionescu, D.T., Gherman, C.M., Mihalca, A.D., 2015. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Romania. *Parasit. Vectors* 8, 514. doi:10.1186/s13071-015-1130-9
- Dumitrache, M.O., Nachum-biala, Y., Gilad, M., Mircean, V., Cazan, C.D., Mihalca, A.D., Baneth, G., 2016. The quest for canine leishmaniasis in Romania : the presence of an autochthonous focus with subclinical infections in an area where disease occurred. *Parasit. Vectors* 1–7. doi:10.1186/s13071-016-1583-5
- Dumler, J.S., 2005. *Anaplasma and Ehrlichia* infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 361–373. doi:10.1196/annals.1355.069
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145–65. doi:10.1099/00207713-51-6-2145

- Duscher, G.G., Fuehrer, H.-P., Kübber-Heiss, A., 2014. Fox on the run - molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. *Parasit. Vectors* 7, 521. doi:10.1186/s13071-014-0521-7
- Duscher, G.G., Kübber-Heiss, A., Richter, B., Suchentrunk, F., 2013. A golden jackal (*Canis aureus*) from Austria bearing *Hepatozoon canis*- import due to immigration into a non-endemic area? *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 133–137. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.10.040
- Ebani, V., Cerri, D., Fratini, F., Ampola, M., Andreani, E., 2008. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic and wild animals from central Italy. *New Microbiol.* 31, 371–375.
- Ebani, V. V., Verin, R., Fratini, F., Poli, A., Cerri, D., 2011. Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from central Italy. *J. Wildl. Dis.* 47, 699–703. doi:10.7589/0090-3558-47.3.699
- Eldin, C., Mahamat, A., Djossou, F., Raoult, D., 2015. Rainfall and Sloth Births in May , Q Fever in July , Cayenne , French Guiana 92, 979–981. doi:10.4269/ajtmh.14-0751
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J., Maurin, M., 2017. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection : a Paradigm Change 30, 115–190.
- Eliasson, H., Lindbäck, J., Nuorti, J.P., Arneborn, M., Giesecke, J., Tegnell, A., 2002. The 2000 Tularemia Outbreak : A Case-Control Study of Risk Factors in Disease-Endemic and Emergent Areas , Sweden 8, 956–960.
- Erdélyi, K., Mezosi, L., Vladov, S., Földvári, G., 2014. Fatal acute babesiosis in captive grey wolves (*Canis lupus*) due to *Babesia canis*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 281–283. doi:10.1016/j.ttbdis.2013.11.003
- Esch, K.J., Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 58–85. doi:10.1128/CMR.00067-12
- Estrada-peña, A., Álvarez-jarreta, J., Cabezas-cruz, A., 2018. Infection , Genetics and Evolution Reservoir and vector evolutionary pressures shaped the adaptation of *Borrelia*. *Infect. Genet. Evol.* 0–1. doi:10.1016/j.meegid.2018.03.023
- Estrada-Peña, A., Ayllón, N., de la Fuente, J., 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Front. Physiol.* 3 MAR, 1–12. doi:10.3389/fphys.2012.00064
- Estrada-Peña, A., Bouattour, Camicas, J.-L., Walker, A.R., 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species 131.
- Estrada-Peña, A., Jongejan, F., 1999. Ticks feeding on humans: A review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp.*

*Appl. Acarol.* 23, 685–715. doi:10.1023/A:1006241108739

- Fabbri, E., Caniglia, R., Galov, A., Arbanasić, H., Lapini, L., Bošković, I., Florijančić, T., Vlasseva, A., Ahmed, A., Mirchev, R.L., Randi, E., 2014. Genetic structure and expansion of golden jackals (*Canis aureus*) in the north-western distribution range (Croatia and eastern Italian Alps). *Conserv. Genet.* 15, 187–199. doi:10.1007/s10592-013-0530-7
- Falkenö, U., Tasker, S., Osterman-Lind, E., Tvedten, H.W., 2013. *Theileria annae* in a young Swedish dog. *Acta Vet. Scand.* 55, 50. doi:10.1186/1751-0147-55-50
- Farkas, R., Solymosi, N., Takács, N., Hornyák, Á., Hornok, S., Nachum-Biala, Y., Baneth, G., 2014. First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. *Parasit. Vectors* 7, 303. doi:10.1186/1756-3305-7-303
- Farkas, R., Takács, N., Hornyák, Á., Nachum-Biala, Y., Hornok, S., Baneth, G., 2015. First report on *Babesia cf. microti* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Hungary. *Parasit. Vectors* 8, 55. doi:10.1186/s13071-015-0660-5
- Farkas, R., Tánczos, B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J., Ready, P.D., 2011. First Surveys to Investigate the Presence of Canine Leishmaniasis and Its Phlebotomine Vectors in Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 823–834. doi:10.1089/vbz.2010.0186
- Feliciangeli, M.D., 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies 71–80.
- Finkelstein, J.L., Brown, T.P., O'reilly, K.L., Wedincamp, J., Foil, L.D., 2002. Studies on the Growth of *Bartonella henselae* in the Cat Flea (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J. Med. Entomol.* 39, 915–919. doi:10.1603/0022-2585-39.6.915
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). *Vet. Parasitol.* 83, 87–97. doi:10.1016/S0304-4017(99)00074-6
- Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., Sprong, H., 2016. *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise. *Parasites and Vectors.* doi:10.1186/s13071-016-1599-x
- Fournier, P.E., Durand, J.P., Rolain, J.M., Camicas, J.L., Tolou, H., Raoult, D., 2003. Detection of Astrakhan fever rickettsia from ticks in Kosovo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 158–161. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07357.x
- Francis, E., 1937. Sources of Infection and Seasonal Incidence of *Tularaemia* in Man. *Public Heal. Reports* 52, 103. doi:10.2307/4582067
- Francis, E., 1925. *Tularemia*. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 84, 1243. doi:10.1001/jama.1925.02660430001001
- Fülöp, B., Poggensee, G., 2008. Epidemiological situation of Lyme borreliosis in



- Germany : Surveillance data from six Eastern German States , 2002 to 2006 1–4. doi:10.1007/s00436-008-1060-y
- Gabrielli, S., Otašević, S., Ignjatović, A., Savić, S., Fraulo, M., Arsić-Arsenijević, V., Momčilović, S., Cancrini, G., 2015. Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 535–538. doi:10.1089/vbz.2015.1797
- Gama, A., Elias, J., Ribeiro, A.J., Alegria, N., Schallig, H.D.F.H., Silva, F., Santarém, N., Cardoso, L., Cotovio, M., 2014. Veterinary Parasitology Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal. *Vet. Parasitol.* 200, 189–192. doi:10.1016/j.vetpar.2013.12.005
- García, A.T.C., 2006. *Piroplasma* infection in dogs in northern Spain. *Vet. Parasitol.* 138, 97–102. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.043
- Gebre-Michael, T., Balkew, M., Ali, A., Ludovisi, A., Gramiccia, M., 2004. The isolation of *Leishmania tropica* and *L. aethiopica* from *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) species (*Diptera: Psychodidae*) in the Awash Valley, northeastern Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 64–70. doi:10.1016/S0035-9203(03)00008-7
- Gern, L., 2014. Life Cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and Transmission to Humans. doi:10.1159/000213068
- Gherman, C.M., Mihalca, A.D., 2017. A synoptic overview of golden jackal parasites reveals high diversity of species. *Parasites and Vectors* 10, 1–40. doi:10.1186/s13071-017-2329-8
- Giannatos, G., 2004. Conservation Action Plan for the golden jackal *Canis aureus* L. in Greece. WWF Greece.
- Gligić, A., Mišćević, Z., Tesh, R.B., Travassos da Rosa, A., Živković, V., 1982. First isolations of Naples sandfly fever virus in Yugoslavia. *Mikrobiologija* 19, 167–175.
- Gomes, C., Ruiz, J., 2017. Carrion's Disease: the Sound of Silence. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, 1–51. doi:10.1128/CMR.00056-17
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., Levin, M., 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 171–180. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.12.003
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Weiss, L., 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 1, 3–10. doi:10.1016/j.ttbdis.2009.11.003
- Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E., 2009. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009, 1–12. doi:10.1155/2009/593232

- Guan, G., Ma, M., Moreau, E., Liu, J., Lu, B., Bai, Q., Luo, J., Jorgensen, W., Chauvin, A., Yin, H., 2009. A new ovine *Babesia* species transmitted by *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Exp. Parasitol.* 122, 261–267. doi:10.1016/j.exppara.2009.05.001
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Vet. Microbiol.* 149, 1–16. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.007
- Guelmino, D.J., Jevtić, M., 1955. An Epidemiological and Hematological Study of Sandfly Fever in Serbia. *Acta Trop.* 12, 179–82.
- Guglielmone, A. a, 2010. Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world:... *Zootaxa* 2528, 1–28. doi:10.1023/A:1025381712339
- Guglielmone, A.A., Apanaskevich, D.A., Estrada-Peña, A., Robbins, R.G., Petney, T.N., Horak, I.G., 2014. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae), *The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. doi:10.1007/978-94-007-7497-1
- Gülenber, A., Gorenflot, A., Schetters, T.P.M., Carcy, B., 2006. First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet. Parasitol.* 139, 224–230. doi:10.1016/j.vetpar.2006.02.035
- Güner, E.S., Hashimoto, N., Takada, N., Kaneda, K., Imai, Y., Masuzawa, T., 2003. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J. Med. Microbiol.* 52, 807–813. doi:10.1099/jmm.0.05205-0
- Gürçan, Ş., 2014. Epidemiology of Tularemia 3–10. doi:10.5152/balkanmedj.2014.13117
- Guryčová, D., Kocianová, E., Výrosteková, V., Řeháček, J., 1995. Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 469–474. doi:10.1007/BF01721235
- Hamel, D., Silaghi, C., Knaus, M., Visser, M., Kusi, I., Rapti, D., Rehbein, S., Pfister, K., 2009. Detection of *Babesia canis* subspecies and other arthropod-borne diseases in dogs from Tirana, Albania. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 42–45. doi:10.1007/s00508-009-1234-3
- Hamel, D., Silaghi, C., Lescai, D., Pfister, K., 2012. Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and pet dogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. *Parasitol. Res.* 110, 1537–1545. doi:10.1007/s00436-011-2659-y
- Hamidi, A.N., Nadim, A., Edrissian, G.H.H., Tahwildar-Bidruni, G.H., Javadian, E., 1982. Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 756–757. doi:10.1016/0035-9203(82)90100-6
- Han, B.A., Paul, J., Bowden, S.E., Drake, J.M., 2015. Rodent reservoirs of future

