

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Дарко ДАВИТКОВ

КЛИНИЧКО-ЕПИЗООТИОЛОШКО
ИСПИТИВАЊЕ ПИРОПЛАЗМОЗЕ КОЊА НА
ПРОСТОРУ ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНА И ЊЕН
УТИЦАЈ НА ОШТЕЋЕЊЕ ДНК ДОМАЋИНА
-Докторска дисертација-

Београд, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Darko DAVITKOV

CLINICAL AND EPIZOOTIOLOGICAL
EXAMINATION OF EQUINE PIROPLASMOSIS
ON THE CENTRAL BALKAN REGION AND
ITS EFFECT ON HOST DNA DAMAGE

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2018

Ментори:

Др Јевросима Стевановић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Вања Крстић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Чланови комисије:

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Сунчица Борозан, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Миланко Шеклер, виши научни сарадник

Ветеринарски специјалистички институт “Краљево”

Датум одбране: _____ 2018.

Београд

Овај рад посвећујем мојој породици!

Ова докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“ (Ев. бр. 46002, руководилац проф. др Зоран Станимировић), који је финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

КЛИНИЧКО-ЕПИЗООТИОЛОШКО ИСПИТИВАЊЕ ПИРОПЛАЗМОЗЕ КОЊА НА ПРОСТОРУ ЦЕНТРАЛНОГ БАЛКАНА И ЊЕН УТИЦАЈ НА ОШТЕЋЕЊЕ ДНК ДОМАЋИНА

РЕЗИМЕ

Пироплазмоза коња представља значајно векторски преносиво обољење са великом раширеношћу и економским утицајем на коњарство широм света. Узрочници пироплазмозе коња су протозое *Theileria equi* и *Babesia caballi*. Обољење може бити присутно код коња и супклинички, али може бити праћено и озбиљном клиничком сликом.

Циљ ове докторске дисертације је био опсежно клиничко-епизоотиолошко испитивање приплазмозе коња на простору централног Балкана, где би испитивали присуство паразита молекуларним методама детекције, пратили хематолошке и биохемијске параметре, параметре оксидативног стреса и на крају степен оштећења ДНК ћелија домаћина услед присуства паразита.

У циљу стицања увида у преваленцију обољења спровели смо молекуларну епизоотиолошку студију која је укључивала 165 коња, са осам локалитета са простора три државе (Србија, Црна Гора, Босна и Херцеговина). Прво смо урадили PCR методу за детекцију 450 бп дугог сегмента 18S rRNA гена који је присутан код свих *Theileria* и *Babesia* врста. За дефинитивну детекцију врсте је урађен мултиплекс PCR. Да би потврдили добијене резултате урађено је секвенцирање позитивних узорака. Укупна преваленција *T. equi* и *B. caballi* на испитиваном простору

износила је 32,1% и 1,8%, респективно. У Србији је установљена преваленција од 40,2% за *T. equi* и 0,6% за *B. caballi*, у БиХ 16,7% за *T. equi* и 4,2% за *B. caballi*, а у Црној Гори 8,3% за *T. equi* и 8,3% за *B. caballi*. Резултати секвенцирања су потврдили 100% подударност са врстама установљеним на основу методе мултиплекс РСР.

Испитана је повезаност одређених фактора ризика (попут локалитета, старости, пола и намене коња) са вероватноћом да коњи буду инфицирани. Не постоји статистички значајна разлика у преваленцији *B. caballi* и *T. equi* између различитих старосних категорија. Статистички значајне разлике су установљене у преваленцији између различитих локалитета, пола и намена коња.

Свим коњима су урађене крвне слике и одређени основни биохемијски параметри. *T. equi* доводи до статистички значајних промена у одређеним хематолошким параметрима код инфицираних коња у односу на контролну групу коња, и то до смањења RBC, HGB, HCT, MCHC и PLT ($P < 0,001$), као и до повећања WBC ($P < 0,01$), GRA ($P < 0,05$) и MCV ($P < 0,001$). Код позитивних јединки установљено је статистички значајно повећање концентрације укупних протеина, концентрације глобулина, активности AST, AP и LDH ($P < 0,001$), значајно смањење концентрације албумина ($P < 0,001$), повећање концентрације глукозе ($P < 0,01$), повећање концентрације билирубина и активности GGT ($P < 0,05$) и смањење концентрације гвожђа ($P < 0,05$).

Код коња инфицираних са *T. equi* установљено је значајно повећање следећих параметара оксидативног стреса: концентрације РНб, активности SOD, концентрације NO_2^- , NO_x и MDA; док је забележено значајно смањење ЕН, активности антиоксидативних ензима CAT и PON1, као и концентрације тиолних група. Код инфицираних коња је забележено значајно повећање активности изоензима LDH-5. Комет тестом је утврђено значајно оштећење ДНК ћелија коња услед присуства *T. equi*.

T. equi доводи до повећаног стварања реактивних кисеоничних врста и параметара оксидативног стреса, што резултира променом осмотске фрагилности ћелија, настанком хемоллизе и хепатоцелуларног оштећења и доводи до оштећења липида, протеина и ДНК. Добијени резултати указују да оксидативни стрес игра важну улогу у патогенези пироплазмозе копитара.

Кључне речи: биохемијски параметри, ДНК оштећење, Комет тест, коњи, мултиплекс РСР, оксидативни стрес, пироплазмоза коња, хематологија

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Клиничка дијагностика, патологија и терапија животиња

УДК број: 636.1:616.993.19:579.222

CLINICAL AND EPIZOOTIOLOGICAL EXAMINATION OF EQUINE PIROPLASMOSIS ON THE CENTRAL BALKAN REGION AND ITS EFFECT ON HOST DNA DAMAGE

SUMMARY

Equine piroplasmosis is a significant vector-prone disease with a high degree of widespread and economic impact on horse industry throughout the world. The causative agents of equine piroplasmosis are protozoas *Theileria equi* and *Babesia caballi*. The disease can be present subclinical in horses, but also it can be accompanied by a serious clinical picture.

The goal of this doctoral dissertation was the comprehensive clinical and epizootiological examination of the equine piroplasmosis on the central Balkan region, where we would investigate the presence of parasites by molecular detection methods, to follow the haematological and biochemical parameters, the parameters of oxidative stress and at the end, the degree of host cells DNA damage due to parasites presence.

In order to gain insight into the prevalence of the disease, we conducted a molecular epidemiological study involving 165 horses, from eight locations from three countries (Serbia, Montenegro, Bosnia and Herzegovina). First, we did a PCR method for the detection of a 450 bp long segment of the 18S rRNA gene which is present in all *Theileria* and *Babesia* species. For the definitive species identification, a multiplex PCR was done. In order to confirm obtained results, sequencing of positive samples was made. The overall prevalence of *T. equi* and *B. caballi* in the study area was 32.1% and 1.8% respectively. In Serbia a prevalence of 40.2% was established for *T. equi* and 0.6% for *B. caballi*, in BiH 16.7% for *T. equi* and 4.2% for *B. caballi*, and in Montenegro 8.3% for *T. equi* and 8.3% for *B. caballi*. Results of the sequence analysis demonstrated 100% correspondence to multiplex PCR diagnosed *Babesia* species.

The correlation between certain risk factors (such as the location, age, sex and purpose of the horse) is examined with the likelihood that horses will be infected. There is no statistically significant difference in the prevalence of *B. caballi* and *T. equi* between different age categories. Statistically significant differences were established in the prevalence between different locations, sex and purposes of the horse.

Complete blood count and certain biochemical parameters were done to all horses. *T. equi* leads to statistically significant changes in certain haematological parameters in infected horses compared to the control group of horses, to a decrease in RBC, HGB, HCT, MCHC and PLT ($P < 0.001$), and to an increase in WBC ($P < 0.01$), GRA ($P < 0.05$) and MCV ($P < 0.001$). In *T. equi* infected horses we detected increase in total protein, globulin, AST, AP and LDH ($P < 0.001$), a statistically significant decrease in albumin ($P < 0.001$), a statistically significant increase in glucose concentration ($P < 0.01$), an increase in bilirubin and GGT ($P < 0.05$) and a statistically significant reduction in iron ($P < 0.05$).

Compared to healthy horses, those infected with *T. equi* showed significant increase in following oxidative parameters: concentration of PHb, activity of SOD, concentration of NO_2^- and NO_x and MDA level, while significant decreases were recorded in EH, activities of antioxidant enzymes CAT and PON1 and in levels of thiol group. The comet assay revealed significantly increased DNA damage in the presence of *T. equi* in comparison to healthy horses. Horses infected with *T. equi* showed significant increase in activity of LDH-5 isoenzyme compared to control.

T. equi induced an increased production of ROS which resulted in changes of osmotic fragility, haemolysis and hepatocellular damage, and leads to damage of lipids, proteins and DNA. The obtained results indicate that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of equine piroplasmiasis.

Keywords: biochemical parameters, Comet assay, DNA damage, equine piroplasmiasis, hematology, horses, multiplex PCR, oxidative stress

Major Field of Study: Veterinary medicine

Special Field of Study: Clinical diagnostics, pathology and animal therapy

UDK Number: 636.1:616.993.19:579.222

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	4
2.1. Узрочници пироплазмозе коња	4
2.2. Епизоотиолошка ситуација у свету	6
2.3. Патогенеза пироплазмозе коња	7
2.4. Клиничка манифестација обољења	10
2.5. Начини дијагностике пироплазмозе коња	14
2.6. Оксидативни стрес	15
2.6.1.Оксиданси и оксидативно оштећење макромолекула	15
2.6.2.Механизми одбране од оксидативног стреса	18
2.6.3.Оксидативни стрес и обољења коња	19
2.7. Детекција генотоксичних ефеката Комет тестом	20
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА	22
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	23
4.1. Материјал	23
4.2. Методе	25
4.2.1.Хематолошке и биохемијске анализе	25
4.2.2.Изолација ДНК из крви	25
4.2.3.РСР реакције	27
4.2.4.Електрофореза и визуелизација РСР продуката	29
4.2.5.Секвенцирање пурификованих секвенци	30
4.2.6.Одређивање показатеља оксидативног стреса	30
4.2.7.Процена оштећења ДНК уз помоћ Комет теста	31
4.2.8.Статистичка обрада података	34
5. РЕЗУЛТАТИ	35
5.1. Раширеност пироплазмозе коња на испитиваном простору	35
5.2. Резултати хематолошких и биохемијских параметара	38

5.3. Резултати анализе параметара оксидативног стреса	40
5.4. Резултати Комет теста	52
6. ДИСКУСИЈА	54
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	64
8. ЛИТЕРАТУРА	66

СКРАЋЕНИЦЕ

T. equi - *Theileria equi*

B. caballi - *Babesia caballi*

OIE - *Office International des Epizooties*

WAHID - *World Animal Health Information Database*

DIC - дисеминована интраваскуларна коагулација

HCT - вредност хематокрита

SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*

EMA-1 - *T. equi* мерозоит антиген 1

EMA-2 - *T. equi* мерозоит антиген 2

IFN- γ - интерферон γ

САД - Сједињене Америчке Државе

MCV - просечни ћелијски волумен

MCH - средња вредност концентрације хемоглобина по еритроциту

MCHC - средња вредност концентрације хемоглобина по запремини еритроцита

ALP - алкална фосфатаза

AST - аспартат аминотрансфераза

ALT - аланин аминотрансфераза

GGT - гама-глутамил трансфераза

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

РНК - рибонуклеинска киселина

LAMP - *Loop-Mediated Isothermal Amplification*

RLB - *Reverse Line Blot*

HO \cdot - хидроксил радикал

NO \cdot - азот-моноксид радикал

O $_2^{\cdot}$ - супероксидни радикал

ROS - реактивне кисеоничне врсте

RNS - реактивне азотове врсте

ONOO⁻ - пероксинитритни анјон
GSH - глутатион
LMPA - *Low Melting Point Agarose*
NMPA - *Normal Melting Point Agarose*
PBS - *phosphate-buffered saline*
WBC - број белих крвних зрнаца
LIM - број лимфоцита
MID - укупан број моноцита, базофила, еозинофила и прекурзора
леукоцита
GRA - број гранулоцита
RBC - број црвених крвних зрнаца
HGB - концентрација хемоглобина
PLT - број крвних плочица
EDTA - етилен диамин тетра сирћетна киселина
TBE - Tris-borat, EDTA
DMSO - диметил-сулфоксид
TCS - *Total Comet Score*
БиХ - Босна и Херцеговина
LDH - лактат-дехидрогеназа
EH - степен хемоллизе
PHb - концентрација слободног хемоглобина у плазми
 \bar{X} - аритметичка средина
SD - стандардна девијација
SE - стандардна грешка
CV - коефицијент варијације
SOD - супероксид-дисмутаза
PON1 - параоксоназа
CAT - каталаза
NO₂⁻ - концентрација нитрита
NO_x - концентрација нитрата и нитрита
MDA - малондиалдехид

-SH групе – тиолне групе

PAGE – полиакриламид гел електрофореза

TRIS – трис (хидроксиметил) аминометан

1. УВОД

Кроз историју коњи су имали битну улогу у животу и раду људи. Пољопривредна производња је вековима била незамислива без помоћи ових дивних, племенитих и нарасе отпорних животиња. Како се потреба за држањем радних коња смањивала (пре свега након индустријске револуције, масовне употребе трактора и комбајна), тако је и број коња кренуо драстично да опада. Са друге стране квалитетна грла коња су била и остала значајан статусни симбол. Данас се коњи углавном користе за рекреативно јахање, трке, спорт, традиционална такмичења и фестивале.

Паразитске инфекције (укључујући ектопаразите, ендопаразите и паразите крви) и дан данас представљају озбиљан проблем у свакодневној ветеринарској пракси. Пироплазмоза копитара је крпељски преносиво, хемопаразитско обољење које може довести до озбиљних економских губитака у коњарству. Пироплазмоза коња, позната као и бабезиоза, је често остајала недијагностикована почетком двадесетог века. Први забележени случај пироплазмозе коња је био у Јужној Африци 1901. године и тада је названа грозница антракса. У литературним подацима са почетка двадесетог века се још назива и маларија коња, као и билијарна грозница. Узрочници пироплазмозе коња су протозое *Theileria equi* и *Babesia caballi*. Углавном се јавља у тропским, суптропским и умереним климатским зонама. Пироплазмоза коња се налази на листи заразних болести Светске организације за здравље животиња (*World Organization for Animal Health = Office International des Epizooties - OIE*) које се обавезно пријављују. Проблем пироплазмозе коња се мора сагледавати шире од државних граница једне

земље. Узрочници пироплазмозе коња се релативно лако могу унети чак и у земље које важе за слободне од пироплазмозе копитара, како преко заражених асимптоматских коња, тако и преко крпеља. Да би то спречиле, земље попут Аустралије, Канаде, Јапана и Сједињених Америчких Држава, су увеле строге увозне прописе који ограничавају транспорт серопозитивних коња преко њихових граница.

У тренутку започињања ове докторске дисертације подаци о епизоотиолошкој ситуацији пироплазмозе коња у региону (Србија, Црна Гора и Босна и Херцеговина) су били јако оскудни, слободно можемо рећи непостојећи. Наилазили смо на опречне информације на терену. Са једне стране смо имали Управу за ветерину и ветеринарске инспекторе који су тврдили да пироплазмозе коња сигурно нема на нашем простору, док су са друге стране били ветеринари са терена и дугогодишњи одгајивачи коња, који су примећивали код појединих грла промене које би могле одговарати овом обољењу. Промене су се углавном огледале у слабијем раду јединки, бржем замарању, одређеном степену анемије и тромбоцитопеније.

Да би разрешили дилему, неопходно је било да нађемо и овладамо методологијом за брзу и прецизну специјску идентификацију узрочника пироплазмозе коња. У складу са тим, један од првих циљева ове докторске дисертације је и било успостављање и оптимизација методе молекуларне дијагностике и испитивање ефикасности мултиплекс PCR методе у идентификацији узрочника пироплазмозе копитара. С обзиром на озбиљност и деликатност проблематике и чињенице да не постоји ниједна институција у земљи која врши детекцију узрочника, одлучено је да, уколико буде позитивних узорака, обавезно извршимо секвенцирање амплификата. Постављање тачне дијагнозе је неопходно да би се прикупили основни подаци о раширености обољења у одређеној популацији коња, као и за имплементацију адекватних и ефективних

контролних мера. Могућност прецизне дијагностике је кључни фактор у спречавању преноса пироплазмозе коња на друге копитаре.

Пироплазмоза копитара може довести до озбиљних промена хематолошких и биохемијских параметара. Постоји велики број литературних навода, али и значајно различитих резултата. Са друге стране познато је да паразитске инфекције могу довести до појаве оксидативног стреса, иако није било озбиљнијих испитивања код коња. Превелико стварање слободних кисеоничних врста може индуковати оксидативне модификације ћелијских макромолекула као што су липиди, протеини и ДНК. Услед оштећења ДНК може доћи до настанка мутација, грешака приликом репликација, нестабилности генома и ћелијске смрти. Стога, процена оштећења ДНК може бити индиректан маркер за процену оксидативног стреса.

С обзиром на све горе наведено, одлучили смо да спроведемо једно свеобухватно клиничко-епизоотиолошко испитивање приплазмозе коња на простору централног Балкана, где би испитивали присуство паразита молекуларним методама детекције, пратили хематолошке и биохемијске параметре, параметре оксидативног стреса и на крају степен оштећења ДНК ћелија домаћина услед присуства паразита.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Узрочници пироплазмозе коња

Пироплазмоза коња представља изузетно значајно протозоално обољење са великом раширеношћу и економским утицајем на коњарство широм света (Zobba и сар., 2008; OIE, 2017). Узрочници пироплазмозе коња, протозое *Theileria equi* и *Babesia caballi*, су облигатни крвни паразити (Mehlhorn и Schein, 1998).

Родови *Babesia* и *Theileria* припадају фамилијама Babesiidae и Theileriidae. Сам назив пироплазма потиче од крушколиког облика интраеритроцитних репликативних форми паразита (енгл. pear - крушка). Пироплазме припадају реду Apicomplexa, у који спадају и родови *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, и *Toxoplasma*. *B. caballi* представља „праву“ бабезију пошто се умножава искључиво у еритроцитима домаћина. Што се тиче *T. equi*, ситуација није толико јасна када говоримо о прецизној таксономској класификацији. Иако је називана „мала“ бабезија, *T. equi* поседује неколико карактеристика које је разликују од других врста рода *Babesia*. Те карактеристике су: почетни развој у лимфоцитима пре умножавања у еритроцитима (Schein, 1981; Moltmann и сар., 1983) (што је карактеристика *Theileria* spp.), подела на четири мерозоиота унутар еритроцита (који формирају „малтешки крст“), само трансстадијални пренос крпељима (без трансваријалног преноса) и резистенција на лекове против бабезиозе (Krylov и сар., 1982; Knowles и сар., 1996; Brüning и сар., 1996). Одређене филогенетске студије чак указују да *T. equi* припада посебној парафилетској групи, која се разликује од родова *Babesia* и *Theileria* (Allsopp и сар., 1994). Тренутно се оба назива могу наћи у литератури, мада се *T. equi* све чешће користи.

Учесталост појаве пироплазмозе коња у највећој мери зависи од дистрибуције крпеља за које је потврђено да представљају векторе ових протозоалних паразита (de Waal, 1992; Friedhoff и Soule, 1996). Више од 15 врста родова *Dermacentor*, *Hyalomma* и *Rhipicephalus* преносе *B. caballii* и *T. equi* (Thompson, 1969; Friedhoff и сар., 1990; Stiller и сар., 2002). *T. equi* могу преносити и *Boophilus microplus* (Knowles и сар., 1992; Guimaraes и сар., 1998; Battsetseg и сар., 2001) и *Amblyomma cajennense* (Scoles и сар., 2011). Крпељи су и резервоари *B. caballii*, с обзиром да ови протозоални паразити могу опстати у крпељима током неколико генерација, са трансстадијалним и трансваријалним преносом (то није правило за све врсте крпеља). Насупрот томе, коњи су једини познати резервоар за *T. equi*, док се крпељима једино одвија трансстадијални пренос. Паразитемија код коња инфицираних са *B. caballii* обично не прелази 1%, а чак и кад постоје клиничке манифестације обољења паразитемија може бити свега 0.1% (de Waal, 1992). Највиша забележена паразитемија је 10% (Holbrook и сар., 1969). Код инфекције са *T. equi* паразитемија се обично налази у распону од 1% до 7% (Friedhoff и сар., 1996), са максимумом од 95% (Holbrook и сар., 1969). Коњи који су једном инфицирани са *T. equi* остају доживотни носиоци, без обзира да ли је спровођена терапија или се организам сам изборио са инфекцијом (Schein, 1988). Сматра се да је инфекција са *B. caballii* самоограничавајућа, и да траје до 4 године након инфекције (Holbrook и сар., 1969). Међутим, код многих коња који су се опоравили од инфекције са *B. caballii* долази до појаве рецидива, што указује на привремено стање у којем паразити не могу бити откривени упркос евентуалној доживотној инфекцији. Коњи који су носиоци паразита представљају потенцијални резервоар за одржавање и ширење паразита на крпеље и копитаре (Thompson, 1969). *T. equi* се може пренети и јатрогено контаминираним иглама, хируршким инструментима или трансфузијом (Friedhoff и сар., 1996; Brüning и сар., 1996). Забележен је и трансплацентарни пренос код хронично инфицираних кобила. Такви gravidитети се обично завршавају

абортусом, рађањем мртворођене или слабо виталне ждребади. Трансплацентарни пренос се обично јавља код инфекција са *T. equi* (de Waal и сар., 1992; Lewis и сар., 1999; Phipps и сар., 2004).