zoonotic diseases 112. doi:10.1073/pnas.1501598112

- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany, in: *International Journal of Medical Microbiology, Supplement*. pp. 86–92. doi:10.1016/S1433-1128(04)80013-5
- Hartelt, K., Rieker, T., Oehme, R.M., Brockmann, S.O., Müller, W., Dorn, N., 2007. First evidence of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) in dogs in Western Europe. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 163–166. doi:10.1089/vbz.2006.0580
- Heglasová, I., Víchová, B., Kraljik, J., Mo, L., Miklisová, D., Stanko, M., 2018. Ticks and Tick-borne Diseases Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia 9, 1400–1406. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.06.011
- Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C., 1996. Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet. Rec.* 139, 293–5. doi:10.1136/VR.139.12.293
- Hestvik, G., Warns-Petit, E., Smith, L.A., Fox, N.J., Uhlhorn, H., Artois, M., Hannant, D., Hutchings, M.R., Mattsson, R., Yon, L., Gavier-Widen, D., 2015. The status of tularemia in Europe in a one-health context: A review. *Epidemiol. Infect.* 143, 2137–2160. doi:10.1017/S0950268814002398
- Hildebrandt, A., Gray, J.S., Hunfeld, K.P., 2013. Human Babesiosis in Europe: What clinicians need to know. *Infection* 41, 1057–1072. doi:10.1007/s15010-013-0526-8
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., Kiehntopf, M., Fricke, H.J., Straube, E., 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 595–601. doi:10.1007/s10096-007-0333-1
- Hirai, K., To, H., 1998. *Advances in the Understanding of Coxiella burnetii Infection in Japan.*
- Hodžić, A., Alić, A., Fuehrer, H.-P., Harl, J., Wille-Piazzai, W., Duscher, G., 2015a. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit. Vectors* 8, 88. doi:10.1186/s13071-015-0692-x
- Hodžić, A., Cézanne, R., Duscher, G.G., Harl, J., Glawischnig, W., Fuehrer, H.-P., 2015b. *Candidatus Neoehrlichia* sp. in an Austrian fox is distinct from *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, but closer related to *Candidatus Neoehrlichia lotoris*. *Parasit. Vectors* 8, 539. doi:10.1186/s13071-015-1163-0
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gonczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schupbach, J., Jorger, K., Thoma, R., Griot, C., Stark, K.D.C., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H., 2004. *Concurrent Infections with Vector-*

- Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3775–3780. doi:10.1128/JCM.42.8.3775-3780.2004
- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 451–69. doi:10.1128/CMR.13.3.451-469.2000
- Hommel, M., 1999. *Visceral Leishmaniasis : Biology of the Parasite.*
- Honig, V., Carolan, H.E., Vavruskova, Z., Massire, C., Mosel, M.R., Crowder, C.D., Rounds, M.A., Ecker, D.J., Ruzek, D., Grubhoffer, L., Luft, B.J., Eshoo, M.W., 2017. Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 1–13. doi:10.1093/femsec/fix129
- Honzakova, E., 1970. Analysis of some ecological factors influencing the development and survival of several tick species. *Czech. Academy of Sciences.*
- Hopla, C.E., 1974. The ecology of tularemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 18, 25–53.
- Hornok, S., Edelhofer, R., Farkas, R., 2006. Seroprevalence of canine babesiosis in Hungary suggesting breed predisposition. *Parasitol. Res.* 99, 638–642. doi:10.1007/s00436-006-0218-8
- Hornok, S., Elek, V., de la Fuente, J., Naranjo, V., Farkas, R., Majoros, G., Földvári, G., 2007. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet. Microbiol.* 122, 316–322. doi:10.1016/j.vetmic.2007.01.024
- Hornok, S., Fuente, J., Horváth, G., Fernández de Mera, I.G., Wijnveld, M., Tánczos, B., Farkas, R., Jongejan, F., 2013. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. *Acta Vet. Hung.* 61, 42–50. doi:10.1556/AVet.2012.050
- Hornok, S., Micsutka, A., Fernández de Mera, I.G., Meli, M.L., Gönczi, E., Tánczos, B., Mangold, A.J., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J., 2012. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 92, 30–35. doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.011
- Hubálek, Z., Sixl, W., Halouzka, J., 1998. *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 110, 909–10.
- Huber, B., Escudero, R., Busse, H.J., Seibold, E., Scholz, H.C., Anda, P., Kämpfer, P., Spletstoesser, W.D., 2010. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and

- emended description of the genus *Franc*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1887–1896. doi:10.1099/ijs.0.015941-0
- Huber, D., Reil, I., Duonjak, S., Jurković, D., Lukačević, D., Pilat, M., Beck, A., Mihaljević, Ž., Vojta, L., Polkinghorne, A., Beck, R., 2017. Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitol. Res.* 116, 3019–3026. doi:10.1007/s00436-017-5611-y
- Hulinska, D., Langrova, K., Pejcoch, M., Pavlasek, I., 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. *Apmis* 112, 239–247. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11204-0503.x
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219–1237. doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.001
- Iannino, F., Salucci, S., Provido, A. Di, Paolini, A., Ruggieri, E., 2018. Bartonella infections in humans dogs and cats 63–72. doi:10.12834/VetIt.398.1883.2
- Iii, S.R.T., Wormser, G.P., 2010. Bartonella spp . Transmission by Ticks Not Established 16, 379–384. doi:10.3201/eid1603.090443
- Imre, M., Farkas, R., Ilie, M., Imre, K., Hotea, I., Morariu, S., Morar, D., Dărăbuș, G., 2013. Seroprevalence of Babesia canis Infection in Clinically Healthy Dogs From Western Romania. *J. Parasitol.* 99, 161–163. doi:10.1645/GE-3129.1
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Brouqui, P., 2001. Analysis of the 16S rRNA Gene Sequence of Anaplasma centrale and Its Phylogenetic Relatedness to Other Ehrlichiae These include : Analysis of the 16S rRNA Gene Sequence of Anaplasma centrale and Its Phylogenetic Relatedness to Other Ehrlichiae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 241–244. doi:10.1128/CDLI.8.2.241
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., Okuda, M., Onishi, T., Nakagome, K., Kosugi, R., Hirakawa, M., 2004. Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet. Parasitol.* 121, 341–346. doi:10.1016/j.vetpar.2004.03.012
- Irwin, P.J., 2009. Canine babesiosis: From molecular taxonomy to control. *Parasites and Vectors.* doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S4
- Ishikura, M., Ando, S., Shinagawa, Y., Matsuura, K., Hasegawa, S., Nakayama, T., Fujita, H., Watanabe, M., 2003. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on gltA, 17-kDa, and rOmpA genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. *Microbiol. Immunol.* 47, 823–32.
- Ivović, V., Kalan, K., Zupan, S., Bužan, E., 2015. Illegal waste sites as a potential micro foci of Mediterranean Leishmaniasis: First records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Slovenia. *Acta Vet. Brno.* 65, 348–357. doi:10.1515/acve-2015-0029
- Iwakami, S., Ichikawa, Y., Inokuma, H., 2014. Molecular Survey of Babesia gibsoni

- Using *Haemaphysalis longicornis* Collected from Dogs and Cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1313–1316. doi:10.1292/jvms.14-0210
- Jahfari, S., Ruyts, S.C., Frazer-mendelewska, E., Jaarsma, R., Verheyen, K., Sprong, H., 2017. Melting pot of tick-borne zoonoses : the European hedgehog contributes to the maintenance of various tick-borne diseases in natural cycles urban and suburban areas 1–9. doi:10.1186/s13071-017-2065-0
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrin, L., 2018. The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00248
- James Harris, D., 2016. Naming no names: Comments on the taxonomy of small piroplasmids in canids. *Parasites and Vectors* 9, 5–6. doi:10.1186/s13071-016-1567-5
- Jefferies, R., Ryan, U.M., Muhlneckel, C.J., Irwin, P.J., 2003. Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. *J Parasitol* 89, 409–412. doi:10.1645/0022-3395(2003)089[0397:SOAUSO]2.0.CO;2
- Jellison, W.L., 1950. Tularemia Geographical Distribution of “Deerfly Fever” and the Biting Fly, *Chrysops discalis* Williston. *Public Heal. Reports* 65, 1321. doi:10.2307/4587498
- Jellison, W.L., Kohls, G.M., 1955. Tularemia in sheep and in sheep industry workers in western United States. *Public Health Monogr.* 28, 1–19.
- Jensen, J., Simon, D., Escobar, H.M., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs in Germany 54, 94–101.
- Jiménez, M., González, E., Martín-Martín, I., Hernández, S., Molina, R., 2014. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.* 202, 296–300. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.027
- Jinnai, M., Kawabuchi-Kurata, T., Tsuji, M., Nakajima, R., Hirata, H., Fujisawa, K., Shiraki, H., Asakawa, M., Nasuno, T., Ishihara, C., 2010. Molecular evidence of the multiple genotype infection of a wild Hokkaido brown bear (*Ursus arctos yesoensis*) by *Babesia* sp. UR1. *Vet. Parasitol.* 173, 128–133. doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.018
- Jongejan, F., Ringenier, M., Putting, M., Berger, L., Burgers, S., Kortekaas, R., Lenssen, J., van Roessel, M., Wijnveld, M., Madder, M., 2015. Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium. *Parasit. Vectors* 8, 232. doi:10.1186/s13071-015-0841-2
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, S3. doi:10.1017/S0031182004005967

- Juwaid, S., Sukara, R., Penezić, A., Mihaljica, D., Veinović, G., Kavallieratos, N.G., Ćirović, D., Tomanović, S., 2019. First evidence of tick-borne protozoan pathogens, *Babesia* sp. and *Hepatozoon canis*, in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Serbia. *Acta Vet. Hung.* 67, 70–80. doi:10.1556/004.2019.008
- Kampschreur, L.M., Wegdam-Blans, M.C.A., Wever, P.C., Renders, N.H.M., Delsing, C.E., Sprong, T., van Kasteren, M.E.E., Bijlmer, H., Notermans, D., Oosterheert, J.J., Stals, F.S., Nabuurs-Franssen, M.H., Bleeker-Rovers, C.P., de Jager-Leclercq, M., Groot, C.A.R., Soethoudt, Y., Blank, S.N., Pronk, M.J.H., Limonard, G.J., Thijssen, S.F., Vlaminckx, B.J., Buijs, J., van Kraaij, B.J.M., Dijkstra, F., Richter, C., Gisolf, E.H., Heijligenberg, R., Schouten, R., Schurink, K., Visser, L.G., 2015. Chronic Q fever diagnosis – consensus guideline versus expert opinion. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1183–1188. doi:10.3201/eid2107.130955
- Kantardjiev, T., Ivanov, I., Velinov, T., Padeshki, P., Popov, B., Nenova, R., Mincheff, M., 2006. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997–2005. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 678–680. doi:10.3201/eid1204.050709
- Karakašević, B., 1947. O prvoj epidemiji papatačijeve groznice na teritoriji NR Srbije. *Vojnosanit. Pregl.* 4, 224–228.
- Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M., 2015. Detection of *Leishmania Infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Greece. *Parasitology* 142, 1574–1578. doi:10.1017/S0031182015001158
- Karbowiak, G., 2014. The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick-its expansion to new areas and possible causes. *Ann. Parasitol.* 60, 37–47.
- Karbowiak, G., Hapunik, J., Miniuk, M., 2008. The case of babesiosis in farmed wolf (*Canis lupus* L). *Wiad. Parazytol.* 54, 243.
- Karbowiak, G., Vichová, B., Majláthová, V., Hapunik, J., Pet'ko, B., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Ann. Agric. Environ. Med.* 16, 299–300.
- Karbowiak, G., Vichová, B., Slivinska, K., Werszko, J., Didyk, J., Pefko, B., Stanko, M., Akimov, I., 2014. The infection of questing *Dermacentor reticulatus* ticks with *Babesia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Chernobyl exclusion zone. *Vet. Parasitol.* 204, 372–375. doi:10.1016/j.vetpar.2014.05.030
- Karpoff, S., Antonoff, N., 1936. The spread of tularemia through water, as a new factor in its epidemiology. *J Bacteriol* 32, 243–258.
- Keim, P., Johannson, A., Wagner, D.M., 2007. Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105, 30–66. doi:10.1196/annals.1409.011
- Keim, P.S., Wagner, D.M., 2009. Humans and evolutionary and ecological forces shaped the phylogeography of recently emerged diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 7,

813–821. doi:10.1038/nrmicro2219

- Kernif, T., Leulmi, H., Socolovschi, C., Berenger, J.M., Lepidi, H., Bitam, I., Rolain, J.M., Raoult, D., Parola, P., 2014. Acquisition and excretion of *Bartonella quintana* by the cat flea, *Ctenocephalides felis felis*. *Mol. Ecol.* 23, 1204–1212. doi:10.1111/mec.12663
- Keysary, A., Eremeeva, M.E., Leitner, M., Din, A.B., Wikswo, M.E., Mumcuoglu, K.Y., Inbar, M., Wallach, A.D., Shanas, U., King, R., Waner, T., 2011. Spotted fever group rickettsiae in ticks collected from wild animals in Israel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 919–923. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0623
- Khan, M.A.H.N.A., Khanm, S.S., Bashu, J., Rima, U.K., Pervin, M., Hossain, M.Z., Habib, M.A., Chowdhury, G.A., Hossain, M.M., 2012. Visceral Leishmaniasis Is Endemic in Golden Jackals of Bangladesh Agricultural University Campus , a Threat for Expanding Future Zoonotic Visceral Leishmaniasis 10, 101–109.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289. doi:10.1016/S0738-081X(99)00046-2
- Kingry, L.C., Petersen, J.M., 2014. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida* 4, 1–12. doi:10.3389/fcimb.2014.00035
- Kjelland, V., Stuen, S., Skarpaas, T., Slettan, A., 2010. Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 42, 579–585. doi:10.3109/00365541003716526
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2006. A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Vet. Parasitol.* 138, 112–117. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.045
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.* 30, 1323–1337. doi:10.1016/S0020-7519(00)00137-5
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 138, 103–111. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.044
- Kocan, K.M., De La Fuente, J., Blouin, E.F., Garcia-Garcia, J.C., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): Recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 129. doi:10.1017/S0031182003004700
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Guglielmone, A.A., Mele, R.D., 2003. Antigens and Alternatives for Control of of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 698–712. doi:10.1128/CMR.16.4.698–712.2003
- Koepfli, K.P., Pollinger, J., Godinho, R., Robinson, J., Lea, A., Hendricks, S., Schweizer, R.M., Thalmann, O., Silva, P., Fan, Z., Yurchenko, A.A., Dobrynin, P., Makunin, A., Cahill, J.A., Shapiro, B., Álvares, F., Brito, J.C., Geffen, E., Leonard, J.A.,



- Helgen, K.M., Johnson, W.E., O'Brien, S.J., Van Valkenburgh, B., Wayne, R.K., 2015. Genome-wide evidence reveals that African and Eurasian golden jackals are distinct species. *Curr. Biol.* 25, 2158–2165. doi:10.1016/j.cub.2015.06.060
- Kovačević Filipović, M.M., Beletić, A.D., Ilić Božović, A. V., Milanović, Z., Tyrrell, P., Buch, J., Breitschwerdt, E.B., Birkenheuer, A.J., Chandrashekar, R., 2018. Molecular and Serological Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeenses*, *E. ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* and *B. vogeli* among Clinically Healthy Outdoor Dogs in Serbia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 14, 117–122. doi:10.1016/j.vprsr.2018.10.001
- Kreizinger, Z., Hornok, S., Dán, Á., Hresko, S., Makrai, L., Magyar, T., Bhide, M., Erdélyi, K., Hofmann-Lehmann, R., Gyuranecz, M., 2013. Prevalence of *Francisella tularensis* and *Francisella* -Like Endosymbionts in the Tick Population of Hungary and the Genetic Variability of *Francisella* -Like Agents. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 160–163. doi:10.1089/vbz.2012.1065
- Krinsky, W.L., 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J. Med. Entomol.* 13, 225–75.
- Krofel, M., Giannatos, G., Cirovic, D., Stoyanov, S., Newsome, T.M., 2017. Golden jackal expansion in Europe: A case of mesopredator release triggered by continent-wide wolf persecution? *Hystrix* 28, 1–7. doi:10.4404/hystrix-28.1-11819
- Krystufek, B., Murariu, D., Kurtonur, C., 1997. Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions. *Mamm. Rev.* 27, 109–114. doi:10.1111/j.1365-2907.1997.tb00375.x
- Kubelová, M., Tkadlec, E., Bednář, M., Roubalová, E., Šíroký, P., 2011. West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. *Vet. Parasitol.* 180, 191–196. doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.033
- Kuehn, A., Schulze, C., Kutzer, P., Probst, C., Hlinak, A., Ochs, A., Grunow, R., 2013. Tularaemia seroprevalence of captured and wild animals in Germany: The fox (*Vulpes vulpes*) as a biological indicator. *Epidemiol. Infect.* 141, 833–840. doi:10.1017/S0950268812001008
- Kugeler, K.J., Farley, G.M., Forrester, J.D., Mead, P.S., 2015. Geographic Distribution and Expansion of Human Lyme Disease, United States 21, 1455–1457.
- Kuttler, K.L., 1984. ANAPLASMA INFECTIONS IN WILD AND DOMESTIC RUMINANTS: A REVIEW. *J. Wildl. Dis.* 20, 12–20. doi:10.7589/0090-3558-20.1.12
- Lack, J.B., Reichard, M. V., Van Den Bussche, R.A., 2012. Phylogeny and evolution of the *Piroplasmida* as inferred from 18S rRNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 42, 353–363. doi:10.1016/j.ijpara.2012.02.005
- Lalošević, D., Lalošević, V., Simin, V., Miljević, M., Čabrilo, B., Čabrilo, O.B., 2016.

- Spreading of multilocular echinococcosis in southern Europe: the first record in foxes and jackals in Serbia, Vojvodina Province. Eur. J. Wildl. Res.* 62, 793–796. doi:10.1007/s10344-016-1050-9
- Lanszki, J., Heltai, M., 2002. Feeding habits of golden jackal and red fox in southwestern Hungary during winter and spring. *Mamm. Biol.* 67, 129–136. doi:10.1078/1616-5047-00020
- Lanszki, J., Heltai, M., Szabó, L., 2006. Feeding habits and trophic niche overlap between sympatric golden jackal ( *Canis aureus* ) and red fox ( *Vulpes vulpes* ) in the Pannonian ecoregion (Hungary). *Can. J. Zool.* 84, 1647–1656. doi:10.1139/z06-147
- Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., Leidinger, E., 2008. Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 243–248. doi:10.1016/j.ijmm.2008.03.008
- Leschnik, M., Kirtz, G., Virányi, Z., Wille-Piazzai, W., Duscher, G., 2012. ACUTE GRANULOCYTIC ANAPLASMOSIS IN A CAPTIVE TIMBER WOLF ( *CANIS LUPUS OCCIDENTALIS* ). *J. Zoo Wildl. Med.* 43, 645–648. doi:10.1638/2011-0224R.1
- Leschnik, M.W., Kirtz, G., Khanakah, G., Duscher, G., Leidinger, E., Thalhammer, J.G., Joachim, A., Stanek, G., 2010. Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and in dogs after immunization with a *Borrelia* vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 828–835. doi:10.1128/CVI.00427-09
- Leulmi, H., Aouadi, A., Bitam, I., Bessas, A., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Detection of *Bartonella tamiae*, *Coxiella burnetii* and *rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasit. Vectors* 9, 27. doi:10.1186/s13071-016-1316-9
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Entomol.* 2, 319–332. doi:10.1111/j.1365-3113.1977.tb00381.x
- Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., DeJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M.J., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Lander, E.S., 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803–819. doi:10.1038/nature04338
- Littman, M.P., Gerber, B., Goldstein, R.E., Anna, M., Michael, L., George, R.L., 2018.

- ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats 887–903.  
doi:10.1111/jvim.15085
- Littman, M.P., Goldstein, R.E., Labato, M.A., Lappin, M.R., Moore, G.E., 2006. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* 20, 422–434. doi:10.1892/0891-6640(2006)20[422:ASACSO]2.0.CO;2
- Lundström, J.O., Andersson, A.C., Bäckman, S., Schäfer, M.L., Forsman, M., Thelaus, J., 2011. Transstadial transmission of *Francisella tularensis holarctica* in mosquitoes, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 794–799. doi:10.3201/eid1705.100426
- M, Y., Bouattour, A., 2008. Detection and molecular characterization of *Babesia canis vogeli* from naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Tunisia 152, 1–7. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.018
- Macdonald, D.W., 1979. The flexible social system of the golden jackal, *Canis aureus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 5, 17–38. doi:10.1007/BF00302692
- Maia, C., Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 27, 341–344. doi:10.1016/j.pt.2011.03.008
- Mancianti, F., Mignone, W., Galastri, F., 1994. Serologic Survey for Leishmaniasis in Free-Living Red Foxes (*Vulpes-vulpes*) in Italy. *J Wildl Dis* 30, 454–456. doi:10.7589/0090-3558-30.3.454
- Mangold, A.J., Tánčzos, B., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Gönczi, E., Meli, M.L., Fernández de Mera, I.G., Micsutka, A., Hornok, S., Farkas, R., 2010. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. *Res. Vet. Sci.* 92, 30–35. doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.011
- Mannelli, A., Bertolotti, L., Gern, L., Gray, J., 2012. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: Transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 837–861. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x
- Margalit Levi, M., Nachum-Biala, Y., King, R., Baneth, G., 2018. A survey of *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in wild canids in Israel. *Parasit. Vectors* 11, 150. doi:10.1186/s13071-018-2715-x
- Maria, L., Passos, F., Geiger, S.M., Pfister, K., Zahler-rinder, M., 2005. First molecular detection of *Babesia vogeli* in dogs from Brazil 127, 81–85. doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.028
- Marjanović, G., Tasić, N.M., Gabrielli, S., Otašević, S., Dragonjić, L.P., Kocić, B., Arsenijević, V.A., Tadić, L., Cancrini, G., 2012. First case of visceral Leishmaniasis/HIV Coinfection in niš - southeastern Serbia. *Arch. Biol. Sci.* 64,