2.2. Епизоотиолошка ситуација у свету

Пироплазмоза коња представља ендемску болест у регионима са тропском, суптропском и умереном климом (Rothschild, 2013). Серопреваленција је веома варијабилна у Европи и налази се у распону од 8 до 35% за *B. caballi* и од 20 до 40% за *T. equi* (Camacho и сар., 2005; Hornok и сар., 2007; Sevnic и сар., 2008).

Иако су обављене бројне студије о епизоотиологији и раширености инфекције у одређеним земљама и регијама, ове публикације треба тумачити са опрезом с обзиром на велике варијације у експерименталном дизајну, узорцима и дијагностичким тестовима. Генерално гледано *T. equi* је раширена на више територија и чешће се јавља него *B. caballi*. Изузетак представљају северне регије северне хемисфере у којима је чешће детектована *B. caballi* (Friedhoff и сар., 1990). На основу података којима располаже ОИЕ (*Office International des Epizooties*) ендемским просторима за пироплазмозу коња се сматрају: Централна и Јужна Америка, Куба, Африка, Азија, Блиски Исток и Јужна Европа (WАHID, 2017). На простору Европе, *T. equi* и *B. caballi* су широко распрострањене у Португалији, Шпанији, Француској, Италији, Мађарској, Румунији, Грчкој, Турској, Немачкој, Швајцарској и на Балканском полуострву (Rothschild, 2013). Пироплазмоза коња се често детектује у свим регијама Јужне Америке изузев најјужнијих подручја Чилеа и Аргентине. Распрострањеност инфекције унутар карипских земаља је упитна, али болест јесте пријављена на већини острва, укључујући Тринидад и Кубу. (Rampersad и сар., 2003; Asgarali и сар., 2007; WАHID, 2017). Обољење је широко распрострањено у

Африци и Азији, са највећом преваленцијом у Јужној Африци (Viljoen и сар., 2009). Веома је тешко на прави начин сагледати епизоотиолошку ситуацију пошто случајеве пироплазмозе коња не пријављују све земље организацији ОИЕ. Земље као што су Мексико и Кина се не сматрају ендемским, јер ОИЕ не добија информације о дистрибуцији случајева пироплазмозе у тим земљама. Са друге стране радови из Мексика и Кине описују случајеве пироплазмозе коња у тим земљама (Хуан и сар., 2002; Хи и сар., 2003; Cantu-Martinez и сар., 2012). Састављање листе неендемских подручја је једнако захтевно и изазовно, с обзиром на разлике у надзору, различита ограничења увоза/извоза и проблеме у пријављивању болести. Епизоотиолошка ситуација по земљама може се проверити на интернет страници ОИЕ, наравно за земље које пријављују детектоване случајеве обољења (ОИЕ, 2017).

2.3. Патогенеза пироплазмозе коња

У ендемским подручјима за пироплазмозу коња, већина коња се инфицира у првој години живота. Морталитет код коња се обично налази у распону од 5% до 10%, у зависности од узрочника, општег здравственог стања животиња и могућности лечења животиња. Морталитет може прећи и 50% у случајевима кад се старији коњи који никад нису били у контакту са узрочницима пироплазмозе увезу у ендемска подручја. Увоз инфицираних коња у јужну Француску резултирао је морталитетом од 69% код нетретираних коња (Mauger, 1962). Период инкубације варира од 12 до 19 дана за *T. equi* и 10 до 30 дана за *B. caballi* (de Waal, 1992). Промене у садржају протеина и липида у мембрани еритроцита, као и повећање концентрације малондиалдехида у плазми током тешке паразитемије, указују на то да акумулација оксидативних јона насталих од пероксидације липида мења биохемијски састав еритроцита, што доводи до хемолize (Ambawat и сар., 1999). Ове промене могу довести до повећане ригидности

еритроцита и смањене деформабилности, доприносећи микроваскуларној стази (Ambawat и сар., 1999). Хематокрит (HCT) се обично смањи до 20%, али може пасти и на 10%, па чак и ниже. Озбиљне анемије се много чешће јављају код инфекција са *T. equi* (Ambawat и сар., 1999). Као последица озбиљне хемоллизе долази до појаве хемоглобинурије, која може бити различитог интензитета. Иктерус, који је такође узрокован хемоллизом, резултат је повећања индиректног (неконјугованог) билирубина који се депонује на слузокожама и по ткивима дајући им жуту боју. У случајевима инфекције са *B. caballi*, агрегација инфицираних еритроцита може довести до микроваскуларне оклузије. Тромбоцитопенија и системски инфламаторни одговор доводе до оштећења ендотела, повећане васкуларне пропустљивости, а у тешким случајевима и до дисеминоване интраваскуларне коагулације (DIC). Код озбиљно заражених коња долази до појаве едема, крварења, исхемије и аноксије. Стање јединки може кулминирати дисфункцијом органа (Maurer, 1962). Тромбоцитопенија је описана код пироплазмозе копитара, као и код других протозоалних инфекција. Иако су предложене различите теорије настанка тромбоцитопеније, тачна патогенеза настанка није несумњиво потврђена. Код бабезиозе паса сматра се да тромбоцитопенија може бити резултат слабе дисеминоване интраваскуларне коагулације (Ambawat и сар., 1999). Пролаз инфицираних еритроцита кроз плаценталну баријеру имплицира да највероватније долази до заражавања ждребади на тај начин што долази до мешања матерналне и феталне крви непосредно пре или у току ждребљења, а свакако услед оштећења крвних судова плаценте (Erbsloh, 1975). Није свако ждребе од заражене кобиле заражено, а фактори који утичу на то да ли ће се пренатална инфекција јавити нису утврђени (Erbsloh, 1975). Заштитни имунитет је присутан све док је животиња носилац паразита, што је у највећем броју случајева доживотно. Не постоји унакрсни имунитет између *T. equi* и *B. caballi* (Maurer, 1962; Taylor и сар., 1969). Код појединих коња не долази до појаве клиничких манифестација

обољења због континуиране стимулације имунског одговора услед присуства паразита. Тачни механизми одбране домаћина нису познати. Урођени имунитет вероватно игра главну улогу у контроли паразита (de Waal и van Heerden, 1987; Ahmed, 2002), иако прецизна улога неутрофила, макрофага и ћелија убица у контроли паразита није јасно дефинисана. Слезина је јако важан орган за елиминацију паразита. Коњи код којих је неопштећена слезина много боље подносе обољење и најчешће преживе, док се код коња код којих је извађена слезина развија озбиљна паразитемија и долази до угинућа (Frerich и сар., 1969; Schein, 1988; Knowles и сар., 1994; Knowles, 1996). Упркос њеној важној улози, слезина и урођени имунитет нису довољни за заштиту од узрочника пироплазмозе коња, у одсуству адаптивног имунитета. Knowles и сар. (1994) су показали да ждребад са тешком комбинованом имунодефицијенцијом (енгл. *Severe Combined Immunodeficiency - SCID*) након експерименталне инфекције са *T. equi* постају озбиљно анемична са високим степеном паразитемије и врло брзо угињавају. SCID ждребадима недостају Б лимфоцити и нису у стању да створе специфични имунски одговор на присуство одређеног антигена, док су им слезина и урођени имунски систем неопштећени. Овај податак нам показује да слезина није у стању да сама контролише инфекцију са *T. equi* у одсуству специфичног имунског одговора, и да еритролиза изазвана *T. equi* не захтева специфичан имунски одговор. Висок титар антитела је значајан за контролу инфекције код коња (Kuttler и сар., 1986). Специфична антитела се први пут могу детектовати 7 до 11 дана након експерименталне инфекције, док максимум достижу 30 до 45 дана након инфекције (Kuttler и сар., 1986). Коњи инфицирани са *T. equi* стварају антитела против високо конзервисаних протеина површине мерозоиота, посебно на *T. equi* мерозоит антигене 1 и 2 (ЕМА-1 и ЕМА-2) (Tenter и Friedhoff, 1986; Knowles и сар., 1991; Knowles и сар., 1992). Пасивно пренешена антитела против *T. equi* и *B. caballi* могу опстати код ждребади и 4 до 5 месеци (Donnelly и сар., 1982). Међутим, ждребад рођена од стране серопозитивних кобила могу бити рођена

инфицирана, без клиничких симптома болести и могу остати серопозитивна за живота. Код ждребади из ендемских подручја обично не долази до клиничких манифестација обољења (Heuchert и сар., 1999). Упркос снажном хуморалном имунском одговору, *in vivo* и *in vitro* студије са серумом преболелих животиња нису успеле да докажу потпуни заштитни ефекат антитела, што нам указује да су и само антитела недовољна за потпуну заштиту од пироплазмозе коња (Donnelly и сар., 1982). Узимајући у обзир значај ћелијског имунског одговора у одбрани од других протозоалних паразита, попут *Theileria parva* и *Babesia bovis*, очекује се да ћелијски имунски одговор игра кључну улогу у заштити од *T. equi* и *B. caballi* (Banerjee и сар., 1977; Knowles и сар., 1994; Hall и сар., 2002). Код других животињских врста су утврђени механизми заштите против паразита из рода *Babesia*. На пример, интерферон γ (IFN- γ), кога стварају CD4+ helper T лимфоцити, активира макрофаге, побољшава фагоцитозу и индукује стварање антитела (Casteel и Turk, 2002). Само површне информације су доступне о доприносу ћелијског имунитета у контроли пироплазмозе копитара (Holman и сар., 1993; Hall и сар., 2002). Магарци имунизовани са *T. equi* имуногеном развијају изузетно јак хуморални и ћелијски одговор (Banerjee и сар., 1977).

2.4. Клиничка манифестација обољења

Обољење може бити присутно код коња и супклинички, али може бити праћено и тешком клиничком сликом. Неки од најчешћих симптома пироплазмозе су: грозница, анемија, губитак апетита, жутица, хемоглобинурија и брже замарање током рада. У појединим случајевима може доћи и до наглих угинућа, у зависности од самог узрочника, здравственог стања јединке и предузетог лечења (de Waal и van Heerden, 1994). Инфициране животиње могу остати носиоци ових крвних паразита

годинама, а у појединим случајевима и до краја живота (Knowles, 1996; Ruegg и сар., 2006). Велики број фактора утиче на ширење ове болести, попут унутрашњег и међународног транспорта инфицираних коња и промене климе која омогућава ширење крпеља на нове просторе.

Пироплазмоза коња се клинички може манифестовати у различитим облицима. Код акутне инфекције са *T. equi*, клинички знаци обично настају услед озбиљне хемоллизе и секундарне анемије. Иако до анемије долази и услед инфекције са *B. caballi*, ретки случајеви угинућа настају услед вишеструке дисфункције органа као последица системског формирања микротромба или развоја дисеминоване интраваскуларне коагулације (Donnellan и Marais, 2009). У тим случајевима, клинички знаци се разликују у зависности од погођеног система органа. Коњи са акутном инфекцијом на почетку развијају неспецифичне знаке као што су висока телесна температура, летаргија, анорексија, губитак телесне масе и појава периферних едема (Maurer, 1962). Као последица тромбоцитопеније долази до појаве петехија (de Waal, 1992). Услед хемолитичке анемије долази до појаве бледих или иктеричних слузница, тахикардије, тахипнеје, слабости организма и пигментурије (Ambawat и сар., 1999; Zobba и сар., 2008). Неки коњи показују знаке гастроинтестиналних компликација, укључујући и колике или импакције праћене дијарејом. У ретким случајевима може доћи до развоја пнеумоније, едема плућа, срчаних аритмија, катаралних ентеритиса, ламинитиса и поремећаја централног нервног система (Taylor и сар., 1969; de Waal и van Heerden, 2004; Zobba и сар., 2008; Diana и сар., 2007). Код пастува може доћи до појаве привремене или трајне неплодности (Donnellan и Marais, 2009). Акутна бубрежна инсуфицијенција може настати услед хемоглобином индукване нефропатије и системског одговора на озбиљну упалу, који доводи до хипотензије која додатно погоршава стање (de Waal, 1992). Озбиљне инфекције могу довести и до отказивања јетре и дисеминоване интраваскуларне коагулације (Donnellan и Marais, 2009). Документован је и перакутан развој болести. Колапс и

изненадно угинуће обично настају у случају увоза коња у ендемска подручја (искључиво кад се ради о коњима који никада пре нису били у контакту са узрочницима пироплазмозе). Код ждребади инфицираних трансплацентарно, може доћи до појаве акутних и озбиљних симптома болести (Purchase, 1947; Erbsloh, 1975; Silvey, 1996; Butler и сар., 2005; Al-Saad, 2009; Georges и сар., 2011; Chhabra и сар., 2012). Заражена ждребад могу показивати клиничке знаке болести још на рођењу, а могу се и разболети 2-3 дана након рођења. Клинички знаци су обично неспецифични, попут слабости и смањеног сисања, а временом долази до појаве истих симптома као код старијих јединки (иктерус, висока температура, анемија, петехије, хемоглобинурија). Фетални и неонатални случајеви инфекције са *B. caballi* су јако ретки (Purchase, 1947; Neitz, 1956). Код хроничних инфекција долази до појаве неспецифичних симптома, попут летаргије, анорексије, губитка телесне масе и слабог толерисања физичког напора. Долази до појаве благе анемије и ректалним прегледом се може приметити увећање слезине. До увећања слезине долази услед повећања екстраваскуларне хемоллизе (Allen и сар., 1975; de Waal, 1992; Friedhoff и Soule, 1996).

Резултати лабораторијских анализа могу бити од користи у постављању дијагнозе. Без обзира на клиничке симптоме, код већине коња долази до појаве анемије која се карактерише смањењем хематокрита, хемоглобина и укупног броја еритроцита. У акутном току може доћи до пада хематокрита и на 10%, иако ретко пада испод 20% (Allen и сар., 1975; de Waal и сар., 1987; Zobba и сар., 2008). Хематолошки индекси (MCV, MCH и MCHC) су променљиви (Ambawat и сар., 1999). Најчешћа промена у крвној слици коња је тромбоцитопенија (Allen и сар., 1975; de Waal и сар., 1987; de Waal, 1992; Zobba и сар., 2008). У литератури се може наћи податак да до смањења тромбоцита код инфекције са *T. equi* долази у 39% случајева, код инфекције са *B. caballi* у 80%, а у 100% случајева код мешовите инфекције (de Waal и сар., 1987; Camacho и сар., 2005; Zobba и сар., 2008). Фактори коагулације могу бити нормални или продужени. Леукограм се

може разликовати у зависности од степена и озбиљности инфекције (Rudolph и сар., 1975). Концентрација фибриногена може бити повећана, док концентрација албумина зависи пре свега од хидратације организма, хроничитета обољења, као и пратећих стања која доводе до губитка протеина (Allen и сар., 1975). Обично долази до појаве хипербилирубинемije и повећања ензима јетре (ALP, AST и GGT) (Zobba и сар., 2008). До повећања активности јетриних ензима може доћи услед смањеног дотока крви у јетру, што у озбиљним случајевима доводи до централобуларне некрозе. Услед промењеног метаболизма еритроцита долази до појаве хипофосфатемije и хипоферемije (Frerich и Holbrook, 1974). У аспиратима костне сржи из грудне кости асимптоматских коња могу се наћи инфицирани еритроцити, мада ова метода нема велики дијагностички значај (Pitel и сар., 2010). Промене које се могу уочити на обдукцији варирају у зависности од тежине болести и евентуалних компликација. Макроскопским прегледом се могу установити промене попут анемије, иктеруса, едема и спленомегалије. Могу бити присутне и следеће промене: конгестија и едем плућа, хеморагије на срцу, хидроперикардијум, хидроторакс, хепатомегалија, асцитес, увећани бубрези промењене боје и грађе и лимфаденопатије (de Waal, 1992). Хистопатолошки се могу уочити централобуларне некрозе јетре, тубуларна некроза бубрега и микротромбозе јетре и плућа (de Waal и van Heerden, 2004). Паразити се могу уочити у еритроцитима у крвним судовима, као и у макрофагима у лимфним чворовима (Taylor и сар., 1969; Mahoney и сар., 1977; de Waal, 1992). Постоје озбиљне разлике у тежини клиничке слике и начина манифестације обољења. Инфекције са *T. equi* у јужној Африци обично доводе до озбиљне клиничке слике и захтевају лечење (de Waal и van Heerden, 2004; Viljoen и сар., 2009). Насупрот томе, у избијању инфекције у САД, када је заражено 475 коња, само код једног коња се манифестовала озбиљнија клиничка слика (Ueti и сар., 2012). Веома је тешко упоређивати клиничке случајеве из различитих земаља, с обзиром да

не знамо о којим сојевима *T. equi* се ради, али свакако да нам сви ти радови пружају информације о разликама између ендемских и неендемских простора.

2.5. Начини дијагностике пироплазмозе коња

Годинама је пироплазмоза коња дијагностикована микроскопским прегледом обојених крвних размаза. Иако је ово једноставна метода, није довољно осетљива у случајевима ниске паразитемије и не омогућава дијагностику мешовитих инфекција (Quintao-Silva и Ribeiro, 2003; Krause, 2003). Постоје и серолошки тестови за дијагностику пироплазмозе коња, попут индиректне имунофлуоресценције, реакције везивања комплемента, имунохроматографије и имуно-ензимске методе (Kim и сар., 2008). Међутим, ограничења ових метода се огледају у границама детекције антитела и могућој унакрсној реактивности (Brüning и сар., 1997; Kappmeyer и сар., 1999; Allred, 2003).

Ланчана реакција полимеризације (*Polymerase chain reaction* - PCR) је метода која омогућава осетљиву, специфичну и поуздану детекцију протозоалних паразита (Stevanovic и сар., 2013; Davitkov и сар., 2015) и међу њима паразита из родова *Babesia* и *Theileria* (Nagore и сар., 2004; Alhassan и сар., 2005; Davitkov и сар., 2016; Davitkov и сар., 2017). PCR метода је толико осетљива да се може детектовати паразитска ДНК из 2,5 μ l крви при паразитемији од 0,000001% (Xuan и сар., 2001; Alhassan и сар., 2007).

Молекуларне методе детекције које се користе за специфичну детекцију врсте узрочника углавном су засноване на умножавању сегмента 18S rRNK гена (Criado-Fornelio и сар., 2003). До првих резултата се дошло употребом класичне PCR методе, а након тога је дошло до увођења и нових метода: *nested* PCR (Rampersad и сар., 2003), *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) (Alhassan и сар., 2007), *Reverse Line Blot* метода (RLB) и мултишлекс PCR метода за истовремену детекцију и идентификацију

Theileria и *Babesia* врста код коња (Alhassan и сар., 2005). Очитавање генома *T. equi* пружа нове могућности за побољшавање и усавршавање тренутно постојећих метода молекуларне детекције, као и евентуално увођење неких нових метода (Каррмеуер и сар., 2012).

2.6. Оксидативни стрес

Оксидативни стрес представља комплексан патофизиолошки механизам, који се односи на нарушен хомеостатски оксидативно-редуктивни статус ћелије са потенцијално далекосежним последицама. Као последице те нарушене равнотеже настају оксидативна оштећења као што су оксидативна модификација ћелијских макромолекула, апоптоза или некроза ћелија и структурална оштећења ткива.