1271–1276. doi:10.2298/ABS1204271M

- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern*. *Med. Vet. Entomol.* 27, 123–147. doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., 2008. *The northward spread of leishmaniasis in Italy : evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors* 13, 256–264. doi:10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x
- Masuzawa, T., Komikado, T., Iwaki, A., Suzuki, H., Kaneda, K., Yanagihara, Y., 1996. *Characterization of Borrelia sp. isolated from Ixodes tanuki, I. turdus, and I. columnae in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons*. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 77–83. doi:10.1016/0378-1097(96)00246-7
- Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T.P., 2012. *Canine babesiosis in Europe: How many diseases?* *Trends Parasitol.* 28, 99–105. doi:10.1016/j.pt.2011.11.003
- Matijala, P.T., Penzhorn, B.L., Bekker, C.P.J., Nijhof, A.M., Jongejan, F., 2004. *Confirmation of occurrence of Babesia canis vogeli in domestic dogs in South Africa* 122, 119–125. doi:10.1016/j.vetpar.2004.03.019
- Matthieu, M., Raoult, D., 2017. *No Such Thing as Chronic Q Fever*. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 856–857. doi:https://dx.doi.org/10.3201/eid2305.151159
- Mazeris, A., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Haralambous, C., Tsatsaris, A., Moschandreas, J., Messaritakis, I., Christodoulou, V., Papadopoulos, B., Ivović, V., Pratlong, F., Loucaides, F., Antoniou, M., 2010. *Leishmaniasis and the Cyprus Paradox*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 441–448. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0282
- McCoy, G.W., Chapin, C.C., 1912. *Studies of plague, a plague-like disease and tuberculosis among rodents in California*. *J. Infect. Dis.* VI, 170–180.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1984. *The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages*. *Adv. Parasitol.* 23, 37–103. doi:https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60285-7
- Mehlhorn, H., Schein, E., Ahmed, J.S., 1994. *Theileria*, in: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*. Academic Press, San Diego, pp. 217–304.
- Melaun, C., Krüger, A., Werblow, A., Klimpel, S., 2014. *New record of the suspected leishmaniasis vector Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) - The northernmost phlebotomine sandfly occurrence in the Palearctic region*. *Parasitol. Res.* 113, 2295–2301. doi:10.1007/s00436-014-3884-y
- Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., Marty, P., 2011. *Importance of worldwide asymptomatic carriers of Leishmania infantum (L. chagasi) in human*. *Acta Trop.*

119, 69–75. doi:10.1016/j.actatropica.2011.05.012

- Mierzejewska, E.J., Pawełczyk, A., Radkowski, M., Welc-Falęciak, R., Bajer, A., 2015. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasit. Vectors* 8, 490. doi:10.1186/s13071-015-1099-4
- Mihaljica, D., Radulović, Ž., Tomanović, S., Čakić, S., Penezić, A., Milutinović, M., 2012. Molecular detection of *Babesia* spp. in ticks in northern Serbia. *Arch. Biol. Sci.* 64, 1591–1598. doi:10.2298/ABS1204591M
- Milenković, M., 1983. Distribution of the jackal *Canis aureus* Linnaeus Milenković, M., 1983. Distribution of the jackal *Canis aureus* Linnaeus 1758 (Mammalia, Canidae) in Yugoslavia., in: *In Proceedings on the Fauna of Serbia. Belgrade.*s 1758 (Mammalia, Canidae) in Yugoslavia., in: *In Proceedings on the Fauna of Serbia. Belgrade.*
- Milenković, M., Paunović, M., 2003. Phenomenon of golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758), expansion in Serbia, in: *In Carpathian Workshop on Large Carnivores Conservation. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Brasov.*
- Millán, J., Ferroglio, E., Solano-gallego, L., 2014. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe 2005–2014. doi:10.1007/s00436-014-3929-2
- Millán, J., López-Bao, J.V., Garcíá, E.J., Oleaga, Á., Llaneza, L., Palacios, V., De La Torre, A., Rodríguez, A., Dubovi, E.J., Esperón, F., 2016. Patterns of exposure of iberian wolves (*Canis lupus*) to canine viruses in human-dominated landscapes. *Ecohealth* 13, 123–134. doi:10.1007/s10393-015-1074-8
- Milovanović, M., Popović, D., 1960. Contribution to the study of kala-azar epidemic in NR Serbia. *Voice Hyg Inst* 9, 23–27.
- Milutinović, M., Masuzawa, T., Tomanović, S., Radulović, Ž., Fukui, T., Okamoto, Y., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* 45, 171–183. doi:10.1007/s10493-008-9166-6
- Milutinovic, M., Petrovic, Z., Bobic, B., Pavlovic, I., 1996. Ecological notes on ticks (Acari: Ixodidae) collected in West Serbia, Yugoslavia. *Parasitol. Hungarica* 29–30, 67–74.
- Milutinović, M., Radulović, Ž., 2002. Ecological notes on ticks (Acari: Ixodidae) in Serbia (central regions). *Acta Vet.* 52, 49–58.
- Milutinović, M., Radulović, Ž., Tomanović, S., Petrović, Z., 2012. Krpelji (Acari: Ixodidae, Argasidae) Srbije. *Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.*
- Mircean, V., Dumitrache, M.O., Mircean, M., Bolfa, P., Györke, A., Mihalca, A.D.,

2014. *Autochthonous canine leishmaniasis in Romania : neglected or ( re ) emerging ?* 1–3. doi:10.1186/1756-3305-7-135
- Miró, G., Checa, R., Papparini, A., Ortega, N., González-Fraga, J.L., Gofton, A., Bartolomé, A., Montoya, A., Gálvez, R., Mayo, P.P. abl., Irwin, P., 2015. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. *Parasit. Vectors* 8, 217. doi:10.1186/s13071-015-0825-2
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A., 2014. *Current status of L . infantum infection in stray cats in the Madrid region ( Spain ) : implications for the recent outbreak of human leishmaniasis ?* 1–7. doi:10.1186/1756-3305-7-112
- Miščević, Z., Milutinović, M., Ivović, V., 1998. *Fauna and distribution of sandflies (Diptera, Phlebotomidae) in Yugoslavia, Croatia, Macedonia and their role in the transmission of parasitic and viral diseases.* *Acta Vet. Brno.* 48, 163–172.
- Mitková, B., Hrazdilová, K., D'Amico, G., Duscher, G.G., Suchentrunk, F., Forejtek, P., Gherman, C.M., Matei, I.A., Ionică, A.M., Daskalaki, A.A., Mihalca, A.D., Votýpka, J., Hulva, P., Modrý, D., 2017. *Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists.* *Parasit. Vectors* 10, 183. doi:10.1186/s13071-017-2110-z
- Moehlman, P.D., 1987. *Social Organization in Jackals: The complex social system of jackals allows the successful rearing of very dependent young.* *Am. Sci.* 75, 366–375. doi:10.2307/27854716
- Moehlman, P.D., Hayssen, V., 2018. *Canis aureus (Carnivore: Canidae).* *Mamm. Species* 50, 14–25. doi:10.1093/mspecies/sey002
- Mohebbali, M., Arzamani, K., Zarei, Z., Akhoundi, B., Hajjaran, H., Raeghi, S., Heidari, Z., Motavalli-Haghi, S.M., Elikae, S., Mousazadeh-Mojarrad, A., Kakoei, Z., 2016. *Canine visceral leishmaniasis in Wild Canines (Fox, Jackal, and Wolf) in Northeastern Iran using parasitological, serological, and molecular methods.* *J. Arthropod. Borne. Dis.* 10, 538–545.
- Mohebbali, M., Hajjaran, H., Hamzaavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., Akhoundi, B., Naeini, K.M., Avizeh, R., Fakhari, M., 2005. *Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran.* *Vet. Parasitol.* 129, 243–251. doi:10.1016/j.vetpar.2005.01.010
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. *The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain.* *Vet. Parasitol.* 190, 268–271. doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.006
- Moniuszko-Malinowska, A., Swiecicka, I., Dunaj, J., Zajkowska, J., Czupryna, P., Zambrowski, G., Chmielewska-Badora, J., Żukiewicz-Sobczak, W., Swierzbinska, R., Rutkowski, K., Garkowski, A., Pancewicz, S., 2016. *Infection with Babesia*

- microti* in humans with non-specific symptoms in North East Poland. *Infect. Dis. (London, England)* 48, 537–43. doi:10.3109/23744235.2016.1164339
- Mrljak, V., Kuleš, J., Mihaljević, Ž., Torti, M., Gotić, J., Crnogaj, M., Živočnjak, T., Mayer, I., Šmit, I., Bhide, M., Barić Rafaj, R., 2017. Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17, 398–408. doi:10.1089/vbz.2016.1990
- Nadim, A., Navid-Hamidid, A., Javadian, E., Bidruni, G.T., Amini, H., 1978a. Present Status of Kala-Azar in Iran \*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 25–28. doi:10.4269/ajtmh.1978.27.25
- Najm, N.A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Herb, I., Fensterer, V., Pfister, K., Silaghi, C., 2014a. A molecular survey of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks from Thuringia, Germany. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 5, 386–391. doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.005
- Naucke, T.J., Pesson, B., 2000. Presence of *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii* Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitol. Res.* 86, 335–336. doi:10.1007/s004360050053
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Venzal, J.M., Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Parasitol.* 208, 2–8. doi:10.1016/j.vetpar.2014.12.021
- Nedić, L., Jokić, S., Parlić, M., Grgić, B., 2003. Epidemiološke karakteristike Q groznice u Srbiji. *Prax. Medica* 31, 53–55.
- Negev, M., Paz, S., Clermont, A., Pri-Or, N.G., Shalom, U., Yeger, T., Green, M.S., 2015. Impacts of climate change on vector borne diseases in the mediterranean basin – implications for preparedness and adaptation policy. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 6745–6770. doi:10.3390/ijerph120606745
- Niazi, A.D., 1980. Studies in epidemiology and seroepidemiology of visceral leishmaniasis in Iraq. doi:10.17037/PUBS.00682256
- Obrenović, S., Ristanović, E., Čekanac, R., Radulović, Ž., Ilić, V., 2015. Seroprevalence of IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* in dogs in Belgrade area, Serbia. *Acta Vet. Brno.* 65, 99–110. doi:10.1515/acve-2015-0008
- Obwaller, A.G., Karakus, M., Poepl, W., Töz, S., Özbek, Y., Aspöck, H., Walochnik, J., 2016. Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum* ? New data. *Parasit. Vectors* 1–6. doi:10.1186/s13071-016-1750-8
- Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Naitou, H., Hiroi, M., Masuzawa, T., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infected Ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1780–1783. doi:10.3201/eid1111.050407

- OIE 2018, *Bovine anaplasmosis, Croatia* [WWW Document], 2018. URL [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=27425](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=27425) (accessed 1.24.19).
- Oleaga, A., Vicente, J., Ferroglio, E., Pegoraro de Macedo, M.R., Casais, R., del Cerro, A., Espí, A., García, E.J., Gortázar, C., 2015. Concomitance and interactions of pathogens in the Iberian wolf (*Canis lupus*). *Res. Vet. Sci.* 101, 22–27. doi:10.1016/j.rvsc.2015.05.010
- Oleaga, A., Zanet, S., Espí, A., Raquel, M., Macedo, P. De, Gortázar, C., Ferroglio, E., 2018. Veterinary Parasitology *Leishmania* in woloes in northern Spain : A spreading zoonosis evidenced by wildlife sanitary surveillance. *Vet. Parasitol.* 255, 26–31. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.015
- Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V.F., Gramiccia, M., Pagano, A., Muccio, T. Di, Gradoni, L., 2006. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological , Serologic , and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naï ve Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons 44, 1318–1322. doi:10.1128/JCM.44.4.1318
- Olmeda, A.S., Armstrong, P.M., Rosenthal, B.M., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J.A., Spielman, A., Telford, S.R., 1997. Short report: A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop.* 67, 229–234. doi:10.1016/S0001-706X(97)00045-4
- Olsufiev, N., 1977. Results and perspectives of the study of natural foci of tularemia in USSR. *Med. Parazitol. (Mosk).* 46, 273–282.
- Olsufiev, N., Dunayeva, T., 1970. Natural focalilty, epidemiology and prophylaxis of tularemia, Moscow, *Medicina. Medicina, Moscow.*
- Oosthuizen, M.C., Allsopp, B.A., Troskie, M., Collins, N.E., Penzhorn, B.L., 2009. Identification of novel *Babesia* and *Theileria* species in South African giraffe (*Giraffa camelopardalis*, Linnaeus, 1758) and roan antelope (*Hippotragus equinus*, Desmarest 1804). *Vet. Parasitol.* 163, 39–46. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.045
- Oosthuizen, M.C., Zweygarth, E., Collins, N.E., Troskie, M., Penzhorn, B.L., 2008. Identification of a novel *Babesia* sp. from a sable antelope (*Hippotragus niger* Harris, 1838). *J. Clin. Microbiol.* 46, 2247–2251. doi:10.1128/JCM.00167-08
- Ortuño, A., Sanfeliu, I., Nogueras, M.M., Pons, I., López-Claessens, S., Castellà, J., Antón, E., Segura, F., 2018. Detection of *Rickettsia massiliae*/Bar29 and *Rickettsia conorii* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and their *Rhipicephalus sanguineus* complex ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 629–631. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.02.002
- Oryan, A., Akbari, M., 2016. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9, 925–932. doi:10.1016/j.apjtm.2016.06.021
- Otranto, D., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Pfeiffer, M., Genchi, C.,



- Guberti, V., Capelli, G., Deplazes, P., 2015a. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Vet. Parasitol.* 213, 24–37. doi:10.1016/j.vetpar.2015.04.020
- Otranto, D., Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Pfeiffer, M., Genchi, C., Guberti, V., Capelli, G., Deplazes, P., 2015b. The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. Part II: Helminths and arthropods. *Vet. Parasitol.* 213, 24–37. doi:10.1016/j.vetpar.2015.04.020
- Otranto, D., Cantacessi, C., Pfeiffer, M., Dantas-torres, F., 2015c. cats in Europe Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Vet. Parasitol.* 213, 12–23. doi:10.1016/j.vetpar.2015.04.022
- Otranto, D., Dantas-torres, F., 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 29, 339–345. doi:10.1016/j.pt.2013.05.003
- Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., Hammad, A., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H., 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies. *Clin. Vaccine Immunol.* 12, 1343–1346. doi:10.1128/CDLI.12.11.1343-1346.2005
- Pace, D., 2014. Leishmaniasis 10–18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13
- Parola, P., Roux, V., Camicas, J.L., Baradji, I., Brouqui, P., Raoult, D., 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94, 707–8. doi:10.1016/S0035-9203(00)90243-8
- Pavlović, N., 2006. Lajmska bolest-rizik, obolevanje i sprečavanje. Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd.
- Penezic, A., Ćirović, D., 2015a. Diet of adult and juvenile golden jackals (*Canis aureus*) during cubs dependency stage. *Balk. J. Wildl. Res.* 2, 27–32. doi:10.15679/bjwr.v2i1.22
- Penezic, A., Ćirović, D., 2015b. Seasonal variation in diet of the golden jackal (*Canis aureus*) in Serbia. *Mammal Res.* 60, 309–317. doi:10.1007/s13364-015-0241-1
- Pennisi, M.G., Hartmann, K., Lloret, A., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Horzinek, M.C., 2013. Leishmaniosis in cats. *J. Feline Med. Surg.* 15, 638–642. doi:10.1177/1098612X13489229

- Penzhorn, B.L., 2011. *Why is Southern African canine babesiosis so virulent? An evolutionary perspective. Parasit. Vectors* 4, 51. doi:10.1186/1756-3305-4-51
- Penzhorn, B.L., 2006. *Babesiosis of wild carnivores and ungulates. Vet. Parasitol.* 138, 11–21. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.036
- Pérez-Castrillón, J.L., Bachiller-Luque, P., Martín-Luquero, M., Mena-Martín, F.J., Herreros, V., 2001. *Tularemia Epidemic in Northwestern Spain: Clinical Description and Therapeutic Response. Clin. Infect. Dis.* 33, 573–576. doi:10.1086/322601
- Petra, B., Josipa, K., Renata, B.R., Vladimir, M., 2018. *Canine Babesiosis: Where Do We Stand? Acta Vet. Brno.* 68, 127–160. doi:10.2478/acve-2018-0011
- Petrovec, M., Furlan, S.L., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J.S., 1997. *Human Disease in Europe Caused by a Granulocytic Ehrlichia Species* 35, 1556–1559.
- Petrović, Z., 1980. *Epidemiologija kala-azara u Srbiji.*
- Philip, C., 1948. *Comments on the name of the Q fever organism. Public Health Rep.* 58–59.
- Piana, G.P., Galli-Valerio, B., 1895. *Su di un'infezione del cane con parassiti endoglobulari nel sangue – nota preventiva. Mod. Zooiatro* 163–169.
- Piantedosi, D., Veneziano, V., Di Muccio, T., Manzillo, V.F., Fiorentino, E., Scalone, A., Neola, B., Di Prisco, F., D'Alessio, N., Gradoni, L., Oliva, G., Gramiccia, M., 2016. *Epidemiological survey on Leishmania infection in red foxes (Vulpes vulpes) and hunting dogs sharing the same rural area in Southern Italy. Acta Parasitol.* 61, 769–775. doi:10.1515/ap-2016-0106
- Pienaar, R., Neitz, A., Mans, B., 2018. *Tick Paralysis: Solving an Enigma. Vet. Sci.* 5, 53. doi:10.3390/vetsci5020053
- Poeppl, W., Obwaller, A.G., Weiler, M., Burgmann, H., Mooseder, G., Lorentz, S., Rauchenwald, F., Aspöck, H., Walochnik, J., Naucke, T.J., 2013. *Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. Parasitol. Res.* 112, 4231–4237. doi:10.1007/s00436-013-3615-9
- Pomerancev, B., 1950. *Fauna SSSR. Paukobraznie. Iksodovie klešči (Ixodidae). Akademem Nauk SSSR, Moskva-Leningrad.*
- Porter, S.R., Czaplicki, G., Mainil, J., Saegerman, C., 2011. *Q Fever : Current State of Knowledge and Perspectives of Research of a Neglected Zoonosis 2011.* doi:10.1155/2011/248418
- Portillo, A., Pérez-Martínez, L., Santibáñez, S., Santibáñez, P., Palomar, A.M., Oteo, J.A., 2011. *Anaplasma spp. in Wild Mammals and Ixodes ricinus from the North of Spain. Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 3–8. doi:10.1089/vbz.2009.0214

- Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Palomar, A.M., Oteo, J.A., 2015. Rickettsioses in Europe. *Microbes Infect.* 17, 834–838. doi:10.1016/j.micinf.2015.09.009
- Postić, D., Assous, M. V, Grimont, P. a, Baranton, G., 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 743–752. doi:10.1099/00207713-44-4-743
- Potkonjak, A., Gutiérrez, R., Savić, S., Vračar, V., Nachum-Biala, Y., Jurišić, A., Kleinerman, G., Rojas, A., Petrović, A., Baneth, G., Harrus, S., 2016. Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 7, 199–203. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.10.007
- Potkonjak, A., Vračar, V., Novakov, N., Stevančević, O., Stojanac, N., 2015a. Seroepidemiological research of babesiosis in dogs in the area of Novi Sad, autonomous province of Vojvodina, Republic of Serbia. *J. Vet. Med. Biotechnol. Biosaf.* 1, 22–24.
- Potkonjak, A., Vračar, V., Savić, S., Lako, B., Radosavljević, V., Cincović, M., Suvajdžić, L., Jurišić, A., Petrović, A., 2015b. The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. *Vet. Arh.* 85, 385–394.
- Preadynhmacuk, P.D.R., 2010. *Leishmaniasis emergence in Europe* 1–11.
- Pritt, B.S., Respicio-Kingry, L.B., Sloan, L.M., Schriefer, M.E., Replogle, A.J., Bjork, J., Liu, G., Kingry, L.C., Mead, P.S., Neitzel, D.F., Schiffman, E., Hoang Johnson, D.K., Davis, J.P., Paskewitz, S.M., Boxrud, D., Deedon, A., Lee, X., Miller, T.K., Feist, M.A., Steward, C.R., Theel, E.S., Patel, R., Irish, C.L., Petersen, J.M., 2016. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4878–4880. doi:10.1099/ijsem.0.001445
- Psaroulaki, A., Chochlakis, D., Sandalakis, V., Vranakis, I., Ioannou, I., Tselentis, Y., 2009. Phylogenetic analysis of *Anaplasma ovis* strains isolated from sheep and goats using *groEL* and *mps4* genes. *Vet. Microbiol.* 138, 394–400. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.018
- Quinnell, R.J., Courtena, Y.O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136, 1915. doi:10.1017/S0031182009991156
- Radulović, Z., Chochlakis, D., Tomanović, S., Milutinović, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., 2011. First detection of spotted fever group Rickettsiae in ticks in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 111–115. doi:10.1089/vbz.2009.0254
- Raoult, D., Lakos, A., Fenollar, F., Beytout, J., Brouqui, P., Fournier, P., 2002. Spotless Rickettsiosis Caused by *Rickettsia slovaca* and Associated with *Dermacentor* Ticks

1331–1336.