2.6.1. Оксиданси и оксидативно оштећење макромолекула

Хемијски посматрано, оксиданси представљају једињења која су у стању да изврше оксидацију циљаних молекула. То могу учинити на један од три начина: одузимањем водониковог атома, одузимањем електрона или додавањем кисеоника. У зависности од хемијске структуре и реактивности, оксиданси се могу поделити у различите групе. Једна широко распрострањена класификација се управо заснива на томе да ли су оксиданси слободни радикали или не, односно да ли садрже неспарен електрон у спољашњој орбитали што их чини јако нестабилним. У групу слободних радикала спадају хидроксил радикал (HO[•]), азот моноксид (NO[•]) и супероксид анјон радикал (O₂^{•-}). Поједина једињења могу бити јако реактивна, а да се уопште не ради о радикалима. Примери таквих нерадикалских оксиданаса су пероксинитрит, водоник-пероксид и хипохлораста киселина.

Међутим, пошто оштећења могу изазвати и радикали и не-радикали, класификација која се води само овим принципом и нема неки велики биолошки смисао. Другачију и слободно можемо рећи релевантнију класификацију оксиданаса и антиоксиданаса предложио је Buettner 1993. године. Он је поделио оксидансе на основу њиховог редукционог потенцијала, који је уско повезан са њиховом биолошком реактивношћу и самим тим могућношћу да доведу до оштећења. По овој класификацији хидроксил радикал се наводи као најреактивнија позната кисеонична врста.

Све ћелије које живе у аеробним условима средине су константно изложене великом броју оксиданаса пореклом од различитих ендогених и егзогених извора (Halliwell и Gutteridge, 1999). Осим тога што оксиданси могу довести до оксидативног оштећења, они су и ендогени, сигнални молекули који су укључени у контролу јако битних каскадних реакција, попут апоптозе и инфламације. Самим тим, повећање оксиданаса, односно оксидативни стрес, не мора да по аутоматизму представља оксидативно оштећење ћелија и ткива. Само један од примера је рецимо азот-оксид, који игра јако важну улогу у функционисању васкуларног система, као медијатор вазодилатације. Због свега наведеног је јако тешко тумачити резултате који се базирају само на маркерима оксидативног стреса, без корелације са евентуалним оксидативним оштећењима.

Постоји неколико ендогених извора оксиданаса у организму. Респираторни ланац у митохондријама, који врши конверзију молекуларног кисеоника у воду, је један од њих. Мали проценат молекула кисеоника константно „цури“ из ланца током транспорта електрона као реактивне кисеоничне врсте (ROS), доводећи до стварања значајног, базалног нивоа оксиданаса *in vivo*. Додатно, имунске реакције могу допринети значајном стварању оксиданаса, поготово током инфекција или као резултат аутоимунског одговора. На пример, активирани неутрофили

стварају ROS са циљем да се изборе са страним патогеном, али због мањка специфичности у тим реакцијама неретко долази до оштећења ткива домаћина. Ензими попут ксантин-оксидазе и азот-оксид синтазе стварају $O_2^{\cdot -}$ и NO^{\cdot} ; а ови слободни радикали накнадном интеракцијом могу створити опасне азотове врсте као што је пероксинитрит ($ONOO^-$). У *in vitro* условима је несумњиво потврђено да слободни радикали могу настати и у реакцијама оксидације посредоване прелазним металима (Cu, Fe), иако је мало вероватно да ове реакције играју значајну улогу у стварању оксиданаса *in vivo* (Chen и сар., 2000).

Различити егзогени извори ROS такође утичу директно или индиректно на тотално оксидационо оптерећење. У егзогене изворе спадају јонизујуће и нејонизујуће зрачење, загађење ваздуха, хемикалије и токсини (укључујући дезинфекционе супстанце) и природни токсични агенси, попут озона. Штавише, страни микроорганизми индукују секундарно формирање оксиданаса код домаћина услед активације имунског одговора организма. Неадекватна исхрана, са неадекватном количином есенцијалних хранљивих материја, може такође индиректно довести до оксидативног стреса.

Превелика продукција ROS може индуковати оксидативне модификације ћелијских макромолекула као што су липиди, протеини и ДНК (Trachootham и сар., 2008). ROS доводе до липидне пероксидације ћелијских мембрана и њиховог прогресивног оштећења, што за резултат има и губитак њиховог својства селективне пропустљивости. Оксидативно оштећење протеина за последицу има губитак њихове биохемијске функције, док услед оштећења ДНК може доћи до настанка мутација, грешака приликом репликација, нестабилности генома и ћелијске смрти (Klaunig и сар., 2010; Радаковић и сар., 2013). Стога, процена оштећења ДНК може бити индиректан маркер за процену оксидативног стреса.

2.6.2. Механизми одбране од оксидативног стреса

Због значајног и неминовног излагања оксидансима, аеробни организми су се прилагодили да се константно боре против оксидативног стреса. Напредни и усавршени механизми ћелијске одбране су допринели продужењу живота многих врста. Ћелијски механизми одбране се могу поделити на најмање три нивоа заштите: поправка оксидативних оштећења, уклањање оксидативног оштећења и инкапсулација непоправљивих оштећења.

Као први ниво одбране против оксиданаса, ћелија је опремљена са такозваном антиоксидативном мрежом. Антиоксиданси су способни да дају електроне оксидансима, на тај начин пониште њихову реактивност под контролисаним условима, и учине их безопасним за ћелијске макромолекуле. Антиоксиданси тиме постају радикали, али они су далеко стабилнији и нису у стању да изазову ћелијско оштећење. Оксидовани антиоксиданси се накнадно враћају у њихово активно, редуковано стање неким од бројних, ефикасних ћелијских механизма уз потрошњу ћелијске енергије. Ова могућност рециклирања, односно повратка антиоксиданаса у редуковано стање, представља најзначајнију карику у функционисању антиоксидативне мреже (Lykkesfeldt и сар., 2003). Антиоксидативна мрежа се може поделити у две примарне групе антиоксиданаса и то на антиоксидансе мале молекулске масе и на антиоксидансе велике молекулске масе (односно ензиме). У антиоксидансе мале молекулске масе стадају витамин Ц, витамин Е и глутатион (GSH). Ензимских антиоксиданаса је неколико и они имају јасно дефинисане улоге у ћелијама, попут ензима: супероксид дисмутаза, каталаза, GSH пероксидаза.

Други изузетно значајни ниво одбране ћелија је могућност детекције и поправке, или на крају крајева и уклањања, оксидованих и оштећених молекула. У овај сегмент одбране је укључен велики број ензима који

поправљају ДНК, уклањају оксидоване и оштећене базе и убацују неоштећене базе у ДНК ланац. Обим ове активности је огроман. Процењује се да је ДНК сваке живе ћелије подвргнут на 10 000 до 100 000 оксидативних модификација дневно, при чему се 99,99% њих санира ензимском активношћу. У други ниво одбране спада и катаболизам нефункционалних или промењених протеина и липида.

Коначно, уколико степен оксидативног оштећења прелази капацитет поправке и уклањања оштећења, организам је опремљен и задњим механизмом одбране, а то је контролисана ћелијска смрт или апоптоза (Рауне и сар., 1995). Способност индукције програмиране ћелијске смрти је од великог значаја у различитим телесним функцијама, укључујући и контролу раста ткива, и под контролом је неколико сигналних путева. Сматра се да један од тих путева активира управо повећање оксидативног стреса (Рауне и сар., 1995).

2.6.3. Оксидативни стрес и обољења коња

Када говоримо о медицини коња, нажалост у јако малом броју стања и патолошких процеса је на прави начин испитан утицај оксидативног стреса на настанак оштећења организма. У области ургентне медицине коња истраживања су усмерена на исхемичне и реперфузијске повреде дигестивног тракта. Највећи број публикација постоји о утицају оксидативног стреса код опструкција дисајних путева, као и код интензивног тренинга, односно оптерећења коња. Утицај оксидативног стреса је описан и код различитих остеоартритиса, болести моторних неурона, дисфункције хипофизе и ендометритиса (McFarlane и сар., 2005; Yin и сар., 2009). У истраживањима су коришћени коњи са детектованим патолошким процесом, али исто тако и експерименталне животиње, да би се проценила улога оксидативног оштећења у датом процесу, као и потенцијална употреба антиоксидативне терапије. С обзиром да се ради о

релативно младој области истраживања, постоје бројне и брзо развијајуће методологије за процену оксидативног стреса. Свака од њих има своје предности и мане. Разлике у моделима и методологијама отежавају упоређивање добијених резултата, чак и код студија које површно изгледају јако слично.

Сматра се да су паразитске болести извор оксидативног стреса, с обзиром да се ROS стварају као одговор на напад патогена (Dimitrijević и сар., 2012; Esmailnejad и сар., 2014). Услед повећане продукције ROS код домаћина долази до активирања протективних механизма у које спада и антиоксидативна одбрана. У случајевима када реактивне кисеоничне врсте „надвладају” механизме антиоксидативне заштите, настаје стање које се назива оксидативни стрес. У неколико истраживања је доказано повећање параметара оксидативног стреса и смањење нивоа антиоксиданата код преживара са бабезиозом (Saleh, 2009; Esmailnejad и сар., 2014; Kucukkurt и сар., 2014). Међутим, јако је мало података о утицају пироплазмозе у индукцији оксидативног стреса код коња.

2.7. Детекција генотоксичних ефеката Комет тестом

Комет тест (тест електрофорезе појединачних ћелија, енгл. *the Comet assay – single cell gel electrophoresis*) је економична, брза и једноставна метода којом се детектују оштећења ДНК у појединачним ћелијама. Ostling и Johanson су 1984. године развили ову микрогел електрофоретску технику, а 1988. године Singh и сарадници су модификовали овај тест увођењем алкалних услова током електрофорезе. Код последње верзије теста могуће је детектовати једноланчане прекиде, апуринска места, некомплетна места поправке, ДНК-протеин и ДНК-ДНК укрштене везе (енгл. *crosslinks*) у било којем типу ћелија од које се може добити ћелијска суспензија. Основни принцип Комет теста је откривање оштећења ДНК ћелија праћењем миграције исте у агарозном гелу. Ћелије се уносе у агарозу ниске тачке

топљења (енгл. *Low Melting Point Agarose, LMPA*) и наносе на предметна стакла на којима се налази већ осушен слој агарозе који омогућује бољу адхезију. Обично се преко тога додаје још један слој агарозе, да би се након тога приступило лизирању у циљу дезинтеграције ћелијских мембрана како би се уклонили ћелијски и једарни протеини. У алкалној верзији Комет теста, третманом са базама (обично 10 М NaOH), при веома високом рН (рН > 13) долази до денатурације ДНК (енгл. *DNA unwinding*). Након тога, под утицајем електричног поља фрагменти ДНК мигрирају према аноди формирајући реп комете. Количина ДНК у репу пропорционална је степену ДНК оштећења – што је више ДНК у репу утолико је степен оштећења израженији. Након електрофорезе узорци се третирају неутралишућим пуфером како би се снизио рН и тиме избегло ометање приликом бојења са етидијум бромидом или неком другом флуоресцентном бојом са високим афинитетом према молекулу ДНК (нпр. *sybergreen*).

У поређењу са другим генотоксичним тестовима предности ове методе су: висока сензитивност у откривању ниског степена оштећења ДНК; могућност откривања генотоксичности у одсуству митотичке активности; захтева мали број ћелија по узорку; флексибилност; једноставна примена и релативно кратак период је потребан да би се обавио експеримент. Последњих двадесетак година Комет тест је постала једна од основних метода коју користе истраживачи у широком спектру научних поља укључујући генетичку токсикологију, екогенотоксикологију, проучавања поправке ДНК и хуманог биомониторинга (Rojas и сар., 1999; Cotelle и Ferard 1999; Albertini и сар., 2000; Collins и Harrington, 2002; Marcon и сар., 2003; Andersson и сар., 2003; Moller, 2005).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ овог рада је спровођење клиничко-епизоотиолошког испитивања пироплазмозе коња на простору централног Балкана уз помоћ метода детекције и анализе ДНК.

До постављеног циља долази се реализацијом следећих задатака:

1. Формирати репрезентативан узорак већег броја коња са различитих локалитета на простору Србије, Црне Горе и Босне и Херцеговине;
2. Узорковати крв за одређивање крвне слике и биохемијских параметара, за PCR анализе, за параметре оксидативног стреса, као и Комет тест;
3. Извести хематолошке и биохемијске анализе;
4. Извести PCR и мултиплекс PCR амплификације;
5. Визуелизовати PCR продукте путем електрофорезе на агарозном гелу и одредити узрочника пироплазмозе коња;
6. Потврдити тачност молекуларне методе детекције узрочника секвенцирањем амплификата;
7. Формирати две групе јединки (позитивну и контролну групу) за одређивање параметара оксидативног стреса и Комет тест;
8. Одредити параметре оксидативног стреса;
9. Урадити Комет тест за сва грла из обе групе;
10. Статистички обработити податке.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

Узорци крви коња су прикупљани у периоду септембар 2013. године – фебруар 2016. године. Узорковање крви коња је обављено венепункцијом *v. jugularis*. Крв је узоркована у стерилне епрувете са EDTA као антикоагулансом за крвну слику и PCR анализе, као и у епрувете за брзо издвајање серума за одређивање биохемијских параметара. За параметре оксидативног стреса и Комет тест крв је узоркована у епрувете са литијум-хепарином. Током узорковања водило се рачуна да животиње што мање буду изложене стресу. Обезбеђено је мишљење Етичке комисије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду за извођење ове докторске дисертације, на основу којег је добијено решење Министарства пољопривреде и заштите животне средине бр. 323-07-05566/2015-05/2. Узорци потичу од 165 асимптоматских коња са 8 локалитета са простора три државе (Слика 1): Србија (5 локалитета, 117 узорака), Црна Гора (2 локалитета, 24 узорка) и Босна и Херцеговина (1 локалитет, 24 узорка). Сви неопходни подаци о коњима су прикупљени приликом узорковања и коњи су подељени у одређене статистичке групе на основу могућих фактора ризика за испитивано обољење (старост, пол, локација, намена животиња). Након што је испитано присуство узрочника пироплазмозе коња код свих 165 јединки молекуларним методама, извршен је одабир 60 јединки за испитивање параметара оксидативног стреса и Комет тест. Формиране су две групе од по 30 коња (у првој групи су били коњи код којих је детектована *T. equi*, док је друга група била контролна група).

Експеримент је обављен у Лабораторији за генетику животиња, на Катедри за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, у оквиру пројекта „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране” (Ев. бр. 46002, руководилац проф. др Зоран Станимировић), на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи и у Лабораторији за хемију Катедре за општеобразовне предмете Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.



Слика 1. Мапа централног Балкана, црне тачке представљају локалитете са којих су прикупљени узорци

4.2. Методе

4.2.1. Хематолошке и биохемијске анализе

Комплетна крвна слика је рађена на апарату „Abacus Junior Vet“ (Diatron, Austria), док су биохемијски параметри одређивани на апарату „Vet Evolution“ (BS International, Italy). Следећи хематолошки параметри су анализирани: број белих крвних зрнаца (WBC), број лимфоцита (LIM), укупан број моноцита, базофила, еозинофила и прекурсора леукоцита (MID), број гранулоцита (GRA), број црвених крвних зрнаца (RBC), концентрација хемоглобина (HGB), вредност хематокрита (HCT), просечни ћелијски волумен (MCV), средња вредност концентрације хемоглобина по еритроцити (MCH), средња вредност концентрације хемоглобина по запремини еритроцита (MCHC) и број крвних плочица (PLT). Одређивали смо следеће биохемијске параметре: укупне протеине, албумине, глобулине, уреу, креатинин, глукозу, аспартат аминотрансферазу, алкалну фосфатазу, гама-глутамил трансферазу, лактат-дехидрогеназу, креатин киназу, билирубин и ниво гвожђа.

4.2.2. Изолација ДНК из крви

Изолација ДНК из крви вршена је помоћу комерцијалног сета „GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit“ (Cat. No K0782, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) по прилагођеном протоколу произвођача.

Протокол за изолацију ДНК из крви помоћу сета „GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit “ укључивао је следеће кораке:

1. У епрувету запремине 1,5 ml пипетира се 200 μ l некоагулисане крви и 20 μ l протеиназе К;

2. Затим се додаје 200 μl *Lysis* пуфера. Следи мешање од 5 секунди на vortex-у и инкубација у воденом купатилу у трајању од 10 минута на температури од 56 °C, уз повремено мешање;
3. Епрувета је вортексована 15 секунди, затим је у њу додато 200 μl етанола, при чему је уследило мешање на vortex-у, како би се хомогенизовао раствор;
4. Садржај епрувете је пребачен у *spin* колону смештену у сабирној епрувети запремине 2 ml и филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 6\ 000 \times g$ (8 000 rpm). Након центрифугирања одбачени су филтрат и сабирна епрувета;
Кораци 3. и 4. имају за циљ селективно везивање ДНК за DNeasy мембрану при чему филтрат пролази кроз мембрану за време центрифугирања.
5. *Spin* колона је премештена у нову сабирну епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μl пуфера за испирање (*Wash Buffer I*) и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 1 минут на $\geq 8\ 000 \times g$ (10 000 rpm), након чега су одбачени филтрат и сабирна епрувета;
6. *Spin* колона је премештена у нову сабирну епрувету запремине 2 ml, у колону је додато 500 μl пуфера за испирање (*Wash Buffer II*) и садржај епрувете је филтриран центрифугирањем 3 минута на $20\ 000 \times g$ (13 000 rpm), након чега су одбачени филтрат и сабирна епрувета;
Кораци 5. и 6. имају за циљ испирање силико мембране чиме се уклањају преостали контаминанти и ензимски инхибитори.
7. *Spin* колона је премештена у чисту епрувету запремине 1,5 ml, а затим је пипетирано 200 μl пуфера *Elution Buffer* директно на мембрану колоне. Садржај епрувете је инкубиран на собној

температури 1 минут, а затим центрифугиран 1 минут на $\geq 8\ 000$ x g (10 000 rpm);

Циљ овог корака је спирање ДНК са мембране колоне.

8. *Spin* колона је одбачена, а елуат у епрувети запремине 1,5 ml садржао је изоловану ДНК која је чувана на $-20\ ^\circ\text{C}$ до употребе у PCR реакцији.

4.2.3. PCR реакције

Да би испитали евентуално присуство било које врсте родова *Theileria* и *Babesia* урађене су PCR реакције са прајмерима Piro-A1 (Muhn timer и сар., 2002) и Piro-B (Olmeda и сар. 1997), који су дизајнирани да амплификују специфични фрагмент 18S-rRNK гена величине око 450 бп. Све позитивне узорке смо након тога користили у реакцијама мултиплекс PCR да би утврдили о којој се тачно врсти ради. У реакцији мултиплекс PCR коришћени су следећи прајмери: Вес-UF2 као универзални forward прајмер и Cab-R и Equi-R као reverse прајмери специфични за *B. caballi* и *T. equi*, респективно (Alhassan и сар., 2005). Сви коришћени прајмери су дати у Табели 1.

Табела 1. Листа коришћених прајмера за PCR реакције у нашем раду

Прајмери	Секвенце	Температура хибридизације	Референце
Piro-A1	5'-AGGGAGCCTGAGAGACGGCTACC-3'	62	Muhnickel и сар., 2002
Piro-B	5'-ТТАААТАСГААТГСССССААС-3'	62	Olmeda и сар., 1997
Вес-UF2	5'-TCGAAGACGATCAGATACCGTCG-3'	58	Alhassan и сар., 2005
Equi-R	5'-TGCCTTAAACTTCCTTGCGAT-3'	58	Alhassan и сар., 2005
Cab-R	5'-СТСГТТСАТГАТТТАГААТТГСТ-3'	58	Alhassan и сар., 2005

PCR реакциона смеша припремљена је коришћењем комерцијалног сета КАРА2G Robust HotStart ReadyMix према модификованим упутствима произвођача. Реакциона смеша запремине 25 μ l је садржала: 12,5 μ l КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X), 1,25 μ l сваког прајмера и 10 μ l изоловане ДНК. Реакција ланчане полимеризације се одвијала у PCR апарату MultiGene Gradient (Labnet International Inc., USA) по програму:

- 1) Почетна денатурација на 95 °C током 3 минута;
- 2) Денатурација на 95 °C током 15 секунди;
- 3) Хибридизација на 62 °C током 15 секунди;
- 4) ДНК екстензија на 72 °C током 15 секунди;

Кораци 2, 3 и 4 поновљени су 34 пута (укупно 35 циклуса).