- Raoult, D., Roblot, F., Rolain, J.M., Besnier, J.M., Loulergue, J., Bastides, F., Choutet, P., 2006. First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 278–279. doi:10.1128/JCM.44.1.278-279.2006
- Rar, V.A., Fomenko, N. V, Dobrotvorsky, A.K., Livanova, N.H., Rudakova, S.A., Fedorov, E.G., Astanin, V.B., Morozova, O. V, 2005. Tickborne pathogen detection, Western Siberia, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1708–1715. doi:10.3201/eid1111.041195
- Regnery, R.L., Spruil, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraespecific sequences divergence for portion of two Rickettsial gene. *J. Bacteriol.* 173, 1576–1589. doi:0021-9193/91/051576-14\$02.00/0
- Reintjes, R., Dedushaj, I., Gjini, A., Jorgensen, T.R., Cotter, B., Lieftucht, A., Ancona, F.D., Dennis, D.T., Kosoy, M.A., Grunow, R., Kalaveshi, A., Gashi, L., Humolli, I., 2002. Tularemia Outbreak Investigation in Kosovo : Case Control and Environmental Studies 8, 69–73.
- Relich, R.F., Humphries, R.M., Mattison, H.R., Miles, J.E., Simpson, E.R., Corbett, I.J., Schmitt, B.H., May, M., 2015. *Francisella philomiragia* Bacteremia in a Patient with Acute Respiratory Insufficiency and Acute-on-Chronic Kidney Disease 53, 3947–3950. doi:10.1128/JCM.01762-15.Editor
- René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A., Badavelli, S., Chalvet-Monfray, K., Ducrot, C., Abrial, D., Chabanne, L., Halos, L., 2015a. Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasites and Vectors* 8, 1–10. doi:10.1186/s13071-014-0613-4
- René-Martellet, M., Moro, C.V., Chêne, J., Bourdoiseau, G., Chabanne, L., Mavingui, P., 2015b. Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France. *BMC Vet. Res.* 11, 1–11. doi:10.1186/s12917-015-0525-3
- Reye, A.L., Stegny, V., Mishaeva, N.P., Velhin, S., Hübschen, J.M., Ignatyev, G., Muller, C.P., 2013. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* Ticks from Different Geographical Locations in Belarus. *PLoS One* 8, 14–16. doi:10.1371/journal.pone.0054476
- Richter, D., Matuschka, F.R., 2012. “Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*,” *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme Disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J. Clin. Microbiol.* 50, 943–947. doi:10.1128/JCM.05802-11
- Rioux, J.A., Albaret, J.-L., Houin, R., Dedet, J.-P., Lanotte, G., 1968. Ecologie des leishmanioses dans de sud de la France 2.- Les réservoirs selvatiques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 43, 421–428.

- Rioux, J.A., Lanotte, G., Destojbes, P., 1971. *Leishmaniose experimentale du renard Vulpes vulpes (L.)*. Rec Med Vet.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. *Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification*. Ann. Parasitol. Hum. Comparée 65, 111–125. doi:10.1051/parasite/1990653111
- Rollend, L., Fish, D., Childs, J.E., 2013. *Ticks and Tick-borne Diseases Transovarial transmission of Borrelia spirochetes by Ixodes scapularis : A summary of the literature and recent observations*. Ticks Tick. Borne. Dis. 4, 46–51. doi:10.1016/j.ttbdis.2012.06.008
- Rotem, G., Berger, H., King, R., Bar, P., Saltz, D., 2011. *The effect of anthropogenic resources on the space-use patterns of golden jackals* Rotem, G., Berger, H., King, R., Bar, P., Saltz, D., 2011. *The effect of anthropogenic resources on the space-use patterns of golden jackals*. J. Wildl. Manage. 75, 132–136. d. J. Wildl. Manage. 75, 132–136. doi:10.1002/jwmg.9
- Roux, V., Rydkina, E., Eremeeva, M., Raoult, D., 1997. *Citrate Synthase Gene Comparison , a New Tool for Phylogenetic Analysis , and Its Application for the Rickettsiae ?* 252–261.
- Ruiz-fons, F., Fernández-de-mera, I.G., Acevedo, P., Gortázar, C., De, J., 2012. *Factors Driving the Abundance of Ixodes ricinus Ticks and the Prevalence of Zoonotic I. ricinus -Borne Pathogens in Natural Foci* 2669–2676. doi:10.1128/AEM.06564-11
- Rutkowski, R., Krofel, M., Giannatos, G., Ćirović, D., Mannil, P., Volokh, A.M., Lanszki, J., Heltai, M., Szabó, L., Banea, O.C., Yavruyan, E., Hayrapetyan, V., Kopaliani, N., Miliou, A., Tryfonopoulos, G.A., Lymberakis, P., Penezić, A., Pakeltyte, G., Suchecka, E., Bogdanowicz, W., 2015. *A European concern? genetic structure and expansion of golden jackals (canis aureus) in Europe and the caucasus*. PLoS One 10, 1–22. doi:10.1371/journal.pone.0141236
- Sala, V., Faveri, E. De, 2016. *Epidemiology of Lyme Disease in Domestic and Wild Animals* 15–26. doi:10.2174/1874372201610010015
- Šálek, M., Červinka, J., Banea, O.C., Krofel, M., Ćirović, D., Selanec, I., Penezić, A., Grill, S., Riegert, J., 2014. *Population densities and habitat use of the golden jackal (Canis aureus) in farmlands across the Balkan Peninsula*. Eur. J. Wildl. Res. 60, 193–200. doi:10.1007/s10344-013-0765-0
- Samardžić, S., Marinkovic, T., Marinkovic, D., Djuricic, B., Ristanovic, E., Simovic, T., Lako, B., Vukov, B., Bozovic, B., Gligic, A., 2008. *Prevalence of Antibodies to Rickettsiae in Different Regions of Serbia*. Vector-Borne Zoonotic Dis. 8, 219–224. doi:10.1089/vbz.2007.0122
- Sanchez Clemente, N., Ugarte-Gil, C.A., Solórzano, N., Maguiña, C., Pachas, P., Blazes, D., Bailey, R., Mabey, D., Moore, D., 2012. *Bartonella bacilliformis: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination*.

- Santarém, N., Cunha, J., Silvestre, R., Silva, C., Moreira, D., Ouellette, M., Cordeiro-Da-Silva, A., 2014. The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology* 141, 192–205. doi:10.1017/S0031182013001388
- Savić-Jevđenić, S., Grgić, Z., Vidić, B., Vujkov, B., 2007. Leishmaniasis in dog – clinical case, in: IX Regional Meeting in Clinical Pathology and Therapy in Animals Palić. Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Palić, p. 2.
- Savić, S., Vidić, B., Fenjac, I., Bekvalac, R., Radičević, M., Lolić, Z., 2010. Leishmaniasis in dogs in Serbia – existence or not?, in: Symposium of Small Animal Practitioners SIVE - MAP. Belgrade, pp. 241–243.
- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, J.S., Garcia-Perez, A.L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M.L., Ensser, A., Stuen, S., Von Loewenich, F.D., 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49, 790–796. doi:10.1128/JCM.02051-10
- Schauman, K., Kovanen, J., Seppälä, I., 1989. Lyme borreliosis in Finland in 1986–1988. *Biomed. Pharmacother.* 43, 427–430. doi:10.1016/0753-3322(89)90241-2
- Schein, E., Mehlhorn, H., Voigt, W.P., 1979. Electron microscopical studies on the development of *Babesia canis* (Sporozoa) in the salivary glands of the vector tick *Dermacentor reticulatus*. *Acta Trop.* 36, 229 – 241.
- Schmidt, K., Dressel, K.M., Niedrig, M., Mertens, M., Schüle, S.A., Groschup, M.H., 2013. Public Health and Vector-Borne Diseases - A New Concept for Risk Governance. *Zoonoses Public Health.* doi:10.1111/zph.12045
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. *Babesia*: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1788–1809. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.004
- Schönian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E., 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol.* 26, 466–469. doi:10.1016/j.pt.2010.06.013
- Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., Gross, M., Kohn, B., Von Samson-Himmelstjerna, G., 2014. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasites and Vectors* 7, 1–10. doi:10.1186/s13071-014-0535-1
- Schwartz, J.J., Gazumyan, a, Schwartz, I., 1992. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 174, 3757–3765.
- Semião-santos, S.J., Abranches, P., Silva-pereira, M.C.D., Santos-gomes, G.M., Fernandes, J.P., Vetter, J.C.M., 1996. Reliability of Serological Methods for Detection of Leishmaniasis in Portuguese Domestic and Wild Reservoirs 91, 747–

- Severo, M.S., Pedra, J.H.F., Aylo, N., Kocan, K.M., 2015. *Anaplasma*. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00110-4
- Shamir, M., Yakobson, B., Baneth, G., King, R., Dar-Verker, S., Markovics, A., Aroch, I., 2001. Antibodies to Selected Canine Pathogens and Infestation with Intestinal Helminths in Golden Jackals (*Canis aureus*) in Israel. *Vet. J.* 162, 66–72. doi:10.1053/tvj.2000.0572
- Shapiro, A.J., Norris, J.M., Bosward, K.L., Heller, J., 2017. Q Fever (*Coxiella burnetii*) Knowledge and Attitudes of Australian Cat Breeders and Their Husbandry Practices. *Zoonoses Public Health* 64, 252–261. doi:10.1111/zph.12305
- Silaghi, C., Woll, D., Hamel, D., Pfister, K., Mahling, M., Pfeffer, M., 2012. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents – Analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit. Vectors* 5, 191. doi:10.1186/1756-3305-5-191
- Silchenko, V., 1957. Epidemiological and clinical features of tularemia caused by waterborne infection. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobio* 28, 788–795.
- Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., Macdonald, D.W., 2004. *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs*. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs.
- Simić, Č., 1957. *Protozoe paraziti čoveka i domaćih životinja*. Naučna knjiga, Belgrade.
- Simić, Č., 1951. O posleratnoj pojavi papatačijeve groznice u Srbiji i Banatu. *Srp. Akad. Nauk. CCIV. Od. Med. Nauk.* 4, 143–152.
- Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., Bonnet, S.I., 2017. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission 7, 1–23. doi:10.3389/fcimb.2017.00281
- Šimo, L., Kocáková, P., Sláviková, M., 2004. *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodidae) female feeding in laboratory. *Biol. ...* 655–660.
- Simões, P., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., Baneth, G., 2011. Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs - first report from Portugal and possible vertical transmission. *Parasit. Vectors* 4, 50. doi:10.1186/1756-3305-4-50
- Sjöstedt, A., Eriksson, U., Berglund, L., Tärnvik, A., Sjo, A., Ta, A., 1997. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR . Detection of *Francisella tularensis* in Ulcers of Patients with Tularemia by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1045–1048.
- Skrabalo, Z., Deanovic, Z., 1957. Piroplasmosis in man; report of a case. *Doc. Med. Geogr. Trop.* 9, 11–6.

- Smith, T., Kilborne, F.L., 1893. *Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever*, US Department of Agriculture Bureau of Animal Industry Bulletin. Washington : Government Printing Office, 1893, Washington.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. *Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain*. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203. doi:10.1016/j.vetpar.2008.05.003
- Solano-gallego, L., Caprì, A., Pennisi, M.G., Caldin, M., Furlanello, T., Trotta, M., 2015. *Acute febrile illness is associated with Rickettsia spp infection in dogs. ???* 1–10. doi:10.1186/s13071-015-0824-3
- Solano-gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. *LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis*. *Parasit. Vectors* 4, 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. *A review of canine babesiosis: the European perspective*. *Parasit. Vectors* 9, 336. doi:10.1186/s13071-016-1596-0
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. *Babesia canis canis and Babesia canis vogeli clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease*. *Vet. Parasitol.* 157, 211–221. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.024
- Sonenshine, E.D., Roe, R.M., 2014. *Biology of Ticks Volume 1*. Oxford University Press, New York.
- Spada, E., Canzi, I., Baggiani, L., Perego, R., Vitale, F., Migliazzo, A., Proverbio, D., 2016. *Prevalence of Leishmania infantum and co-infections in stray cats in northern Italy*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 53–58. doi:10.1016/j.cimid.2016.03.001
- Speelman, P., 2007. *The largest Q fever outbreak ever reported* 380–381.
- Splettstoesser, W.D., Piechotowski, I., Buckendahl, A., Frangoulidis, D., Kaysser, P., Kratzer, W., Kimmig, P., Seibold, E., Brockmann, S.O., 2009. *Tularemia in Germany: The tip of the iceberg?* *Epidemiol. Infect.* 137, 736–743. doi:10.1017/S0950268808001192
- Spyridaki, I., Gikas, A., Kofteridis, D., Psaroulaki, A., Tselentis, Y., 1998. *Q Fever in the Greek Island of Crete : Detection , Isolation , and Molecular Identification of Eight Strains of Coxiella burnetii from Clinical Samples* 36, 2063–2067.
- Stańczak, J., Racewicz, M., Kruminis-Łozowska, W., Kubica-Biernat, B., 2002. *Coinfection of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents*



- of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 198–201. doi:10.1016/S1438-4221(02)80045-5
- Stanek, G., Kahl, O., 1999. Chemoprophylaxis for Lyme borreliosis? *Zentralblatt für Bakteriologie*. 289, 655–665. doi:10.1016/S0934-8840(99)80025-5
- Stanek, G., Strle, F., 2018. Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 233–258. doi:10.1093/femsre/fux047
- Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J., Strle, F., Stanek, G., Wormser, G.P., Gray, J., Strle, F., 2012. Lyme borreliosis. *Lancet* 379, 461–473. doi:10.1016/S0140-6736(11)60103-7
- Starcovici, C., 1893. Bemerkungen u̇ber den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hȧmoglobinurie des Rindes (Babes), dans Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). *Zbl. Bakt., I. Abt.* 1–8.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M., 1975. Lyme arthritis and adults in three connecticut communities 7–17.
- Steere, A.C., Strle, F., Wormser, G.P., Hu, L.T., Branda, J.A., Hovius, J.W.R., Li, X., Mead, P.S., 2016. Lyme borreliosis. *Nat. Publ. Gr.* 2, 1–19. doi:10.1038/nrdp.2016.90
- Stevanović, V., Stevanović, B., 1995. Osnovni klimatski, geološki i pedološki činioci biodiverziteta kopnenih ekosistema Jugoslavije, in: Stevanović, V., Vasić, V. (Eds.), *Biodiverzitet Jugoslavije Sa Pregledom Vrsta Od Međunarodnog Značaja*. Ecolibri, Biološki fakultet, Beograd, pp. 75–95.
- Steverding, D., 2017. The history of leishmaniasis 1–10. doi:10.1186/s13071-017-2028-5
- Stojanov, I., Pušić, I., Paolović, I., Prodanov Radulović, J., Miloš, K., Ratajac, R., 2014a. Findings of ticks in some species of wild carnivores, in: *3rd International Symposium on Hunting, » Modern Aspects of Sustainable Management of Game Populations«*. Zemun - Belgrade, Serbia, pp. 26–28.
- Stojanov, I., Pušić, I., Paolović, I., Prodanov Radulović, J., Miloš, K., Ratajac, R., 2014b. Findings of ticks in some species of wild carnivores. *3rd Int. Symp. Hunting, » Modern Asp. Sustain. Manag. game Popul.* 26–28.
- Stoyanov, S., 2012. Golden Jackal (*Canis Aureus*) in Bulgaria. Current Status, Distribution, Demography and Diet. *Int. Symp. hunting, »Modern Asp. Sustain. Manag. game Popul.* Zemun-Belgrade, Serbia, 22. – 24. June, 2012. 48–56.
- Strelkova, M. V., Ponirovsky, E.N., Morozov, E.N., Zhirenkina, E.N., Razakov, S.A., Kovalenko, D.A., Schnur, L.F., Schönian, G., 2015. A narrative review of visceral leishmaniasis in Armenia, Azerbaijan, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan,

- Tajikistan, Turkmenistan, Uzbekistan, the Crimean Peninsula and Southern Russia. *Parasites and Vectors* 8, 1–18. doi:10.1186/s13071-015-0925-z
- Strle, F., Maraspin, V., Furlan-Iotri, S., Cimperman, J., 1996. Epidemiological Study of a Cohort of Adult Patients with Erythema migrans Registered in Slovenia in 1993. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 503–507.
- Stuenkel, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013a. *Anaplasma phagocytophilum* – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 1–33. doi:10.3389/fcimb.2013.00031
- Stuenkel, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013b. *Anaplasma phagocytophilum* – a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 1–33. doi:10.3389/fcimb.2013.00031
- Stupica, D., Lusa, L., Maraspin, V., Bogovič, P., Vidmar, D., O'Rourke, M., Traweger, A., Livey, I., Strle, F., 2015. Correlation of culture positivity, PCR positivity, and burden of borrelia burgdorferi Sensu Lato in Skin Samples of erythema migrans patients with clinical findings. *PLoS One* 10, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0136600
- Sukara, R., Chochlakis, D., Ćirović, D., Penezić, A., Mihaljica, D., Ćakić, S., Valčić, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tomanović, S., 2018a. Golden jackals (*Canis aureus*) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1090–1097. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.04.003
- Sukara, R., Chochlakis, D., Ćirović, D., Penezić, A., Mihaljica, D., Ćakić, S., Valčić, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tomanović, S., 2018b. Golden jackals (*Canis aureus*) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1090–1097. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.04.003
- Sukara, R., Chochlakis, D., Ćirović, D., Penezić, A., Mihaljica, D., Ćakić, S., Valčić, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tomanović, S., 2018c. Golden jackals (*Canis aureus*) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* doi:10.1016/j.ttbdis.2018.04.003
- Sykes, R.A., Makiello, P., 2017. An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *J. Public Heal. (United Kingdom)* 39, 74–81. doi:10.1093/pubmed/fdw017
- Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Sréter, T., 2013. *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella spiralis* in golden jackals (*Canis aureus*) of Hungary. *Vet. Parasitol.* 197, 393–396. doi:10.1016/j.vetpar.2013.04.032
- Talmi-Frank, D., Kedem-Vaanunu, N., King, R., Bar-Gal, G.K., Edery, N., Jaffe, C.L., Baneth, G., 2010. *Leishmania tropica* infection in golden jackals and red foxes, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1973–1975. doi:10.3201/eid1612.100953
- Tánczos, B., Balogh, N., Király, L., Biksi, I., Szeredi, L., Gyurkovsky, M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M., Farkas, R., 2012. First Record of Autochthonous

*Canine Leishmaniasis in Hungary. Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 588–594.  
doi:10.1089/vbz.2011.0906

Thalhammer, J.G., Stanek, G., Leidinger, E., Khanakah, G., Kirtz, G., Leschnik, M.W., Joachim, A., Duscher, G., 2010. Humoral Immune Response in Dogs Naturally Infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and in Dogs after Immunization with a *Borrelia* Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 828–835.  
doi:10.1128/cvi.00427-09

Thelaus, J., Andersson, A., Broman, T., Bäckman, S., Granberg, M., Karlsson, L., Kuoppa, K., Larsson, E., Lundmark, E., Lundström, J.O., Mathisen, P., Näslund, J., Schäfer, M., Wahab, T., Forsman, M., 2014. *Francisella tularensis* Subspecies *holarctica* Occurs in Swedish Mosquitoes, Persists Through the Developmental Stages of Laboratory-Infected Mosquitoes and Is Transmissible During Blood Feeding. *Microb. Ecol.* 67, 96–107. doi:10.1007/s00248-013-0285-1

Theodoropoulos, G., Gazouli, M., Ikonopoulou, J.A., Kantzoura, V., Kominakis, A., 2006. Determination of prevalence and risk factors of infection with *Babesia* in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification. *Vet. Parasitol.* 135, 99–104. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.021

Tomanović, S., Ćakić, S., Radulović, Ž., Mihaljica, D., Sukara, R., Milutinović, M., Ružić-Sabljčić, E., 2014. Strain diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Serbia. *Parasit. Vectors* 7, O25. doi:10.1186/1756-3305-7-S1-O25

Tomanović, S., Chochlak, D., Radulović, Ž., Milutinović, M., Ćakić, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., 2013a. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* 59, 367–376.  
doi:10.1007/s10493-012-9597-y

Tomanović, S., Radulović, Ž., Ćakić, S., Mihaljica, D., Sukara, R., Penezić, A., Burazerović, J., Ćirović, D., 2013b. Tick species (acari: Ixodidae) of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Serbia, in: 2nd International Symposium on Hunting “modern Aspects of Sustainable Management of Game”. University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad, pp. 229–235.

Tomanović, S., Milutinović, M., Fukui, T., Radulović, Ž., Okamoto, Y., Masuzawa, T., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* 45, 171–183. doi:10.1007/s10493-008-9166-6

Tomanović, S., Radulović, Ž., Masuzawa, T., Milutinović, M., 2010a. Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. *Parasite* 17, 211–217. doi:10.1051/parasite/2010173211

Tomanović, S., Radulović, Ž., Masuzawa, T., Milutinović, M., Stanisavljević, L., 2010b. Potential infectivity of *Anaplasma phagocytophilum* strains in *Ixodes ricinus* ticks from Serbia. *Acta Vet. Hung.* 58, 231–242.  
doi:10.1556/AVet.58.2010.2.9

- Tomassone, L., Berriatua, E., De Sousa, R., Duscher, G.G., Mihalca, A.D., Silaghi, C., Sprong, H., Zintl, A., 2018. Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. *Vet. Parasitol.* 251, 17–26. doi:10.1016/j.vetpar.2017.12.018
- Toole, D.O., Williams, E.S., Woods, L.W., Mills, K., Boerger-fields, A., Montgomery, D.L., Jaeger, P., Edwards, W.H., Christensen, D., Marlatt, W., 2008. Tularemia in range sheep : an overlooked syndrome ? 513, 508–513.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R., 2017. Leishmaniasis: a review. *F1000Research* 6, 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
- Tóth, T., Krecsák, L., Szts, E., Heltai, M., Huszar, G., 2009a. Records of the golden jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) in Hungary from 1800 th until 2007, based on a literature survey. *North. West. J. Zool.* 5, 386–405.
- Tóth, T., Szűcs, E., Heltai, M., 2009b. The past 200 years of the golden jackal ([i]Canis aureus l.[/i], 1758) in hungary – “reed wolf”: Observations from the 1800s to today. *J. Vet. Behav.* 4, 65–66. doi:10.1016/j.jveb.2008.10.026
- Trapp, S.M., Messick, J.B., Vidotto, O., Jojima, F.S., Autran, H.S., Morais, D., 2006. *Babesia gibsoni* genotype Asia in dogs from Brazil § 141, 177–180. doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.036
- Traversa, D., 2013. Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. *Parasites and Vectors* 6, 1–15. doi:10.1177/1559827608320127.
- Trotta, M., Carli, E., Novari, G., Furlanello, T., Solano-gallego, L., 2009. Veterinary Parasitology Clinicopathological findings , molecular detection and characterization of *Babesia gibsoni* infection in a sick dog from Italy 165, 318–322. doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.022
- Trotz-William, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet. Rec.* 152, 97–105. doi:10.1136/vr.152.4.97
- Trouwborst, A., Krofel, M., Linnell, J., 2015. Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodivers. Conserv.* 24, 2593–2610. doi:10.1007/s10531-015-0948-y
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia*-A historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3–10. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.035
- Ulu-kilic, A., Doganay, M., 2014. ScienceDirect An overview : Tularemia and travel medicine. *Travel Med. Infect. Dis.* 12, 609–616. doi:10.1016/j.tmaid.2014.10.007
- Valčić, M.A., 1998. *Opšta epizootologija*. Banjac Print, Beograd.
- Van Gelder, R.G., 1978. A review of canid classification. *Am. Museum Novit.* 1–10.