- 5) Финална екстензија ДНК на 72 °C током 8 минута.

Готово идентичан протокол је коришћен и за мултиплекс реакције, са изузетком температуре везивања прајмера која је износила 58 °C. КАРА2G Robust HotStart ReadyMix (2X) садржи КАРА2G Robust HotStart ДНК полимеразу у одговарајућем реакционом пуферу, сва четири dNTP-а (0,2 mM сваког dNTP-а, 1X), MgCl₂ (2 mM, 1X) и стабилизаторе.

4.2.4. Електрофореза и визуелизација РСР продуката

Продукти РСР амплификације су раздвојени електрофорезом на агарозном гелу. Двопроцентни агарозни гел је припремљен растварањем 0,8 g агарозе (Serva – Agarose Serva for DNA Electrophoresis Analytical Grade, Germany) у 40 ml 1x TBE пуфера (Tris-borat, EDTA). Агароза се загрева у TBE пуферу 90 секунди на 450 W (у микроталасној пећници Whirlpool модел M 541) и затим хлади уз мешање на магнетној мешалици (VELP scientifica – ARE Heating magnetic stirrer, VEP scientifica, Italy) до температуре прихватљиве за хватање посуде руком. Следи разливање гела у кадицу за електрофорезу у коју је претходно постављен чешаљ за формирање базенчића у гелу и хлађење током десетак минута на собној температури.

По очвршћавању гела у сваки бунарчић је нанешена смеша 2,5 μ l РСР продукта и 1 μ l боје 6 x Loading Dye Solution (Fermentas) направљена на парафилму. У граничне бунарчиће је нанешено 2 μ l масеног маркера (O'RangeRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas, USA) који је такође претходно помешан на парафилму са 1 μ l боје. Гел је преливан са 50 ml 1x TBE пуфера. Електрофореза се одвијала при струји јачине 50 mA и напону од 50 V у трајању од 45 минута (Carl ROTH N817.1 minieasy Electrophoresis Unit, Carl Roth, Germany). Као негативна контрола је коришћена инјекциона вода, док су као позитивне контроле коришћени претходно потврђени позитивни узорци *T. equi* и *B. caballi*.

За визуелизацију молекула ДНК у гелу коришћен је етидијум бромид који се интеркалира између ланаца ДНК молекула и флуоресцира под UV светлом. Визуелизација молекула ДНК у агарозном гелу омогућена је бојењем гела након електрофорезе у раствору 20 μ l етидијум бромид у 200 ml дестиловане воде, током 15 минута. Обезбојавање гела је вршено дестилованом водом током 10 минута и након тога гел је постављен под UV светло трансилуминатора (Vilber Lourmat – ETX-20.C 254 nm, Vilber Lourmat,

France) и фотографисан како би се добио трајни запис резултата електрофоретске анализе.

4.2.5. Секвенцирање пурификованих секвенци

Да би потврдили добијене PCR резултате извршено је секвенцирање амплификата. За секвенцирање пурификованих секвенци коришћена је комерцијална услуга фирме MacroGen Inc. (MacroGen Europe, The Netherlands). Секвенцирање је вршено у оба смера у аутоматском секвенцеру типа ABI 3730XL (Applied Biosystems, USA) коришћењем претходно наведених прајмера за мултиплекс PCR. Све добијене секвенце узрочника пироплазмозе коња поређене су са одговарајућим појединачним секвенцама претраживањем GenBank базе података уз помоћ BLAST опције. За обраду и анализу добијених секвенци коришћени су софтвери BioEdit верзија 7.2.5 и Clustal W.

4.2.6. Одређивање показатеља оксидативног стреса

Активност Cu,Zn-супероксид дисмутазе у еритроцитима одређивана је спектрофотометријски коришћењем адреналина као супстрата (Misra и Fridovich, 1972). Активност изоензимских облика Cu,Zn-супероксид дисмутазе је одређивана вертикалном електрофорезом на 10% полиакриламидном гелу, оксидацијом нитротетразолијумског плавог („Hofer® miniVE Vertical Electrophoresis System”, Amersham Pharmacia Biotech) (Beauchamp и Fridovich, 1971). Релативна активност сваког изоензима је процењивана уз помоћ Scion Image софтвера, верзија бета 4.0.2 (Scion Corporation, 2000) и изражавана у јединици U/g Hb.

Одређивање осмотске резистенције еритроцита је рађено по методи коју је описао Beutler (1983). Степен хемоллизе сваког узорка је изражаван као проценат апсорбанције NaCl, који је мерен на 540 nm. На основу вредности

степен хемоллизе узорака у серијским разблажењима NaCl исцртана је крива кумулативне осмотске фрагилности (Luzzatto и Roper, 1995), уз помоћ програма Origin 6.0 Professional.

Активност каталазе је одређивана применом UV-кинетичке методе, уз присуство H₂O₂, на спектрофотометру (CECIL CE 2021 UV/VIS) по методи Aebi (1984). Разлагање H₂O₂ је процењено праћењем смањења апсорбанције на 240 nm. Активност је изражена у јединици U/g Hb.

Активност параоксоназе у плазми је одређивана користећи синтетски параоксон (Sigma-Aldrich) као супстрат. Брзина реакције је праћена кинетички на 412 nm, што је максимум апсорбанције п-нитрофеноксидног анјона, у који прелази п-нитрофенол у базним условима реакције (Alapati и Mihas, 1999).

Концентрација нитрита, као и концентрација укупних нитрата и нитрита, је одређивана у реакцији са Griess-овим реагенсом (Miranda и сар., 2001), уз читање на ELISA читачу на 540 nm (Plate reader, Mod. A1, Nubenco Enterprises, ICN).

Концентрација малондиалдехида је одређивана спектрофотометријски (CECIL CE 2021 UV/VIS), у реакцији са тиобарбитурном киселином (Traverso и сар., 2004).

Одређивање концентрације слободних тиолних група је извршено у реакцији са Елмановим реагенсом, спектрофотометријски, на 412 nm (CECIL CE 2021 UV/VIS), по модификованој методи Ellman (1959).

Изоензимски облици лактат-дехидрогеназе су одређивани вертикалном електрофорезом на полиакриламидном гелу, уз примену Трис-глицинског пуфера (Yoshida и Takakuwa, 1997). Одређивана је и концентрације хемоглобина у еритроцитима и плазми (Tentori и Salvati, 1981).

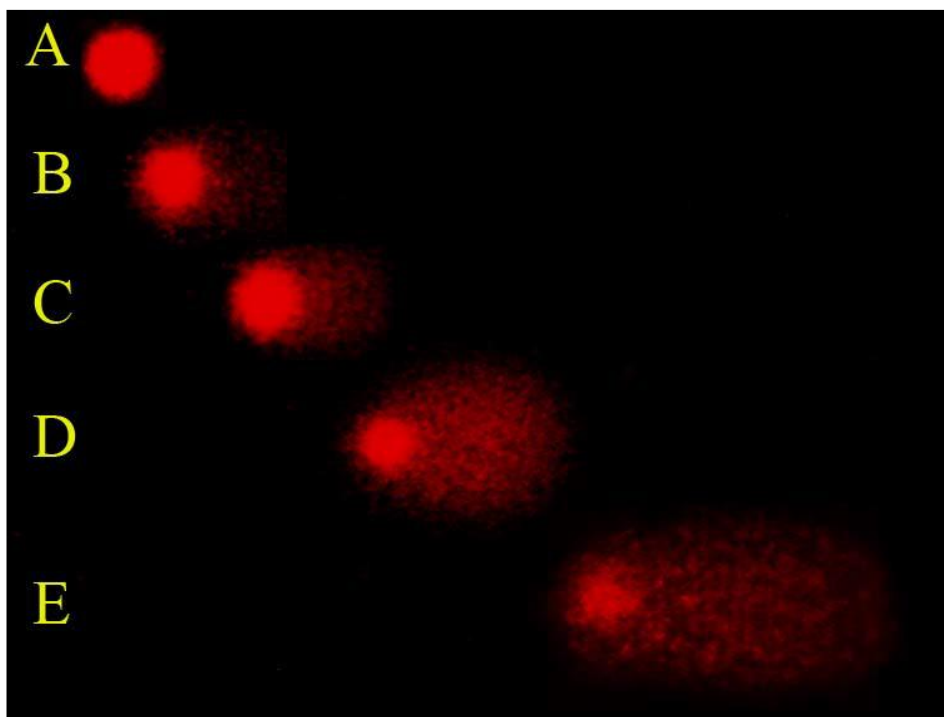
4.2.7. Процена оштећења ДНК у ћелијама крви коња уз помоћ Комет теста

Лимфоцити коња су изоловани из узорак крви коња узетих у епрувете са литијум-хепарином. Изолација лимфоцита за анализу ДНК оштећења је извршена применом „Ficoll-Paque TM Plus” (GE Healthcare Biosciences AB), према препоруци произвођача. Изолација лимфоцита је вршена наслојавањем фикола и центрифугирањем 15 минута на 1 900 rpm. Лимфоцити формирају прстен испод крвне плазме која је уклоњена, а ћелије су прикушљене и ресуспендоване два пута у RPMI 1640 медијуму, између испирања обављено је центрифугирање 10 минута на 1 800 rpm. На крају, супернатант је пажљиво уклоњен, а талог је ресуспендован у RPMI 1640 медијуму.

Базни Комет тест је урађен према Singh-у и сар., (1988) и Tice и сар., (1995) уз незнатне модификације. Пре извођења анализа микроскопске плочице су премазане 1% агарозом нормалне тачке топљења (*Normal Melting Point Agarose* - NMPA) (Sigma, St. Louis, MO) и остављене на собној температури најмање 48 сати како би агароза прешла у чврсто стање. Суспензије лимфоцита су инкубирани у раствору PBS, а након тога центрифугиране на 2 000 rpm, 5 минута. Добијени ћелијски талог је помешан са једнаком количином 1% агарозе ниске тачке топљења (*Low Melting Point Agarose* - LMPA) (Sigma, St. Louis, MO), а затим наслојен на претходно премазане микроскопске плочице. Плочице су држане 5 минута на 4 °C како би агарозни слој очврсноуо, а након тога на плочице се наслоји трећи слој агарозе (0,5% LMPA). Након полимеризације гела, плочице се потапају у лизирајући раствор (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) и оставе преко ноћи на 4 °C. Сутрадан, плочице се постављају у кадицу за хоризонталну гел електрофорезу и потапају у хладни алкални електрофоретски пуфер (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH \geq 13) у року од 30 минута како би се омогућила денатурација

ДНК. Хоризонтална електрофореза је изведена на апарату „МАХI-Electrophoresis Unit, N610.1” (*Carl Roth, Karlsruhe, Germany*) под следећим условима: 25 V, 300 mA, 30 минута. Сви наведени кораци су обављени у тамној просторији како би се спречило додатно оштећење ДНК под утицајем UV зрачења. Након завршене електрофорезе плочице се испирају неутралишућим раствором (0,4 M Tris базом, pH 7,5) три пута по 5 минута. Плочице се затим фиксирају у хладном метанолу, осуше на 55-60 °C и одлажу на сувом до тренутка анализе комета. Како би се омогућила визуелизација ћелија, осушене плочице се најпре потопе 15 минута у ледено хладну дестиловану воду и затим се свака плочица боји са 50 µL етидијум бромида (20 µg/mL, Serva).

Комете су посматране употребом микроскопа „Zeiss AKSIO Imager M1” (*Carl Zeiss*) коришћењем флуоресцентне светлости таласне дужине 510-560 nm. Од сваке јединке, односно од сваког узорка је анализирано 100 насумично одабраних ћелија. За квалитативну процену ћелије су сврстане у 5 категорија (Слика 2) у зависности од степена ДНК оштећења: (A) без оштећења, <5%; (B) низак ниво оштећења, 5 - 20%; (C) средњи ниво оштећења, 20-40%; (D) висок ниво оштећења 40-95%; (E) потпуно оштећење >95% (*Anderson и сар., 1994*). Како би извршили семиквантитативну анализу података, вредност ДНК оштећења срачунат је и изражен преко TCS вредности (енг. *Total Comet Score*), при чему је $TCS = 2 \times B + 3 \times C + 4 \times D + 5 \times E$, где B до E означавају проценте ћелија у оквиру напред наведених категорија.



Слика 2. Различити степени ДНК оштећења на лимфоцитима у Комет тесту А) неоштећена ћелија В) слабо оштећена ћелија С) средње оштећена ћелија Д) високо оштећена ћелија Е) тотално оштећена ћелија (преузето из Radakovic и сар., 2011, Acta Vet-Beograd)

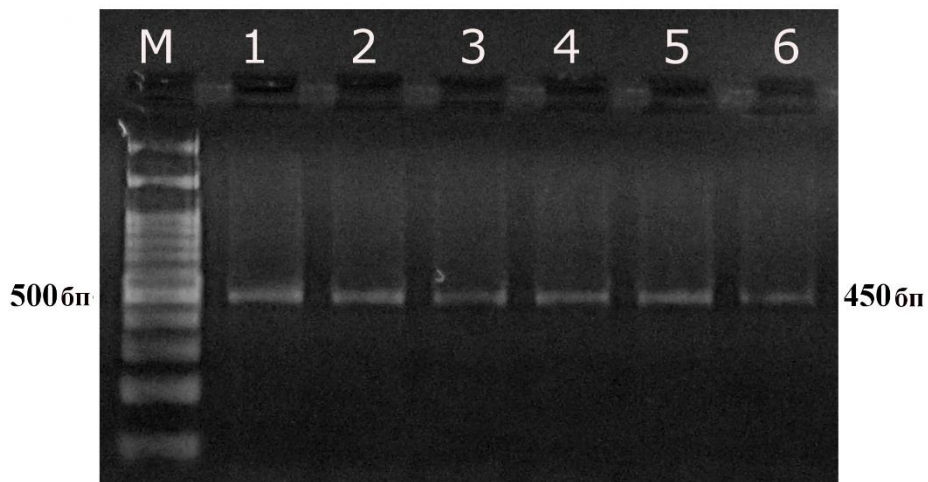
4.2.8. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података обухватила је израчунавање вредности дескриптивних статистичких параметара (аритметичка средина, стандардна девијација, стандардна грешка, коефицијент и интервал варијације) који су приказани табеларно и графички. Процена статистичке значајности између вредности праћених параметара инфициране и контролне групе коња вршена је употребом ANOVA теста и post-hoc Dunnett теста. Као статистички значајне сматране су разлике на нивоу $P < 0,05$, $P < 0,01$ и $P < 0,001$. Статистичка обрада података је извршена коришћењем компјутерског програма GraphPad Prism 7.00 (San Diego, CA, USA).

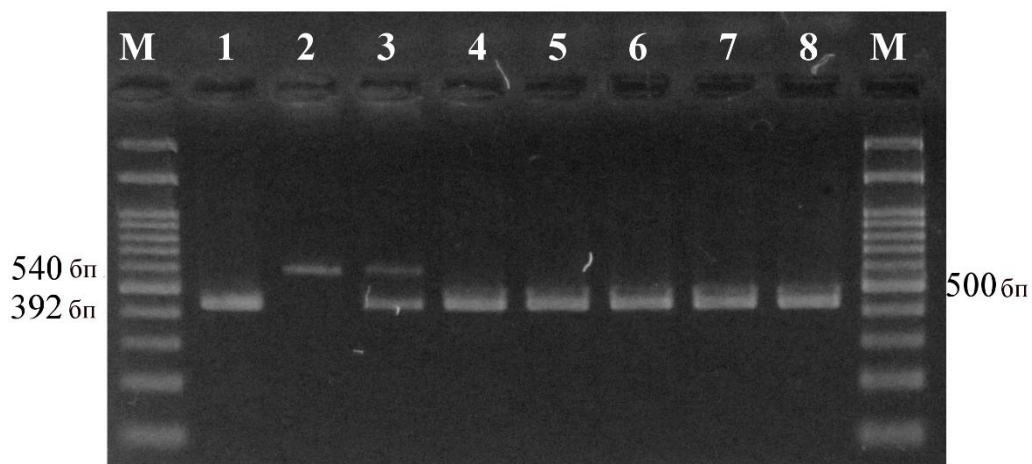
5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Раширеност пироплазмозе коња на испитиваном простору

Узрочници пироплазмозе коња су утврђени у 57 од укупно испитаних 165 коња уз помоћ описане PCR методе која детектује све врсте родова *Theileria* и *Babesia* (Слика 3). Укупна преваленција на испитиваном подручју износи 34,5%. Утврђена преваленција по испитаним земљама износи 41% за Србију, 16,7% за Црну Гору и 20,8% за Босну и Херцеговину. Мултиплекс PCR је потврдио присуство *T. equi* у 53 случаја (32,1%) и *B. caballi* у 3 случаја (1,8%) (Слика 4). Мешовита инфекција са *B. caballi* и *T. equi* установљена је у само једном случају. У Србији је установљена преваленција од 40,2 % за *T. equi* и 0,6% за *B. caballi*, у БиХ 16,7 % за *T. equi* и 4,2% за *B. caballi*, а у Црној Гори 8,3% за *T. equi* и 8,3% за *B. caballi*.



Слика 3. Приказ резултата PCR методе за детекцију свих врста родова *Theileria* и *Babesia*. М: 100 бп ДНК маркер; 1 - позитивна контрола; 2-6 - позитивни узорци. Величина траке која се добија у случају позитивних узорака је приказана са десне стране слике.



Слика 4. Приказ резултата мултиплекс PCR методе. М: 100 бп ДНК маркер; 1 - позитивна контрола за *T. equi*; 2 - позитивна контрола за *B. caballi*; 3 - позитивна контрола за мешовиту инфекцију; 4-8 - узорци инфицирани са *T. equi*. Величине трака које се добијају у случају позитивних узорака су приказане са леве стране слике.

Табела 2. Преваленција пироплазмозе коња (*Theileria equi* и/или *Babesia caballi*) и повезаност са потенцијалним факторима ризика за настанак обољења

Фактор	N	<i>T. equi</i>		<i>B. caballi</i>		<i>T. equi</i> и <i>B. caballi</i>	
		n	%	n	%	n	%
Локације							
Димитровград (Србија)	26	24	92,3 ^{a,b,c,d,e,f}	0	0	1	3,8
Зобнатица (Србија)	29	0	0 ^{a,g}	0	0	0	0
Београд (Србија)	24	0	0 ^{b,h}	0	0	0	0
Ивањица (Србија)	23	21	91,3 ^{g,h,i,j,k,l}	0	0	0	0
Шабац (Србија)	15	2	13,3 ^{c,i}	0	0	0	0
Живинице (БиХ)	24	4	16,7 ^{d,j}	1	4,2	0	0
Беране (Црна Гора)	15	0	0 ^{e,k}	2	13,3	0	0
Бијело поље(Црна Гора)	9	2	22,2 ^{f,l}	0	0	0	0
Пол							
Мушки	80	16	20 ^a	2	2,9	0	0
Женски	85	37	43,5 ^a	1	1,4	1	1,4
Старост							
<5 година	85	28	32,9	3	4	0	0
>5 година	80	25	31,2	0	0	1	1,5
Намена							
Радни коњи	127	53	42,1 ^a	3	2,9	1	1
Спортски коњи	38	0	0 ^a	0	0	0	0

N: број коња испитаних на присуство инфекције; n: број позитивних коња; %: преваленција инфекције. Вредности значајно различите ($P < 0,05$) између локалитета или потенцијалних фактора ризика су обележене истим словима (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l)

Табела 2. приказује вредности преваленција у зависности од потенцијалних фактора ризика. Не постоји статистички значајна разлика у преваленцији *B. caballi* и *T. equi* између различитих старосних категорија. Статистички значајне разлике су установљене у преваленцији између различитих локација, пола и намена коња.

Резултати секвенцирања су потврдили 100% подударност са врстама установљеним на основу методе мултиплекс PCR. Секвенце амплификованих ДНК фрагмената су идентичне са предходно депонованим секвенцама 18S rDNK гена *T. equi* и *B. caballi* (бројеви секвенци у Генској банци за *T. equi*: KR351291, KR351292; и *B. caballi*: KR527220, KR527221).

5.2. Резултати хематолошких и биохемијских параметара

Свим коњима са простора Р. Србије (117 јединки) су урађене крвне слике и одређени основни биохемијски параметри. Код свих коња који су били позитивни на присуство *T. equi* (њих 47) детектована је промена у крвној слици, односно бар један хематолошки параметар је био изван референтних вредности. Најчешће установљене промене код позитивних коња су: смањење НСТ (47/47), смањење RBC (22/47), смањење HGB (14/47), смањење PLT (15/47), леукоцитоза (5/47), лимфоцитоза (5/47) и лимфопенија (3/47). Статистичке значајности свих испитиваних хематолошких параметара између позитивних и негативних коња су приказане у табели 3.

Табела 3. Приказ хематолошких параметара (средња вредност \pm SD) и статистичких значајности између испитиваних група

Параметри	Контрола (средња вредност \pm SD)	<i>T. equi</i> (средња вредност \pm SD)	Статистичка значајност
WBC ($\times 10^9/L$)	8,71 \pm 1,83	10,15 \pm 2,50	$P=0,0036^{**}$
LYM ($\times 10^9/L$)	2,81 \pm 1,10	3,49 \pm 2,03	$P=0,1671$
MID ($\times 10^9/L$)	0,31 \pm 0,22	0,28 \pm 0,23	$P=0,4630$
GRA ($\times 10^9/L$)	5,59 \pm 1,44	6,38 \pm 1,71	$P=0,0115^*$
RBC ($\times 10^{12}/L$)	8,78 \pm 1,03	6,64 \pm 0,88	$P<0,0001^{***}$
HGB (g/L)	146,70 \pm 15,85	110,50 \pm 10,34	$P<0,0001^{***}$
НСТ (%)	31,81 \pm 3,36	25,56 \pm 2,61	$P<0,0001^{***}$
MCV (fl)	36,41 \pm 2,58	38,70 \pm 3,89	$P=0,0005^{***}$
MCH (pg)	16,78 \pm 1,20	16,27 \pm 1,52	$P=0,0597$
MCHC (g/L)	365,40 \pm 13,13	334,40 \pm 14,61	$P<0,0001^{***}$
PLT ($\times 10^9/L$)	154,60 \pm 43,20	102,80 \pm 54,07	$P<0,0001^{***}$

Статистичка значајност: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

Свим коњима са територије Р. Србије су урађени и основни биохемијски параметри. Код позитивних јединки установљено је статистички значајно повећање концентрације укупних протеина, концентрације глобулина, активности АСТ, АР и LDH ($P<0,001$), смањење концентрације албумина ($P<0,001$), повећање концентрације глукозе ($P<0,01$), повећање концентрације билирубина и активности GGT ($P<0,05$) и смањење концентрације гвожђа ($P<0,05$). Средње вредности \pm SD, као и статистичке значајности свих испитиваних биохемијских параметара између позитивних и негативних коња су приказане у табели 4.

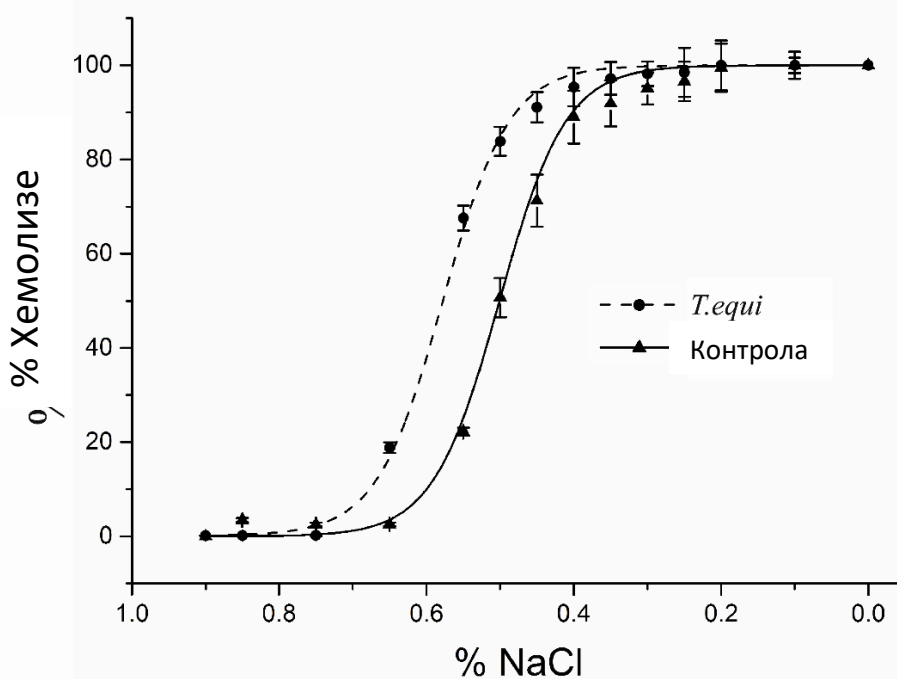
Табела 4. Приказ биохемијских параметара (средња вредност \pm SD) и статистичких значајности између инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

Параметри	Контрола (средња вредност \pm SD)	<i>T. equi</i> (средња вредност \pm SD)	Статистичка значајност
Глукоза (mmol/L)	4,24 \pm 1,10	4,88 \pm 1,19	$P=0,0030^{**}$
Уреа (mmol/L)	6,59 \pm 1,64	6,91 \pm 1,78	$P=0,2800$
Креатинин (μ mol/L)	96,40 \pm 19,90	94,88 \pm 27,69	$P=0,2787$
Укупни протеини (g/L)	64,63 \pm 5,34	69,24 \pm 5,44	$P<0,0001^{***}$
Албумини (g/L)	32,75 \pm 4,48	29,21 \pm 3,70	$P<0,0001^{***}$
Глобулини (g/L)	31,88 \pm 5,20	40,03 \pm 5,26	$P<0,0001^{***}$
AST (U/L)	189,3 \pm 45,86	287,90 \pm 103,90	$P<0,0001^{***}$
AP (U/L)	214,60 \pm 60,71	360,70 \pm 148,9	$P<0,0001^{***}$
GGT (U/L)	7,80 \pm 3,05	10,22 \pm 5,51	$P=0,0230^*$
Укупни билирубин (μ mol/L)	30,47 \pm 11,01	36,59 \pm 15,39	$P=0,0314^*$
СК (U/L)	216,80 \pm 68,75	251,70 \pm 141,40	$P=0,8614$
LDH (U/L)	362,40 \pm 83,21	514,80 \pm 150,1	$P<0,0001^{***}$
Fe (μ mol/L)	12,58 \pm 3,57	10,73 \pm 2,63	$P=0,0112^*$

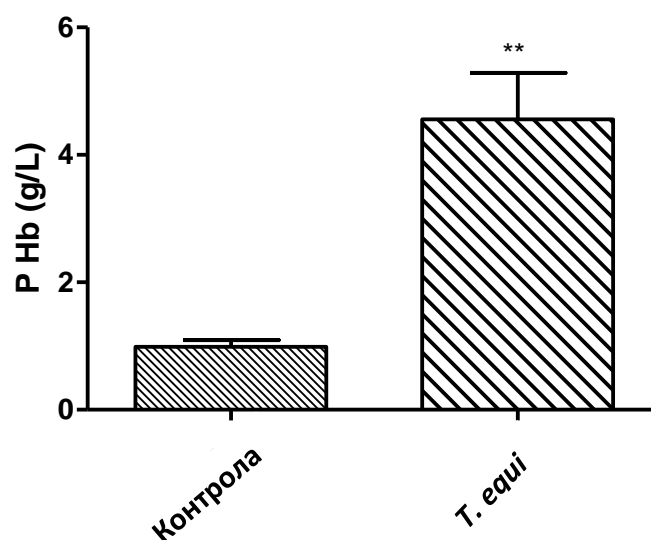
Статистичка значајност: * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

5.3. Резултати анализе параметара оксидативног стреса

Крива степена хемолизе групе инфициране са *T. equi* ($EH_{50} 0,578 \pm 0,045$), као и контролне групе ($EH_{50} 0,501 \pm 0,045$) су приказане на графикаону 1. Инфициране животиње су имале мању ($P < 0,001$) резистенцију на хемолизу (графикон 1) и значајно већу ($P < 0,01$) концентрацију слободног хемоглобина (РНб) у плазми него коњи у контролној групи ($4,81 \pm 0,73$ vs. $0,99 \pm 0,1$; графикон 2).



Графикон 1. Криве степена хемолизе инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

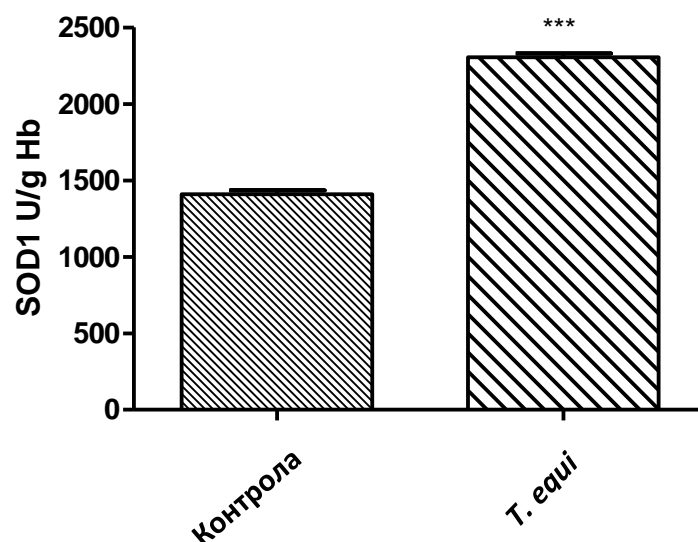


Графикон 2. Концентрација слободног хемоглобина (PHb) у плазми ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. ** $P < 0,01$

Табела 5. Дескриптивни статистички параметри концентрације слободног хемоглобина (PHb) у плазми инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

PHb	\bar{x} (g/L)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	0,99	0,29	0,10	28,97	0,53	1,37	0,95
<i>T. equi</i>	4,56	2,92	0,73	63,96	0,80	9,41	3,56

Резултати активности SOD1 дати су на графикону 3 и у табели 6. Активност антиоксидативног ензима SOD1 код инфицираних коња је била значајно повишена (63,64%; $P < 0,001$) у односу на контролну групу.

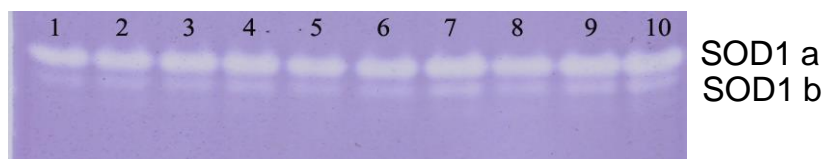


Графикон 3. Укупна активност ензима SOD1 ($\bar{X} \pm SD$) код инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$

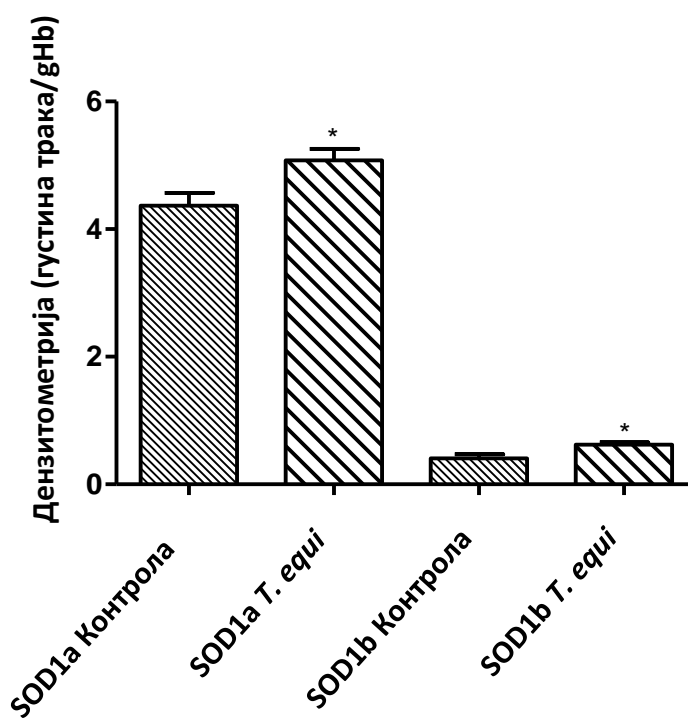
Табела 6. Дескриптивни статистички параметри концентрације SOD1 у еритроцитима инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња.

SOD1	\bar{X} (U/gHb)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	1409,00	126,60	24,84	8,99	1233,00	1772,00	1392,00
<i>T. equi</i>	2305,00	133,20	25,63	5,78	2139,00	2488,00	2321,00

Резултати спектрофотометријских мерења за SOD1 активност су потврђени бојењем на полиакриламидном гелу. Појава две траке различитих молекулских маса на гелу потврђује присуство изоензима SOD1a и SOD1b, како у контролној, тако и у испитиваној групи (слика 5). Интензитети трака изоензима код инфицираних коња са *T. equi* (узорци 6-10) су били јачи него код коња у контролној групи (узорци 1-5). Дензитометријске анализе су потврдиле да се ради о статистички значајној разлици ($P < 0,05$; графикон 4 и табела 7).



Слика 5. SOD1 електроферограм на полиакриламидном гелу (1-5: коњи из контролне групе; 6-10: коњи инфицирани са *T. equi*)

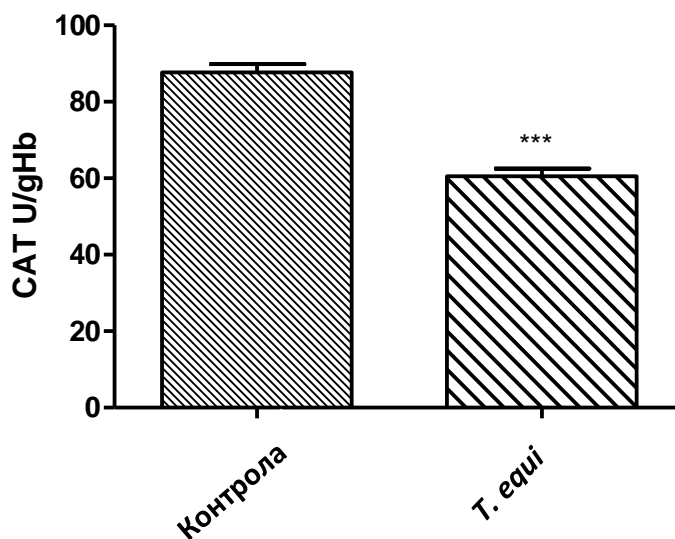


Графикон 4. Релативна активност изоензима SOD1a и SOD1b ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. * $P < 0,05$

Табела 7. Дескриптивни статистички параметри релативне изоензимске активности SOD1 у еритроцитима инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

SOD	\bar{X} (густина трака/gHb)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
SOD1a контрола	4,37	0,39	0,20	9,01	3,79	4,66	4,51
SOD1a <i>T. equi</i>	5,08	0,59	0,18	11,53	4,30	6,25	4,84
SOD1b контрола	0,41	0,11	0,07	28,29	0,29	0,52	0,41
SOD1b <i>T. equi</i>	0,62	0,13	0,04	20,76	0,35	0,79	0,64

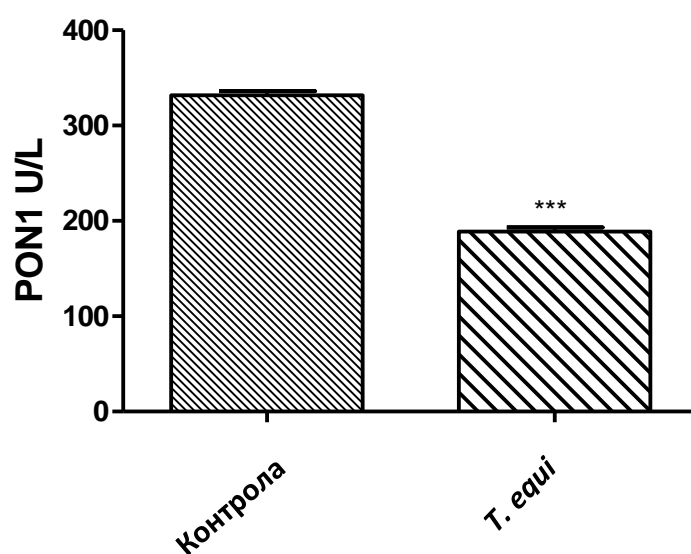
Активност каталазе је била значајно нижа код коња са пироплазмозом (21,22%; $P < 0,001$) него у контролној групи (графикон 5, табела 8). Активност PON1 је била 45% нижа у инфицираној него у контролној групи ($P < 0,001$; графикон 6 и табела 9).



Графикон 5. Укупна активност ензима САТ у еритроцитима ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$

Табела 8. Дескриптивни статистички параметри укупне активности ензима САТ у еритроцитима инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

САТ	\bar{X} (U/gHb)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	87,68	11,61	2,23	13,24	58,78	107,50	86,33
<i>T. equi</i>	60,52	10,59	2,04	17,49	37,68	79,40	58,88

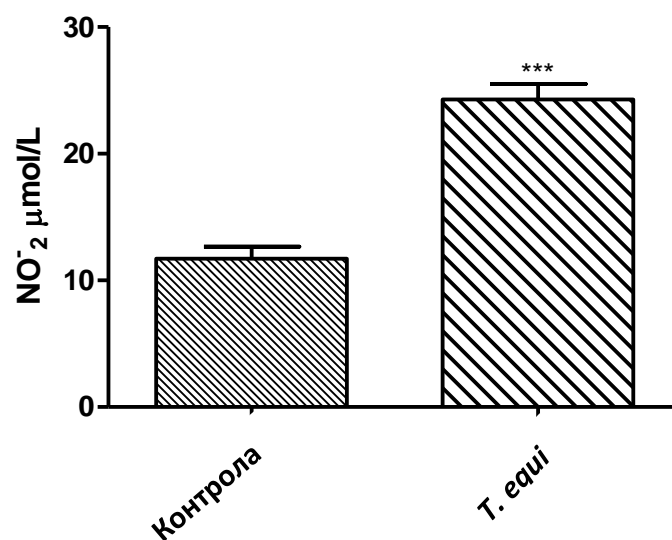


Графикон 6. Укупна активност ензима PON1 у еритроцитима ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$

Табела 9. Дескриптивни статистички параметри укупне активности ензима PON1 код инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

PON1	\bar{x} (U/L)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	331,80	20,71	4,52	6,24	309,00	369,00	325,00
<i>T. equi</i>	188,80	22,13	4,26	11,72	154,30	219,10	191,30

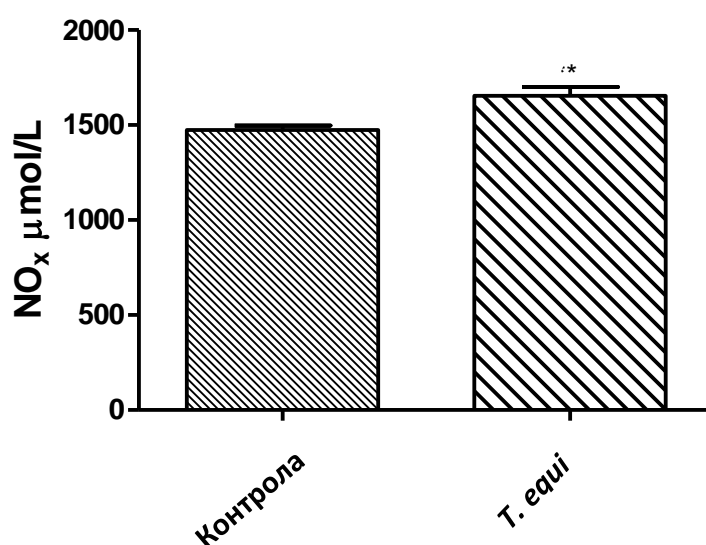
Инфицирани коњи су имали значајно веће концентрације NO_2^- ($P < 0,001$; графикон 7, табела 10) и NO_x ($P < 0,01$; графикон 8, табела 11) у односу на контролну групу. Изразита разлика се уочава у вредностима за концентрацију NO_2^- (графикон 7).