- Varani, S., Cagarelli, R., Melchionda, F., Attard, L., Salvadori, C., Finarelli, A.C., Gentilomi, G.A., Tigani, R., Rangoni, R., Todeschini, R., Scalone, A., Di Muccio, T., Gramiccia, M., Gradoni, L., Viale, P., Landini, M.P., 2013. Ongoing outbreak of visceral leishmaniasis in Bologna Province, Italy, November 2012 to May 2013. *Eurosurveillance* 18, 1–4. doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.29.20530
- Vaselek, S., Ayhan, N., Oguz, G., Erisoz Kasap, O., Savić, S., Di Muccio, T., Gradoni, L., Ozbek, Y., Alten, B., Petrić, D., 2017. Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): first detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908. *Parasit. Vectors* 10, 444. doi:10.1186/s13071-017-2386-z
- Vasić, A., Nieder, M., Zdravkovi, N., Bojkovski, J., Bugarski, D., Pavlovi, I., 2018. Tick infestation and occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* and piroplasms in cattle in the Republic of Serbia 1813–1818. doi:10.1007/s00436-018-5867-x
- Vassilev, S., Genov, P., 2002. On the reproduction of jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria. *Acta Zool. Bulg.* 54, 87–92.
- Verin, R., Poli, A., Ariti, G., Nardoni, S., Fanucchi, M.B., Mancianti, F., 2010. Detection of *leishmania infantum* DNA in tissues of free-ranging red foxes (*vulpes vulpes*) in Central Italy. *Eur. J. Wildl. Res.* 56, 689–692. doi:10.1007/s10344-010-0395-8
- Walker, a. ., Bouattour, A., Camicas, J., Estrada-peña, A., Horak, I., Latif, A., Pegram, R., Preston, P., 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species, The University of Edinburgh.
- Waner, T., Baneth, G., Strenger, C., Keysary, A., King, R., Harrus, S., 1999. Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Vet. Parasitol.* 82, 121–128. doi:10.1016/S0304-4017(99)00002-3
- Welc-Faleciak, R., Rodo, A., Siński, E., Bajer, A., 2009. *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 166, 191–198. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.038
- Westblade, L.F., Simon, M.S., Mathison, B.A., Kirkman, L.A., 2017. *Babesia microti*: from Mice to Ticks to an Increasing Number of Highly Susceptible Humans 55, 2903–2912. doi:10.1128/JCM.00504-17
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167, 108–122. doi:10.1016/j.vetpar.2009.09.013
- World Health Organisation, 2018. Global leishmaniasis surveillance update, 1998–2016. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 40, 521–540. doi:10.1186/1750-9378-2-15.Voir
- World Health Organization, 2007. WHO guidelines on Tularemia. 2007.

- Wortmann, G., Sweeney, C., Houg, H.S., Aronson, N., Stiteler, J., Jackson, J., Ockenhouse, C., 2001. Rapid diagnosis of Leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 583–587. doi:10.4269/ajtmh.2001.65.583
- Young, D.G., Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America. *J. Biol. Sci.* 14, 79–94. doi:10.1073/pnas.0703993104
- Zachos, F.E., Cirovic, D., Kirschning, J., Otto, M., Hartl, G.B., Petersen, B., Honnen, A.C., 2009. Genetic variability, differentiation, and founder effect in golden jackals (*Canis aureus*) from Serbia as revealed by mitochondrial DNA and nuclear microsatellite loci. *Biochem. Genet.* 47, 241–250. doi:10.1007/s10528-009-9221-y
- Zahler, M., Rinder, H., Zweygarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E., Gothe, R., 2000. “*Babesia gibsoni*” of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology* 120, 365–369. doi:10.1017/S0031182099005557
- Zanet, S., Sposimo, P., Trisciuglio, A., Giannini, F., Strumia, F., Ferroglio, E., 2014. Veterinary Parasitology Epidemiology of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. *Vet. Parasitol.* 199, 247–249. doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.023
- Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., De Mera, I.G.F., Gortazar, C., Carpignano, M.G., Ferroglio, E., 2014. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasites and Vectors* 7, 70. doi:10.1186/1756-3305-7-70
- Žele, D., Avberšek, J., Gruntar, I., Očepek, M., Vengušt, G., 2012. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in game animals from Slovenia. *Acta Vet. Hung.* 60, 441–448. doi:10.1556/AVet.2012.038
- Živković, V., 1967. Flebotomine (Diptera, Psychodidae) jugoistočne i istočne Srbije. *Glas Srp Akad Nauk CCLXXI, Odeljenje Med Nauk.* 20, 179–88.
- Zivkovic, Z., Nijhof, A.M.A., de la Fuente, J., Kocan, K.M.K., Jongejan, F., 2007. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Vet. Res.* 3, 32. doi:10.1186/1746-6148-3-32

## Biografija autora

Ratko Sukara je rođen 7. novembra 1987. godine u Jajcu (Bosna i Hercegovina). Nakon završene srednje veterinarske škole u Gradišci (Republika Srpska), školske 2006/2007. godine upisao je integrisane akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,18. Doktorske akademske studije je upisao školske 2012/2013. godine na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene nastavnim Planom i programom postdiplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,67. Od januara 2013. godine Ratko Sukara je zaposlen u tada Laboratoriji a danas Grupi za medicinsku entomologiju, Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod nazivom Enzootski transmisioni ciklusi patogenih mikroorganizama koje prenose krpelji (OI173006), kojim rukovodi dr Snežana Tomanović. Od samog početka Ratko Sukara je uključen u istraživanja artropodnih vektora sa akcentom na istraživanja krpelja i patogena koje oni prenose kao i na istraživanje uloge različitih domaćina u širenju i održavanju vektorima prenosivih bolesti. Naučno istraživački rad Ratka Sukare je posebno usmeren na istraživanja vezana za ulogu divljih kanida (šakali, lisice, vukovi) u enzootskim ciklusima vektorima prenosivih patogena, identifikaciju i karakterizaciju krpeljima prenosivih uzročnika zoonoza. Rad na ovom polju ogledao se i u realizaciji aktivnosti u sklopu bilateralnog projekta sa austrijskim partnerima sa Univerziteta veterinarske medicine iz Beča (Veterinärmedizinische Universität, Wien) pod nazivom „Wild canids as reservoirs for ticks and tick-borne pathogens“, u periodu 2016-2017. godine. Član je Društva parazitologa Srbije (koje je član Evropske federacije parazitologa), i Entomološkog društva Srbije.

Dosadašnja naučnoistraživačka aktivnost doktora veterinarske medicine Ratka Sukare se ogleda u objavljivanju 30 bibliografskih jedinica, od kojih 9 in extenso. Osmo radova objavljeno je u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20) od čega 5 u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), dva u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i jedan u međunarodnom časopisu (M23). Ratko Sukara objavio je i 1 saopštenje na međunarodnom skupu štampano u celini (M33), 18 saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u izvodu (M34), i 3 saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани: Ратко Р. Сукара

број уписа: 16/10

Изјављујем

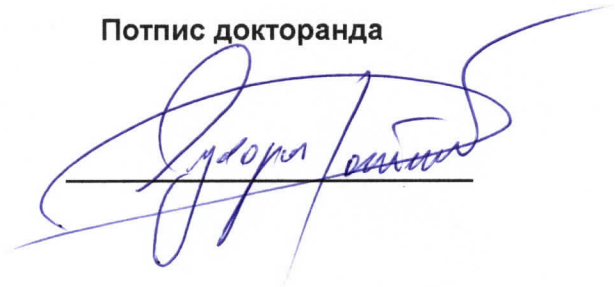
да је докторска дисертација под насловом:

**„Епизоотиолошко-епидемиолошки значај златног шакала (*Canis aureus*) у одржавању векторима преносивих зооноза на територији Републике Србије“**

- 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, 15.04.2019.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ратко Р. Сукара

Број уписа: 16/10

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Епизоотиолошко-епидемиолошки значај златног шакала (*Canis aureus*) у одржавању векторима преносивих зооноза на територији Републике Србије“

Ментори: Др Мирослав Валчић, редовни професор

Др Снежана Томановић, научни саветник

Потписани: Ратко Р. Сукара

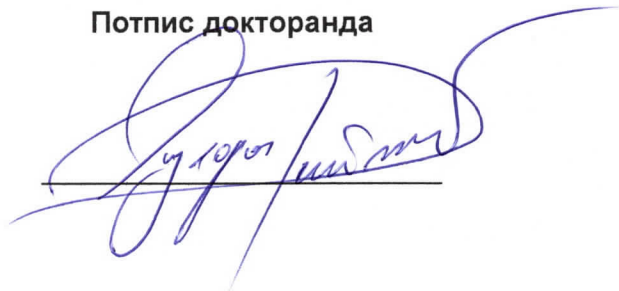
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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.

У Београду, 15.04.2019.

Потпис докторанда



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**„Епизоотиолошко-епидемиолошки значај златног шакала (*Canis aureus*) у одржавању векторима преносивих зооноза на територији Републике Србије“**

која је моје ауторско дело.

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

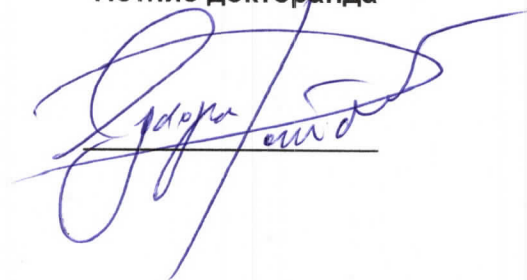
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду, 15.04.2019.

Потпис докторанда



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