Графикон 7. Концентрација нитрита ($\bar{X} \pm SD$) код инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$

Табела 10. Дескриптивни статистички параметри концентрације нитрита инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

Нитрити	\bar{X} ($\mu\text{mol/L}$)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	11,72	4,48	0,95	38,20	4,48	19,39	12,12
<i>T. equi</i>	24,30	5,88	1,23	24,20	14,54	39,44	25,45

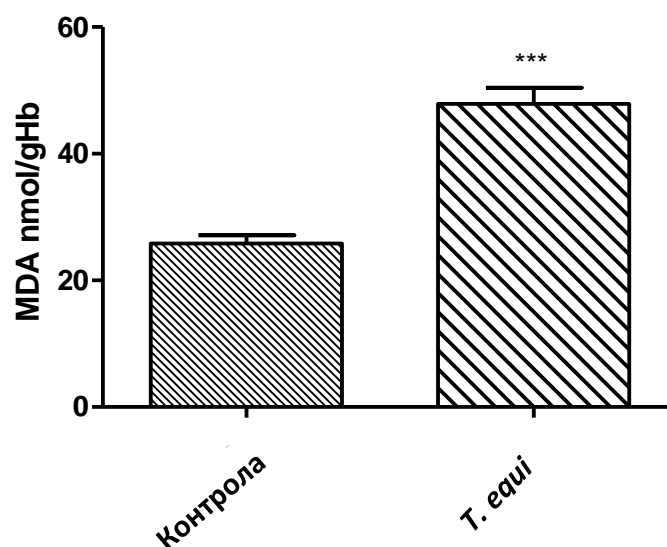


Графикон 8. Укупна концентрација нитрата и нитрита ($\bar{X} \pm SD$) у инфицираној (*T. equi*) и контролној групи коња. * $P < 0,05$

Табела 11. Дескриптивни статистички параметри укупне концентрације нитрата и нитрита инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

NO _x	\bar{X} (μmol/L)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Kontrola	1475,00	100,20	21,86	6,79	1214,00	1634,00	1474,00
<i>T. equi</i>	1655,00	218,60	45,58	13,21	1336,00	2075,00	1632,00

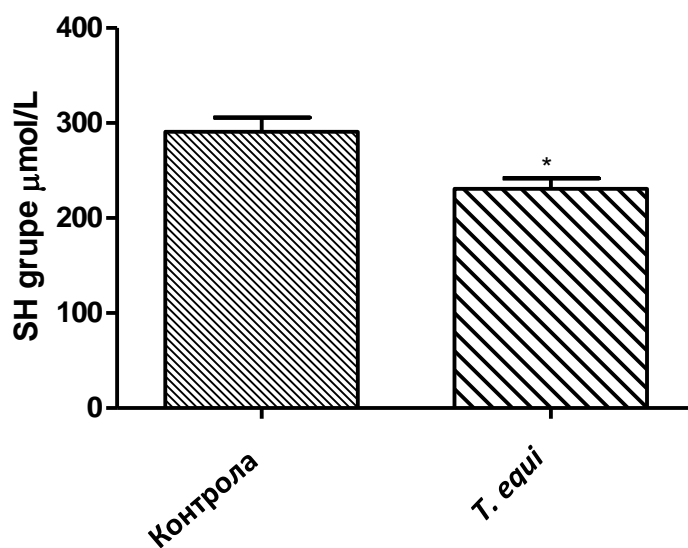
Концентрација MDA је повећана за 80% у испитиваној групи, што је значајно више ($P < 0,001$) него у контролној групи (графикон 9, табела 12). Међутим, концентрације тиолних група (-SH) су значајно смањене ($P < 0,05$) код инфицираних коња у односу на контролну групу коња ($290,7 \pm 15,02$ vs. $233,80 \pm 12,08$) (графикон 10, табела 13).



Графикон 9. Концентрација MDA у еритроцитима ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$

Табела 12. Дескриптивни статистички параметри концентрације MDA у еритроцитима инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

MDA	\bar{X} (nmol/gHb)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	25,82	6,60	1,32	25,56	13,64	36,29	25,16
<i>T. equi</i>	47,86	12,22	2,55	25,53	26,93	77,12	44,64

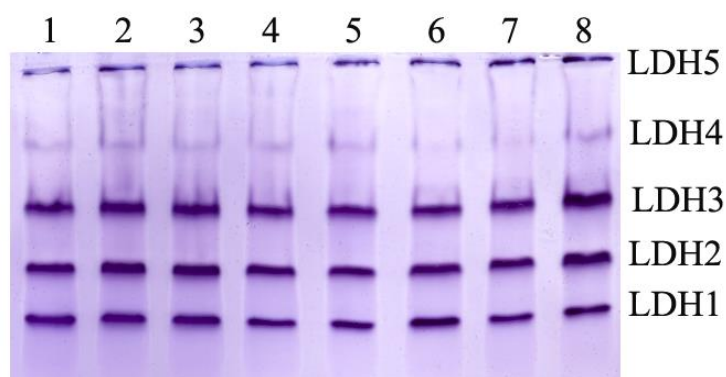


Графикон 10. Концентрација слободних тиолних група у плазми ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. * $P < 0,05$

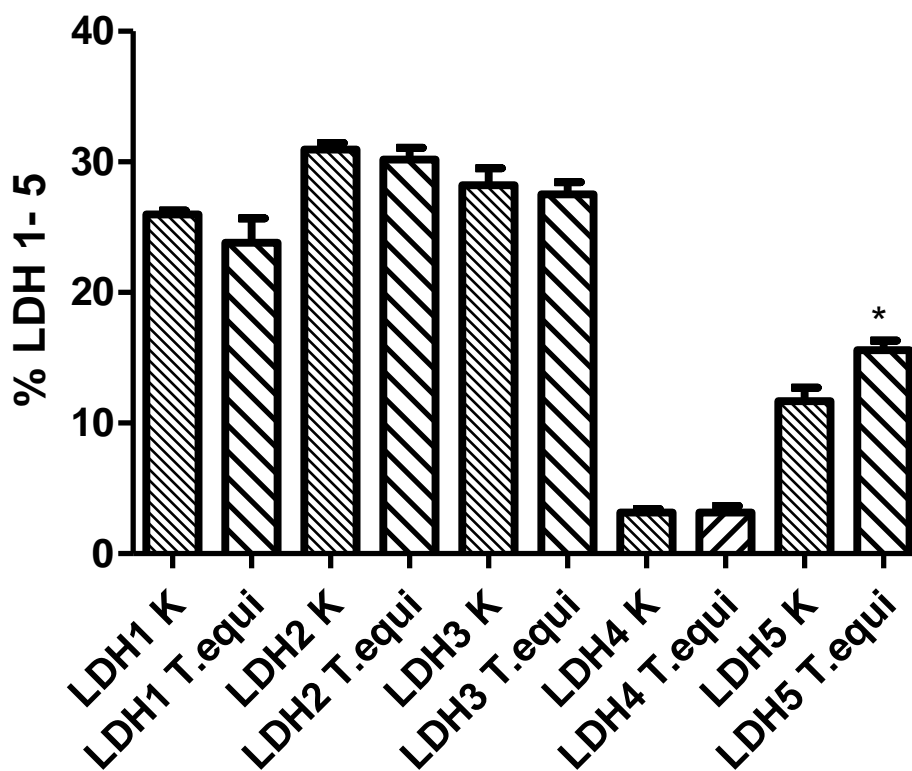
Табела 13. Дескриптивни статистички параметри концентрације слободних тиолних група у плазми инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

SH групе	\bar{X} (μmol/L)	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
Контрола	290,7	73,58	15,02	25,31	228,5	537,5	263,1
<i>T. equi</i>	233,2	27,36	5,26	11,73	177,9	269,6	239,2

Дистрибуција релативне активности LDH изоензима (графикон 11) и њихових електрофоретских профила (слика 5) указују да једино LDH5 има значајно повећану релативну активност код инфицираних коња ($P < 0,05$). Није доказана статистички значајна разлика у активности других LDH изоензима (табела 14).



Слика 6. Електрофореграм LDH из плазме на 8% PAGE (1-4: узорци коња из контролне групе; 5-8: узорци коња инфицираних са *T. equi*)



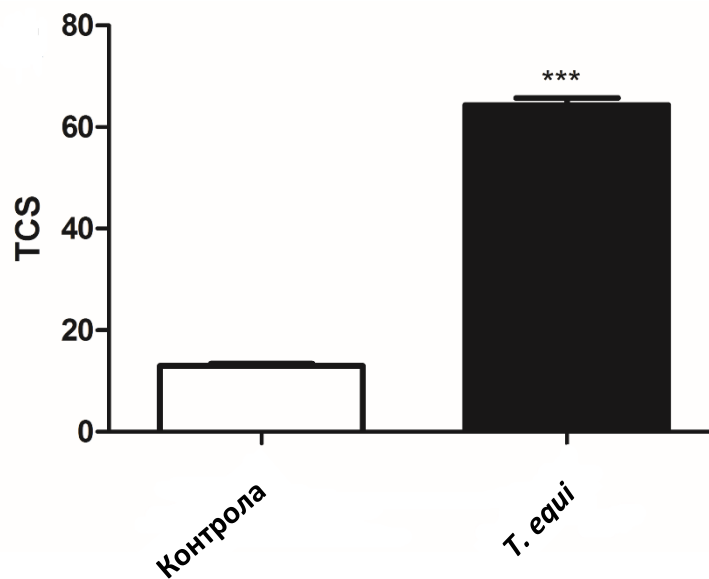
Графикон 11. Изоензимска расподела релативне активности LDH у крвној плазми ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. * $P < 0,05$

Табела 14. Дескриптивни статистички параметри изоензимске расподеле релативне активности LDH у крвној плазми инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња

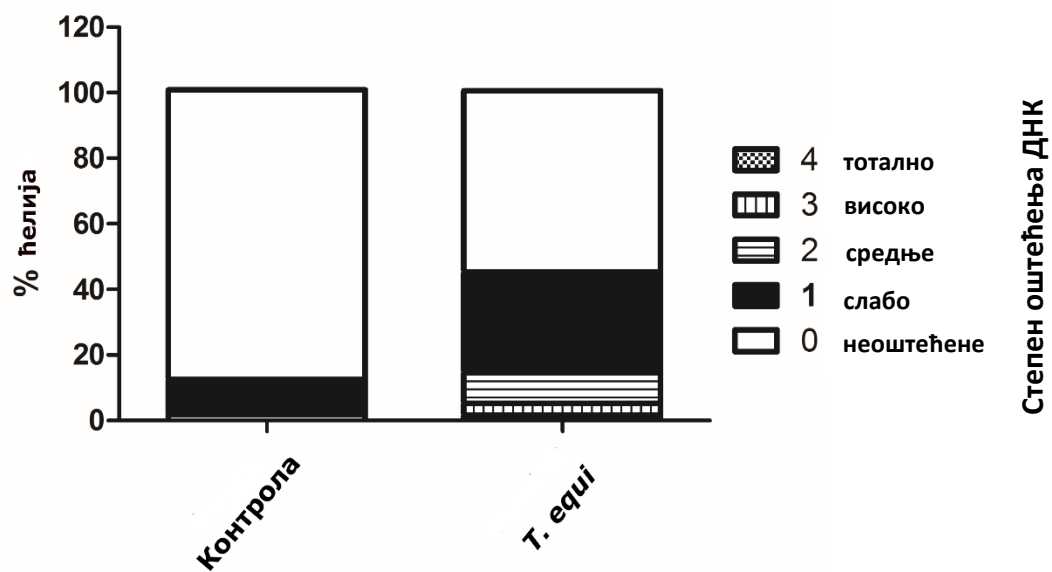
LDH	\bar{x}	SD	SE	CV (%)	IV		Медиана
					мин	макс	
LDH1 контрола	26,00	0,56	0,28	2,17	25,52	26,68	25,90
LDH1 <i>T. equi</i>	23,82	3,72	1,86	15,63	20,96	29,29	22,52
LDH2 контрола	30,94	1,03	0,51	3,32	29,89	32,00	30,94
LDH2 <i>T. equi</i>	30,17	1,79	0,90	5,95	27,59	31,53	30,79
LDH3 контрола	28,22	2,62	1,31	9,29	25,56	30,63	28,35
LDH3 <i>T. equi</i>	27,51	1,84	0,92	6,70	24,92	29,28	27,93
LDH4 контрола	3,17	0,51	0,26	16,28	2,47	3,71	3,24
LDH4 <i>T. equi</i>	3,14	1,05	0,52	33,35	2,15	4,17	3,12
LDH5 контрола	11,68	2,09	1,04	17,87	9,41	13,63	11,84
LDH5 <i>T. equi</i>	15,60	1,44	0,72	9,25	14,12	17,31	15,48

5.4. Резултати Комет теста

Процена TCS је показала да коњи инфицирани са *T. equi* имају значајно веће оштећење ДНК него коњи у контролној групи ($P < 0,001$; графикон 12). Степен оштећења ДНК у популацији ћелија био је значајно варијабилнији код заражених коња (графикон 13).



Графикон 12. Степен оштећења ДНК изражен преко тотал комет скова (*total comet score* - TCS) ($\bar{X} \pm SD$) инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња. *** $P < 0,001$



Графикон 13. Дистрибуција различитих класа оштећења ДНК инфициране (*T. equi*) и контролне групе коња.

6. ДИСКУСИЈА

Овај рад представља прву епизоотиолошку студију о узрочницима и преваленцији пироплазмозе коња на територији централног Балкана (на простору Србије, Црне Горе и Босне и Херцеговине). У првом кораку смо све узорке подвргли PCR методи која детектује све врсте родова *Babesia* и *Theileria*. У литератури је већ потврђено да поједине врсте наведених родова могу да прескоче баријеру врсте. Рецимо, *Babesia canis* и *Babesia microti-like*, врсте које првенствено паразитирају код паса, су већ детектоване у крви коња (Criado-Fornelio и сар. 2003). Уз помоћ мултиплекс PCR методе, у нашем раду је потврђено да се у свим позитивним случајевима радило о инфекцији са *T. equi*, *B. caballi* или о мешовитој инфекцији са ова два паразита. Преваленција *T. equi* била је значајно виша него преваленција *B. caballi* у испитиваном региону. Наши резултати су у складу са претходним истраживањима спроведеним у другим земљама, која су установила да се *T. equi* много чешће јавља него *B. caballi* (Bashiruddin и сар., 1999; Criado-Fornelio и сар., 2004; Nagore и сар., 2004; Acici и сар., 2008; Kouam и сар., 2010; Ros-Garcia и сар., 2013). Сматра се да неколико фактора доводи до веће раширености тајлериозе коња у односу на бабезиозу: дуже присуство у организму *T. equi* него *B. caballi* након инфекције, већа паразитемија код инфицираних коња и трансплацентарни пренос *T. equi* (de Waal и van Heerden, 1994; Allsop и сар., 2007; Georges и сар., 2011).

Разлике у преваленцијама по различитим географским локалитетима могу се објаснити различитом заступљеношћу вектора (крпеља), наменом коња и другачијим климатским условима (Heim и сар., 2007; Kouam и сар., 2010; Grandi и сар., 2011; Garcia-Vocanegra и сар., 2013). У нашем раду су доказане статистички значајне разлике у преваленцији пироплазмозе биле у зависности од места узорковања, са највећим преваленцијама у Ивањици

и Димитровграду (оба локалитета у Србији). С обзиром да су сви узорци из Ивањице и Димитровграда прикушљени од коња који су готово током целе године на испашаи, њихова изложеност крпељима је вероватно главни разлог тако високе преваленције пироплазмозе коња. Упркос чињеници да је пироплазмоза коња била статистички значајно чешћа код кобила ($P < 0,05$), не може се говорити о правој родној предиспозицији, с обзиром да су на локалитету Димитровград, где је преваленција била јако висока (92,3%), у крду доминантно биле кобиле. Преваленција *B. caballi* и *T. equi* није се статистички значајно разликовала између различитих старосних категорија (Davitkov и сар., 2016), што је у складу са резултатима предходних истраживања (Moretti и сар., 2010; Kouam и сар., 2010; Grandi и сар., 2011; Amir и сар., 2012; Bahrami и сар., 2014). Није забележен ни један случај пироплазмозе коња код тркачких грла, док је преваленција код радних коња за *T. equi* и *B. caballi* била 41,7% и 2,4%, респективно (Davitkov и сар., 2016). Ови наши резултати су у складу са претходним истраживањима која су потврдила да су управо употреба самих коња, као и време проведено на испашаи, главни фактори ризика повезани са пироплазмозом коња (Kouam и сар., 2010; Moretti и сар., 2010; Abutarbush и сар., 2012).

Анализом крвних слика коња у нашем раду уочене су статистички значајне разлике у вредностима појединих параметара. Укупан број леукоцита код коња инфицираних са *T. equi* износио је $10,15 \pm 2,50$ ($\times 10^9/L$) што је статистички значајно ($P < 0,01$) више у односу на контролну групу коња $8,71 \pm 1,83$ ($\times 10^9/L$). Повећање броја леукоцита је у складу са испитивањима Zobba и сар. (2008), Ibrahim и сар. (2011) и Garcia-Vocanegra и сар. (2013) која су утврдила постојање леукоцитозе код инфицираних коња. Са друге стране Chhabra и сар. (2012) су утврдили постојање леукопеније код инфицираних коња. Повећање укупног броја леукоцита може бити последица стимулације лимфног система, као и имунског одговора костне сржи на присуство паразита или његових метаболита (Alsaad и сар., 2010).

Број лимфоцита у групи коња код којих је детектована *T. equi* био је $3,49 \pm 2,03$ ($\times 10^9/L$), док је у контролној био $2,81 \pm 1,10$ ($\times 10^9/L$). У пет случајева код инфицираних коња смо установили лимфоцитозу, док је у три случаја установљена лимфопенија. Кад сагледамо све узорке, није било статистички значајне разлике између заражене и контролне групе ($P > 0,05$). У литератури су описани случајеви како лимфоцитозе (Ibrahim и сар, 2011; Chhabra и сар., 2012) тако и лимфопеније (Takeet и сар., 2009) код инфицираних коња. Код заражених коња може доћи до појаве лимфопеније услед деструктивног ефекта мерозоиота, и њихове преритроцитне шизогоније која се одвија у лимфоцитима (Schein и сар., 1981). Иако у нашем раду није било статистички значајне разлике у броју MID између група, постоје литературни наводи о могућој моноцитози код инфицираних јединки (Alessia и сар., 2007).

Средња вредност гранулоцита код инфицираних коња у нашем истраживању била је $6,38 \pm 1,71$ ($\times 10^9/L$), док је у контролној групи вредност била статистички значајно мања ($P < 0,05$) и износила је $5,59 \pm 1,44$ ($\times 10^9/L$). Ibrahim и сар. (2011) су такође потврдили постојање гранулоцитозе код заражених коња. Гранулоцитоза може бити последица стреса или појачаног еозинофилног одговора услед присуства паразита.

Најзначајније промене у крвној слици инфицираних коња у нашем раду односиле су се на црвену лозу. Вредности RBC, HGB и HCT су биле статистички значајно ниже ($P < 0,001$) код инфицираних коња и указивале су на анемију различитог степена. Добијени резултати су у складу са резултатима других аутора (Hailat и сар., 1997; Camacho и сар., 2005; Asgarali и сар., 2007; Zobba и сар., 2008; Chhabra и сар., 2012; Garcia-Vocanegra и сар., 2013; Salib и сар., 2013), као и са резултатима хематолошких параметара код инфицираних магараца (Davitkov и сар., 2017). Смањење RBC настаје услед интра-еритроцитне деобе узрочника и последичног пуцања еритроцита, као и штетних ефеката одбрамбених механизма када долази до стварања

аутоантитела директно против ћелијских мембрана црвених крвних зрнаца (Ibrahim и сар., 2011; Salib и сар., 2013). Још један механизам који игра важну улогу у настанку хемоллизе и последичном смањењу RBC је пероксидација масти и оксидативни стрес који настаје код коња инфицираних са *T. equi* (Kumar и сар., 2009). До смањења укупног хемоглобина долази услед деструкције еритроцита. Што се тиче хематолошких индекса, код инфицираних коња је установљено статистички значајно ($P < 0,05$) повећање MCV и смањење MCHC. Анализом литературних навода можемо установити да вредности хематолошких индекса код коња инфицираних *T. equi* могу бити променљиви (Ambawat и сар., 1999).

Детектована тромбоцитопенија код инфицираних коња у нашем раду у складу је са резултатима и других истраживача (Samacho и сар., 2005; Alessia и сар., 2007; Zobba и сар., 2008; Takeet и сар., 2009; Chhabra и сар., 2012; Garcia-Vocanegra и сар., 2013). Смањење броја тромбоцита код коња инфицираних са *T. equi* и *B. caballi* може настати услед депресије активности костне сржи или услед секвестрације тромбоцита узроковане дисеминованом интраваскуларном коагулацијом која изазива микротромбозе и инфаркте појединих органа.

Између инфицираних и контролних коња у нашем раду уочене су и статистички значајне разлике у вредностима појединих биохемијских параметара. Ензими јетре (AST, AP и GGT) су били значајно виши код заражених коња. Повећање јетриних ензима је забележено и у радовима других аутора (Hailat и сар., 1997; Samacho и сар., 2005; Alsaad и сар., 2010; Ibrahim и сар., 2011; Salib и сар., 2013). До повећања активности јетриних ензима најчешће долази услед централобуларне дегенерације и некрозе хепатоцита. У инфицираној групи је значајно повећана и активност ензима LDH ($P < 0,001$), као што је примећено и у раду Samacho и сар. из 2005. године. До повећања активности LDH може доћи услед оштећења јетре, али и услед хемолитичке анемије. Да би се несумњиво утврдило да ли је и у ком

степену јетра оштећена, неопходно би било урадити биопсију јетре и последично хистопатолошке анализе (de Waal и van Heerden, 2004).

Услед хемолитичке анемије код инфицираних коња је дошло до повећања концентрације укупног билирубина ($P < 0,001$). Повећање концентрације укупног билирубина код коња инфицираних са *T. equi* су документовали и други аутори (Hailat и сар., 1997; Camacho и сар., 2005; Zobba и сар., 2008; Alsaad и сар., 2010; Ibrahim и сар., 2011; Garcia-Bocanegra и сар., 2013; Salib и сар., 2013).

Концентрације укупних протеина и глобулина су биле значајно повећане у инфицираној групи ($P < 0,001$), док је концентрација албумина била статистички значајно нижа ($P < 0,001$). Наши резултати су у складу са радом Takeet и сар. (2009) који су описали повећање концентрације укупних протеина и глобулина код заражених коња, са радом Ibrahim и сар. (2011) који су детектовали повећање концентрације укупних протеина, као и са радовима Zobba и сар. (2008) и Garcia-Bocanegra и сар. (2013) који су описали присуство хипоалбуминемије код заражених јединки. Са друге стране код појединих аутора можемо наћи и информације о смањењу концентрације укупних протеина у серуму (Hailat и сар., 1997; Alsaad и сар., 2010; Salib и сар., 2013). Било би интересантно испитати концентрације различитих фракција глобулина код инфицираних јединки, с обзиром да је код паса са бабезиозом утврђено да долази до смањења α_1 глобулина (Milanovic и сар., 2017).

Код инфицираних коња смо установили статистички значајно смањење концентрације гвожђа у серуму ($P < 0,05$), као и статистички значајно повећање глукозе ($P < 0,05$). До хипоферемije највероватније долази услед промењеног метаболизма еритроцита описаног код коња са пироплазмозом (Frerich и Holbrook, 1974). До повећања нивоа глукозе код инфицираних коња највероватније долази услед стреса и повећане

мобилизације глукозе која настаје као последица овог хиперметаболичког поремећаја (Nel и сар., 2004; Camacho и сар., 2005).

Када су у питању концентрације урее и креатинина, у нашем истраживању није било статистички значајне разлике између инфицираних и контролних коња, док у литератури постоје наводи да код инфицираних коња може доћи до повећања ових параметара услед хемоглобином индуковане нефропатије (Camacho и сар., 2005; Takeet и сар., 2009; Alsaad и сар., 2010; Ibrahim и сар., 2011).

Код коња природно инфицираних са *T. equi* у нашем раду утврђене су значајне промене у испитиваним параметрима оксидативног стреса. Ови резултати су у складу са потенцијалном стратегијом домаћина да развија комплексне механизме попут стварања реактивних кисеоничних и/или азотних врста (RNS) као одговор на паразитску инфекцију (Dimitrijević и сар., 2012; Esmaeilnejad и сар., 2014). У нашем раду је утврђено значајно повећање концентрације РНб код коња инфицираних са *T. equi* у односу на контролну групу. Слично нашим резултатима, Saleh је 2009. године установио да код крава инфицираних са *B. bigemina* долази до повећања РНб. Важно је напоменути да је повећана концентрација РНб показатељ разградње еритроцита и хемолизе (Fairbanks и Klee, 1994), те је у нашем раду вероватно *T. equi* довела до хемолизе и последично до повећања концентрација РНб. Анализа ЕН указује на смањену резистенцију на хемолизу код инфицираних коња. Овај резултат је у складу са повећањем концентрације РНб, и ови резултати нам указују да *T. equi* може нарушити интегритет мембране црвених крвних зрнаца. До сада није било сличних истраживања код коња, али Esmaeilnejad и сар. (2014) су установили повећану осмотску фрагилност код оваца инфицираних са *B. ovis*.

У нашем раду, спектрофотометријске анализе су показале да коњи инфицирани са *T. equi* имају значајно вишу SOD1 активност, што је потврђено електрофоретски и дензитометријом. Ови подаци указују да *T.*

equi доводи до промене изоензимске активности путем продукције слободних радикала (Radaković и сар., 2016). Код паса је такође установљено значајно повећање активности SOD услед инфекције са *B. gibsoni* (Chaudhuri и сар., 2008). Са друге стране, постоје литературни подаци који говоре о смањењу SOD активности код оваца са бабезиозом или тајлериозом (Nazifi и сар., 2011; Esmailnejad и сар., 2014). Неусклађеност добијених података са појединим литературним наводима може се објаснити могућом инактивацијом SOD од стране њеног производа, водоник пероксида (Nikolic-Kokic и сар., 2010), чија се концентрација може повећати услед дисмутације супероксидног анјон радикала. Водоник-пероксид, настао као производ SOD, је потенцијална опасност за ћелије и представља супстрат за други антиоксидативни ензим, CAT (Radaković и сар., 2016).

Наш рад је показао да долази до значајног повећања SOD активности и значајног смањења активности CAT код коња инфицираних са *T. equi*. Такви резултати нам указују да највероватније долази до смањења CAT антиоксидативног капацитета (Radaković и сар., 2016). Један од могућих разлога за смањену CAT активност је и њена инактивација азотним оксидима (Brunelli и сар., 2001). Код коза са бабезиозом, активност CAT значајно опада са повећањем степена паразитемије (Esmailnejad и сар., 2014). Међутим, на супрот нашим резултатима, Baghishani и сар. (2011) су утврдили повећање CAT активности и смањење SOD активности код оваца природно инфицираних са *Theileria* врстама. ROS хомеостаза зависи од уравнотежене активности антиоксидативних ензима (Nikolic-Kokic и сар., 2010) и та постигнута равнотежа је резултат међузависних промена у интрацелуларној активности антиоксидативних ензима. Повећана CAT активност коју су установили Baghishani и сар. (2011) може бити последица смањене активности SOD и последично смањеног стварања H₂O₂.

Поред активности CAT и SOD, у нашем истраживању смо пратили и активност PON1. Постоји неколико студија које су се бавиле испитивањем

активности PON1 код различитих патолошких стања код животиња (Rossi и сар., 2014), али ниједно није спроведено код коња са тајлериозом. Резултати нашег рада указују да долази до смањења активности PON1 у плазми, што је у складу са резултатима Azimzadeh и сар. (2013) који су утврдили да долази до смањења активности PON1 код оваца инфицираних са *B. ovis*. Смањење активности PON1 код инфицираних коња у нашем раду може указати на вишак слободних радикала који могу изазвати оштећење ћелијске мембране липидном пероксидацијом (Radakovic и сар., 2016).

У нашем раду је установљено значајно повећање NO₂⁻ и NO_x код инфицираних коња. Deger и сар. (2009) су такође утврдили повећано стварање NO код коња инфицираних са *T. equi* и *B. caballi*. У литератури се могу наћи подаци о повећаном стварању NO код других паразитских инфекција (Dimitrijevic и сар., 2012).

Резултати нашег истраживања указују да *T. equi* побољшава пероксидацију липида, што се огледа у повећаним концентрацијама MDA и оштећењима ћелијских мембрана које настају услед повећаног стварања слободних радикала. Наши резултати су у складу са истраживањима која су утврдила значајно повећање MDA код коња инфицираних са *T. equi* и *B. caballi* (Deger и сар., 2009). Cingi и сар. (2012) и Salem и El-Sherif (2015) су указали на тесну повезаност тајлериозе и повећања пероксидације липида. Код бабезиозе и тајлериозе оваца је такође утврђено повећање концентрације MDA (Baghishani и сар., 2011; Esmailnejad и сар., 2014). Наши резултати, као и литературни наводи, указују да би повећана пероксидација липида могла бити један од главних механизма деструкције ћелијске мембране, изазваних узрочницима пироплазмозе коња. Пероксидација полинезасићених масних киселина коју изазивају ROS, може довести до повећане ригидности ћелијске мембране, повећања њене пропустљивости, као и озбиљних последица, као што су пуцање ћелијске

мембране и изласка хемоглобина из еритроцита, што смо и ми доказали. Сходно томе, уочена хемолиза може, између осталог, настати и услед повећане пероксидације липида до које доводе слободни радикали (Radaković и сар., 2016). Предходна истраживања су потврдила позитивну корелацију између пероксидације липида и прогресије анемије (Asri Rezaei и Dalir-Naghadeh, 2006; Gopalakrishnan и сар., 2015). Самим тим, оксидативно оштећење може бити један од фактора у патогенези анемија код животиња инфицираних са *T. equi*.

Високо реактивни секундарни производи пероксидације липида могу реаговати са тиолним групама протеина плазме, који су подложни утицају слободних радикала. Чињеница да смо установили смањење концентрација тиолних група код коња са тајлериозом, потврђује наше сумње да је дошло до повећаног стварања слободних радикала код инфицираних коња. Ducrocq и сар. (1999) су приметили да тиолни радикали могу реаговати са кисеоником и довести до оксидативног стреса.

Иако су многа претходна истраживања утврдила да долази до повећања оштећења ДНК код паразитских инфекција (De Oliveira и сар., 2011; El-Sayed и Aly, 2014), не постоји ни један рад о оштећењу ДНК код пироплазмозе коња. У нашем истраживању, коњи инфицирани са *T. equi* су имали већи степен оштећења ДНК лимфоцита, него коњи из контролне групе (Radaković и сар., 2016). Сличне резултате су добили Kucukkurt и сар. (2014) код коза инфицираних са *B. ovis*. Настала оштећења ДНК која смо приметили у лимфоцитима коња, могу се објаснити имунолошком реакцијом организма на присуство паразита. Супероксидни радикали и H_2O_2 који настају код паразитских инфекција, могу формирати моћне хидроксилне радикале ($OH\bullet$; Jackson и Loeb, 2001), који могу да реагују са азотним базама ДНК и формирају критичне биомаркере оксидативног стреса, попут 8-хидроксигуанина (8-OHG). Код паса инфицираних са *B. vogeli* утврђено је повећање концентрације 8-хидрокси-2'-деоксигуанозина

(8-OHdG) (Ciftci и сар., 2014). Конзистентност добијених резултата и литературних навода указује на значај слободних радикала у патогенези пироплазмозе копитара (као и бабезиоза других животиња) доводећи до оксидативног оштећења ДНК домаћина.

Присуство ћелијског ензима, као што је LDH, у екстрацелуларном простору је несумњив показатељ нарушености ћелијског интегритета. Постоји пет изоформи ензима LDH (изоензими LDH1-LDH5) и дистрибуција сваког изоензима се разликује у зависности од врсте ткива. Од свих испитиваних изоензима, у нашем раду једино је за LDH5 (који указује на оштећење јетре) уочена значајно већа релативна активност код инфицираних коња у односу на контролне (Radakovic и сар., 2016). Познато је да *B. divergens* код гербила доводи до повећања активности LDH и да бабезиоза индукује оксидативни стрес у ткиву јетре (Dkhal и сар., 2013). Последично долази до повећања серумске активности AST и ALT (маркера оштећења јетре), као што је установљено код говеда инфицираних са *B. bigemina* и *T. annulata* (Lotfollahzadeh и сар., 2011). Код инфицираних коња у нашем истраживању, утврђено је значајно повећање активност како LDH, тако и AST. Ови резултати указују на улогу оксидативног стреса у патогенези инфекције коју код коња изазива *T. equi*.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата и података из актуелне литературе, може се закључити следеће:

- Узрочници пироплазмозе коња (*Theileria equi* и *Babesia caballi*) су присутни на простору централног Балкана, што је у овом случају несумњиво потврђено молекуларним методама детекције.
- Укупна преваленција пироплазмозе копитара на испитиваном простору износи 34,5%, док преваленција по испитаним земљама износи 41,0% од укупног броја узорака за Србију, 16,7% од укупног броја узорака за Црну Гору и 20,8% од укупног броја узорака за Босну и Херцеговину.
- Коришћени мултиплекс PCR је поуздана и сигурна метода за прецизну специјску идентификацију узрочника пироплазмозе коња (*Theileria equi* и *Babesia caballi*), што је и потврђено секвенцирањем.
- *T. equi* доводи до статистички значајних промена у одређеним хематолошким параметрима код инфицираних коња, и то до смањења RBC, HGB, HCT, MCHC и PLT ($P < 0,001$), односно повећања WBC ($P < 0,01$), GRA ($P < 0,05$) и MCV ($P < 0,001$).
- *T. equi* доводи до статистички значајних промена у одређеним биохемијским параметрима код инфицираних коња, као што је повећање концентрације укупних протеина, концентрације глобулина, активности AST, AP и LDH ($P < 0,001$), смањење концентрације албумина ($P < 0,001$), повећање концентрације глукозе ($P < 0,01$), повећање концентрације билирубина и

активности GGT ($P < 0,05$) и смањење концентрације гвожђа ($P < 0,05$).

- Код коња инфицираних са *T. equi* установљено је значајно повећање концентрације PНb ($P < 0,01$), активности SOD1 ($P < 0,001$), концентрације NO₂⁻ ($P < 0,001$), NO_x ($P < 0,05$), MDA ($P < 0,001$) и активности изоензима LDH-5 ($P < 0,05$); као и значајно смањење резистенције на хемолизу ($P < 0,001$), активности антиоксидативних ензима CAT ($P < 0,001$) и PON1 ($P < 0,001$) и концентрације тиолних група ($P < 0,05$).
- Статистички значајна повећања вредности параметара оксидативног стреса доводе до промене осмотске фрагилности ћелија, оштећења липида, протеина и ДНК, хемолизе и хепатоцелуларног оштећења и потврђују улогу оксидативног стреса у патогенези *T. equi* инфекције.
- Услед присуства узрочника пироплазмозе коња долази до статистички значајног ($P < 0,001$) оштећења ДНК ћелија домаћина, чиме је установљен још један негативан ефекат *T. equi* на коње, овог пута на њихов генетички интегритет.

8. ЛИТЕРАТУРА

- Abutarbush, S.M., Alqawasmeh, D.M., Mukbel, R.M., Al-Majali, A.M., 2012. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 72-78.
- Acici, M., Umur, S., Guvenc, T., Arslan, H.H., Kurt, M., 2008. Seroprevalence of equine babesiosis in the Black Sea region of Turkey. *Parasitology International*, 57, 198-200.
- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. In: Packer, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Orlando, Florida, USA, 121-126.
- Ahmed, J.S., 2002. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of piroplasmosis. *Parasitology Research*, 88, 48-50.
- Alapati, S.V., Mihas, A.A., 1999. When to suspect ischemic colitis: Why is this condition so often missed or misdiagnosed? *Postgraduate Medicine*, 105, 177-187.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research*, 463, 111-172.

- Alessia, D., Guglielmini, C., Daniela, C., Marco, P., Mario, C., 2007. Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: A case report. *The Veterinary Journal*, 174, 193-195.
- Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N.T., Thekiso, O.M., Yokoyama, N., Inoue, N., Igarashi, I., 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmosis. *Parasitology Research*, 100, 1165-1168.
- Alhassan, A., Pumidonming, W., Okamura, M., Hirata, H., Battsetseg, B., Fujisaki, K., Yokoyama, N., Igarashi, I., 2005. Development of a single round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*, 129, 43-49.
- Allen, P.C., Frerichs, W.M., Holbrook, A.A., 1975. Experimental acute *Babesia caballi* infections. II. Response of platelets and fibrinogen. *Experimental Parasitology*, 37, 373-379.
- Allred, D.R., 2003. Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Trends in Parasitology*, 19, 51-55.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T., Allsopp, B.A., 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, 108, 147-152.
- Allsopp, M.T.E.P., Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., 2007. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently healthy foals. *Veterinary Parasitology*, 148, 130-136.

- Alsaad, K.M., Alsaad, E.A., Al-Derawie, H.A., 2010. Clinical and diagnostic study of equine babesiosis in drought horses in some areas of Basrah province. *Journal of Animal Science*, 4, 16-22.
- Al-Saad, K., 2009. Acute babesiosis in foals. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 8, 5.
- Ambawat, H.K., Malhotra, D.V., Kumar, S., Dhar, S., 1999. Erythrocyte associated hemato-biochemical changes in *Babesia equi* infection experimentally produced in donkeys. *Veterinary Parasitology*, 85, 319-324.
- Amir, S., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G., 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel Short Communication. *Veterinary Parasitology*, 187, 558-562.
- Andersson, M., Agurell, E., Vaghef, H., Bolcsfoldi, G., Hellman, B., 2003. Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity *in vitro*? *Mutation Research*, 540, 43-55.
- Asgarali, Z., Coombs, D.K., Mohammed, F., Campbell, M.D., Caesar, E., 2007. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 144, 167-171.
- Asri Rezaei, S., Dalir-Naghadeh, B., 2006. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle infected with *Theileria annulata*. *Veterinary Parasitology*, 142, 179-186.

- Baghishani, H., Razmi, G.R., Yaghfour, S., Dezaki, A.A., 2011. Status of some oxidative stress biomarkers in sheep naturally infected with theileriosis. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 1, 499–504.
- Bahrami, S., Ghadr, A.R., Mirabdollahi, S.M., Fayed, M.R., 2014. Diagnosis of subclinical equine theileriosis in center of Iran using parasitological and molecular methods. *Tropical Biomedicine*, 31, 110–117.
- Banerjee, D.P., Singh, B., Gautam, O.P., Shanti, S., 1977. Cell-mediated immune response in equine babesiosis. *Tropical Animal Health and Production*, 9, 153–158.
- Bashiruddin, J.B., Camma, C., Rebelo, E., 1999. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 84, 75–83.
- Battsetseg, B., Xuan, X., Ikadai, H., Bautista, J.L.R., Byambaa, B., Boldbaatar, D., Battur, B., Battsetseg, G., Batsukh, Z., Igarashi, I., Nagasawa, H., Mikami, T., Fujisaki, K., 2001. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *International Journal for Parasitology*, 31, 384–386.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276–287.
- Beutler, E., 1983. Osmotic fragility. In: Williams, W.J., Beutler, E., Erslev, A.J., Lichtman, M.A. (Eds.), *Hematology*. McGraw-Hill Book Co, New York, 1626–1627.

- Brunelli, L., Yermilov, V., Beckman, J.S., 2001. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 709-714.
- Brüning, A., 1996. Equine piroplasmosis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, 152, 139-151.
- Brüning, A., Phipps, P., Posnett, E., Canning, E.U., 1997. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis. *Veterinary Parasitology*, 68, 11-26.
- Buettner, G.R., 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 535-543.
- Butler, C.M., van Gils, J.A., van der Kolk, J.H., 2005. A literature review of equine piroplasmosis after an episode of acute babesiosis in a Dutch Standardbred foal after a stay in Normandy. *Tijdschr Diergeneeskd*, 130, 726-731.
- Camacho, A.T., Guitian, F.J., Pallas, E., Gestal, J.J., Olmeda, A.S., Habela, M.A., Telford 3rd, S.R., Spielman, A., 2005. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. *Tropical Animal Health and Production*, 37, 293-302.
- Cantu-Martinez, M.A., Segura-Correa, J.C., Silva-Paez, M.L., Avalos-Ramirez, R., Wagner, G.G., 2012. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico. *Journal of Parasitology*, 98, 869-870.

- Casteel, S.W., Turk, J.R., 2002. Collapse/sudden death. In: Smith BP, editor. Large animal internal medicine. St. Louis, MO: Mosby.
- Chaudhuri, S., Varshney, J.P., Patra, R.C., 2008. Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxides level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Research in Veterinary Science*, 85, 120–124.
- Chen, K., Suh, J., Carr, A.C., Morrow, J.D., Zeind, J., Frei, B., 2000. Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 279, 1406–1412.
- Chhabra, S., Ranjan, R., Uppal, S.K., Singla, L.D., 2012. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. *Journal of Parasitic Diseases*, 36, 31–33.
- Ciftci, G., Ural, K., Aysul, N., Cenesiz, S., Guzel, M., Pekmezci, D., Sogut, M.Ü., 2014. Investigation of the 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, total antioxidant and nitric oxide levels of serum in dogs infected with *Babesia vogeli*. *Veterinary Parasitology*, 204, 388–391.
- Cingi, C.C., Utuk, A.E., Karafakioglu, Y.S., Balkaya, I., Piskin, F.C., Fidan, A.F., 2012. Serum lipid and protein oxidation and anti-oxidant status in horses naturally infected with *Theileria equi*. *Revue de medecine veterinaire*, 163, 183–186.
- Collins, A., Harrington, V., 2002. Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis*, 17, 489–493.

- Cotelle, S., Ferard, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34, 246-255.
- Criado-Fornelio, A., Gonzalez-del-Rio, M.A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2004. The “expanding universe” of piroplasms. *Veterinary Parasitology*, 119, 337-345.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 113, 189-201.
- Davitkov, D., Davitkov, D., Vucicevic, M., Stanisic, Lj., Radakovic, M., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2017. A molecular and haematological study of *Theileria equi* in Balkan donkeys. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65, 234-241.
- 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 Veterinaria Hungarica*, 63, 199-208.
- Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Slijepcevic, D., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2016. Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitologica*, 61, 337-342.
- De Oliveira, L.R.C., Cezário, G.A.G., de Lima, C.R.G., Nicolete, V.C., Peresi, E., de Sábio, M.T., 2011. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mutation Research*, 723, 177-181.

- de Waal, D.T., 1992. Equine piroplasmosis: a review. *The British veterinary journal*, 148, 6-14.
- de Waal, D.T., van Heerden, J., 1994. Equine Piroplasmosis. In: Coetzer J.A.W., Tustin R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock*, New York, Oxford University Press, 425-433.
- de Waal, D.T., van Heerden, J., 2004. Equine piroplasmosis. In: Coetzer JAW, Tustin RC, eds. *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd ed. Cape Town, South Africa: Oxford University Press, 425-433.
- de Waal, D.T., van Heerden, J., Potgieter, F.T., 1987. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Journal of Veterinary Research*, 54, 561-568.
- Deger, S., Deger, Y., Bicek, K., Ozdal, N., Gul, A., 2009. Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: Status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29, 743-747.
- Diana, A., Guglielmini, C., Candini, D., Pietra, M., Cipone, M., 2007. Cardiac arrhythmias associated with piroplasmosis in the horse: A case report. *Veterinary Journal*, 174, 193-195.
- Dimitrijevic, B., Borozan, S., Katic-Radivojevic, S., Stojanovic, S., 2012. Effects of infection intensity with *Strongyloides papillosus* and albendazole treatment on development of oxidative/nitrosative stress in sheep. *Veterinary Parasitology*, 186, 364-375.

- Dkhil, M.A., Abdel-Baki, A.S., Al-Quraishy, S., Abdel-Moneim, A.E., 2013. Hepatic oxidative stress in Mongolian gerbils experimentally infected with *Babesia divergens*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 4, 346–351.
- Donnellan, C.M., Marais, H.J., 2009. Equine piroplasmiasis. In: Mair TS, Hutchinson RE, eds. *Infectious Diseases of the Horse*. Cambridgeshire, England, UK: EVJ Ltd; 333–340.
- Donnelly, J., Phipps, L.P., Watkins, K.L., 1982. Evidence of maternal antibodies to *Babesia equi* and *B. caballi* in foals of seropositive mares. *Equine Veterinary Journal*, 14, 126–128.
- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B., Ohshima, H., 1999. Peroxynitrite: An endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 1068–1077.
- El-Sayed, N.M., Aly, E.M., 2014. *Toxoplasma gondii* infection can induce retinal DNA damage: An experimental study. *International Journal of Ophthalmology*, 7, 431–436.
- Ellman, G.K., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Erbsloh, J.K., 1975. Babesiosis in the newborn foal. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 23, 725–726.
- Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Asri-Rezaei, S., Dalir-Naghadeh, B., Malekinejad, H., Jalilzadeh-Amin, G., 2014. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. *Veterinary Parasitology*, 205, 38–45.

- Fairbanks, V., Klee, G.G., 1994. Biochemical aspects of haematology. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (Eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders.
- Frerichs, W.M., Holbrook, A.A., 1974. Feeding mechanisms of *Babesia equi*. *The Journal of Protozoology*, 21, 707–709.
- Frerichs, W.M., Johnson, A.J., Holbrook, A.A., 1969. Equine piroplasmosis: Attempts to infect laboratory animals with *Babesia equi*. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 1333–1336.
- Friedhoff, K.T., Soule C., 1996. An account on equine babesiosis. *Revue scientifique et technique*, 15, 1191–1201.
- Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Muller, I., 1990. Haemoparasites of equines: Impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique*, 9, 1187–1194.
- Garcia-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernandez, E., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Almeria, S., Jaen-Tellez, J.A., Gutierrez-Palomino, P., Arenas, A., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *The Veterinary Journal*, 195, 172–178.
- Georges, K.C., Ezeokoli, C.D., Sparagano, O., Pargass, I., Campbell, M.R., D'Abadie, R., Yabsley, M.J., 2011. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Veterinary Parasitology*, 175, 363–366.
- Gopalakrishnan, A., Maji, C., Dahiya, R.K., Suthar, A., Kumar, R., Kumar, S., 2015. Oxidative damage inflicted by *Theileria equi* on horse erythrocytes

when cultured in vitro by microaerophilous stationary phase technique. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35, 763–767.

Grandi, G., Molinari, G., Tittarelli, M., Sasseria, D., Kramer, L.H., 2011. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 11, 1–2.

Guimaraes, A.M., Lima, J.D., Ribeiro, M.F., Camargos, E.R., Bozzi, I.A., 1998. Ultrastructure of sporogony in *Babesia equi* in salivary glands of adult female *Boophilus microplus* ticks. *Parasitology Research*, 84, 69–74.

Hailat, N.Q., Lafi, S.Q., Al-Darraji, A.M., Al-Ani, F.K., 1997. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 68, 1–8.

Hall, R., Adamson, R., Boulter, N., 2002. Prime-boost: the way forward for recombinant vaccines against apicomplexan parasites. A *Theileria* perspective. *Parasitology Research*, 88, 45–47.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. third ed. Oxford University Press, New York.

Heim, A., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., Costa-Junior, L.M., Bastos, C.V., Cabral, D.D., Hirzmann, J., Pfister, K., 2007. Detection and molecular characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* isolates from endemic areas of Brazil. *Parasitology Research*, 102, 63–68.

Heuchert, C.M.S., De Giulli Jr., V., De Athaide, D.F., Bose, R., Friedhoff, K.T., 1999. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 85, 1–11.

- Holman, P.J., Frerichs, W.M., Chieves, L, Wagner, G.G., 1993. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 698-701.
- Hornok, S., Edelhofer, R., Földvári, G., Joachim, A., Farkas, R., 2007. Serological evidence for *Babesia canis* infection of horses and an endemic focus of *B. caballi* in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55, 491-500.
- Ibrahim, A.K., Gamil, I.S., Abd-El baky, A.A., Hussein, M.M., Tohamy, A.A., 2011. Comparative Molecular and Conventional Detection Methods of *Babesia equi* in Egyptian Equine. *Global Veterinaria*, 7, 201-210.
- Jackson, A.L., Loeb, L.A., 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research*, 477, 7-21.
- Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E., Hines, S.A., Baszler, T.V., Katz, J.B., Hennager, S.G., Knowles D.P., 1999. Detection of equine antibodies to *Babesia caballi* by recombinant *B. caballi* rhoptry-associated protein 1 in a Competitive-Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2285-2290.
- Kappmeyer, L.S., Thiagarajan, M., Herndon, D.R., Ramsay, J.D., Caler, E., Djikeng, A., Gillespie, J.J., Lau, A.O., Roalson, E.H., Silva, J.C., Silva, M.G., Suarez, C.E., Ueti, M.W., Nene, V.M., Mealey, R.H., Knowles, D.P., Brayton, K.A., 2012. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*. *BMC Genomics*, 13, 603.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of

Theileria equi from equine blood samples. *Veterinary Parasitology*, 151, 158–163.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., Hocevar, B.A., 2010. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, 38, 96–109.

Knowles, D.Jr., 1996. Equine babesiosis (piroplasmosis): a problem in the international movement of horses. *The British Veterinary Journal*, 152, 123–126.

Knowles, D.P., Kappmeyer, L.S, Stiller, D., Hennager, S.G, Perryman, L.E., 1992. Antibody to recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *B. equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 3122–3126.

Knowles, D.P.Jr., Kappmeyer, L.S., Perryman, L.E. 1994. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and Immunity*, 62, 1909–1913.

Knowles, D.P.Jr., Perryman, L.E., Goff, W.L., Miller, C.D., Harrington, R.D., Gohram, J.R., 1991. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. *Infection and Immunity*, 59, 2412–2417.

Knowles, R.C., Mathis, R.M., Bryant, J.E., 1966. Equine piroplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 148, 407–410.

Kouam, M.K., Kantzoura, V., Gajadhar, A.A., Theis, J.H., Papadopoulos, E., Theodoropoulos, G., 2010. Seroprevalence of equine piroplasms and host-related factors associated with infection in Greece. *Veterinary Parasitology*, 169, 273–278.

- Krause, P.J., 2003. Babesiosis diagnosis and treatment. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 3, 45–51.
- Krylov, M.V., 1982. Piroplasmids (fauna, systematics, evolution). Piroplazmidy. Nauka: Leningrad, Russia [summarized in abstract 237. Protozoological Abstracts, 6:24].
- Kucukkurt, I., Cigerci, I.H., Ince, S., Kozan, E., Aytekin, I., Eryavuz, A., Fidan, A.F., 2014. The effects of babesiosis on oxidative stress and DNA damage in Anatolian black goats naturally infected with *Babesia ovis*. *Iranian Journal of Parasitology*, 9, 90–98.
- Kumar, S., Kumar, R., Sugimoto, C., 2009. A perspective on *Theileria equi* infections in donkeys. *The Japanese Journal of Veterinary Research*, 56, 171–180.
- Kuttler, K.L., Gipson, C.A., Goff, W.L., Johnson, L.W., 1986. Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *American Journal of Veterinary Research*, 47, 1668-1670.
- Lewis, B.D., Penzhorn, B.L., Volkmann, D.H., 1999. Could treatment of pregnant mares prevent abortions due to equine piroplasmiasis? *Journal of the South African Veterinary Association*, 70, 90–91.
- Lotfollahzadeh, S., Rahmani, M., Mohri, M., Madadgar, O., 2011. Changes in serum iron concentration and hepatic enzyme activities in cattle infected with *Theileria annulata* and *Babesia bigemina*. *Comparative Clinical Pathology*, 21, 829–832.

- Luzzatto, L., Roper, D., 1995. Investigation of the hereditary haemolytic anaemias: membrane and enzyme abnormalities. In: Dacie, J.V., Lewis, J.M. (Eds.), *Practical Haematology*, 6th Ed. Churchill Livingstone, London, 215–247.
- Lykkesfeldt, J., Viscovich, M., Poulsen, H.E., 2003. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 1439–1447.
- Mahoney, D.F., Wright, I.G., Frerichs, W.M., Groenendyk, S., O'Sullivan, B.M., Roberts, M.C., Waddell, A.H., 1977. The identification of *Babesia equi* in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 53, 461–464.
- Marcon, F., Andreoli, C., Rossi, S., Verdina, A., Galati, R., Crebelli, R., 2003. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy. *Mutation Research*, 541, 1–8.
- Maurer, F.D., 1962. Equine piroplasmiasis – Another emerging disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 141, 699–702.
- McFarlane, D., Dybdal, N., Donaldson, M.T., Cribb, A.E., 2005. Nitration and increased alpha-synuclein expression associated with dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction. *Journal of Neuroendocrinology*, 17, 73–80.
- Mehlhorn, H., Schein, E., 1998. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi*. *Parasitology Research*, 84, 467–475.

- Milanović, Z., Ilić, A., Andrić, J. F., Radonjić, V., Beletić, A., Filipović, M. K., 2017. Acute-phase response in *Babesia canis* and *Dirofilaria immitis* co-infections in dogs. *Ticks and tick-borne diseases*, 8, 907-914.
- Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide*, 5, 62-71.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170-3175.
- Moller, P., 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96, 1-42.
- Moltmann, U.G., Mehlhorn, H., Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W.P., Zweygarth, E., 1983. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: An *in vivo* and *in vitro* study. *Journal of Parasitology*, 69, 111-120.
- Moretti, A., Mangili, V., Salvatori, R., Maresca, C., Scoccia, E., Torina, A., Moretta, I., Gabrielli, S., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2010. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. *The Veterinary Journal*, 184, 346-350.
- Muhn timer, C.J., Jefferies, R., Morgan-Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2002. *Babesia gibsoni* infection in three dogs in Victoria. *Australian Veterinary Journal*, 80, 606-610.

- Nagore, D., Garcia-Sanmartin, J., Garcia-Perez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2004. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*, 123, 41–54.
- Nazifi, S., Razavi, S.M., Kiani Amin, P., Rakhshandehroo, E., 2011. Evaluation of erythrocyte antioxidant mechanisms: Antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and serum trace elements associated with progressive anemia in ovine malignant theileriosis. *Parasitology Research*, 109, 275–281.
- Neitz, W.O., 1956. Classification, transmission, and biology of piroplasms of domestic animals. *Annals of New York Academy of Sciences*, 64, 56–111.
- Nel, M., Lobetti, R.G., Keller, N., Thompson, P.N., 2004. Prognostic value of blood lactate, blood glucose and hematocrit in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18, 471–476.
- Nikolic-Kokic, A., Blagojevic, D., Spasic, M., 2010. Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes. *Journal of Medical Biochemistry*, 29, 189–195.
- OIE, 2017. World Animal Health Information Database Interface. http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines
- Olmeda, A.S., Armstrong, P.M., Rosenthal, B.M., Valladares, B., del Castillo, A., de Armas, F., Miguelez, M., Gonzalez, A., Rodriguez, J.A., Spielman, A., Telford 3rd, S.R., 1997. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, 67, 229–234.

- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123. 291-298.
- Payne, C.M., Bernstein, C., Bernstein, H., 1995. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signaltransduction pathways. *Leukemia and Lymphoma*, 19, 43-93.
- Phipps, L.P., Otter, A., 2004. Transplacental transmission of *Theileria equi* in two foals born and reared in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 154, 406-408.
- Pitel, P.H., Pronost, S., Scrive, T., Leon, A., Richard, E., Fortier, G., 2010. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Veterinary Parasitology*, 170, 182-184.
- Purchase, H.S., 1947. Piroplasmosis in foal at birth. *Veterinary Record*, 59, 449.
- Quintao-Silva, M.G., Ribeiro, M.F., 2003. Infection rate of *Babesia* spp. sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from an area of enzootic stability in the State of Minas Gerais, Brazil. *The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 999-1002.
- Radakovic, M., Davitkov, D., Borožan, S., Stojanovic, S., Stevanovic, J., Krstic, V., Stanimirovic, Z., 2016. Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal*, 217, 112-118.
- Radakovic, M., Djelic, N., Stanimirovic, Z., Plecas-Solarovic, B., Spremo-Potparevic, B., Zivkovic, L., Bajic, V., 2011. Evaluation of the effects of

ephedrine on human lymphocytes in the comet assay. *Acta Veterinaria - Beograd*, 61, 363-371.

Radakovic, M., Stevanovic, J., Djelic, N., Lakic, N., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., Stanimirovic, Z., 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *Journal of Biosciences*, 38, 53-62.

Rampersad, J., Cesar, E., Campbell, M.D., Samlal, M., Ammons, D., 2003. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Veterinary Parasitology*, 114, 81-87.

Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722, 225-254.

Ros García, A., M'ghirbi, Y., Hurtado, A., Bouattour, A., 2013. Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infection, Genetics and Evolution*, 17, 33-37.

Rossi, G., Ibba, F., Meazzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S., 2014. Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal*, 199, 143-149.

Rothschild, C.M., 2013. Equine piroplasmosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 497-508.

Rudolph, W., Correa, J., Zurita, L., Manley, W., 1975. Equine piroplasmosis: Leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *British Veterinary Journal*, 131, 601-609.

- Ruegg, S.R., Torgerson, P.R., Doherr, M.G., Deplazes, P., Böse, R., Robert, N., Walzer, C., 2006. Equine piroplasmoses at the reintroduction site of the przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*) in Mongolia. *Journal of wildlife disease*, 43, 518–526.
- Saleh, M.A., 2009. Erythrocytic oxidative damage in crossbred cattle naturally infected with *Babesia bigemina*. *Research in Veterinary Science*, 86, 43–48.
- Salem, N.Y., El-Sherif, M.A., 2015. Malondialdehyde status, trace minerals and haematologic results of anemic - *T. equi* infected Egyptian horses. *International Journal of Veterinary Science*, 4, 118-122.
- Salib, F.A., Youssef, R.R., Rizk, L.G., Said, S.F., 2013. Epidemiology, diagnosis and therapy of *Theileria equi* infection in Giza, Egypt. *Veterinary World*, 6, 76-82.
- Schein, E., 1988. Equine babesiosis. In: *Babesiosis of Domestic Animals and Man*, ed. Ristic, M. CRC Press, Boca Raton, FL. 197–208.
- Schein, E., Rehbein, G., Voigt, W.P., Zweygarth, E., 1981. *Babesia equi* (Laveran 1901) 1. Development in horses and in lymphocyte culture. *Tropenmedizin Und Parasitologie*, 32, 223–227.
- Scion Corporation, 2000. Scion Image software, version beta 4.0.2, 82 Worman's Mill Ct., Frederick, Maryland 21701.
- Scoles, G.A., Hutcheson, H.J., Schlater, J.L., Hennager, S.G., Pelzel, A.M., Knowles, D.P., 2011. Equine piroplasmosis associated with *Amblyomma cajennense* Ticks, Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1903-1905.

- Sevnic, F., Maden, M., Kumas, C., Sevnic, M., Ekici, O.C., 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Veterinary Parasitology*, 156, 173–177.
- Silvey, R.E., 1996. Babesiosis in a foal. *Veterinary Record*, 139, 428.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184–191.
- Stevanovic, J., Simeunovic, P., Gajic, B., Lakic, N., Radovic, D., Fries, I., Stanimirovic, Z., 2013. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*, 44, 522–536.
- Stiller, D., Goff, W.L., Johnson, L.W., Knowles, D.P., 2002. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental vectors of *Babesia equi* to equids. *Journal of Medical Entomology*, 39, 667–670.
- Takeet, M.I., Adeleye, A.I., Adebayo, O.O., Akande, F.A., 2009. Haematology and serum biochemical alteration in stress induced equine theileriosis. A case report. *The Science World Journal*, 4, 19-21.
- Taylor, W.M., Bryant, J.E., Anderson, J.B., Willers, K.H., 1969. Equine piroplasmiasis in the United States—A review. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 155, 915–919.
- Tenter, A.M., Friedhoff, K.T., 1986. Serodiagnosis of experimental and natural *Babesia equi* and *B. caballi* infections. *Veterinary Parasitology*, 20, 49–61.

- Tentori, L., Salvati, A.M., 1981. Hemoglobinometry in human blood. *Methods in Enzymology*, 76, 707-715.
- Thompson, P.H., 1969. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 155, 454-457.
- Tice, R.R., 1995. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. Phillips D.H. Venitt S. eds. *Environ Mutagen*, Bios Scientific Publishers Oxford, United Kingdom, 315-339.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D., Huang, P., 2008. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1343-1374.
- Traverso, N., Menini, S., Maineri, E.P., Patriarca, S., Odetti, P., Cottalasso, D., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., 2004. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *The Journal of Gerontology*, 59, 890-895.
- Ueti, M.W., Mealey, R.H., Kappmeyer, L.S., White, S.N., Kumpula-McWhriter, N., Pelzel, A.M., Grause, J.F., Bunn, T.O., Schwartz, A., Traub-Dargatz, J.L., Hendrickson, A., Benjamin, E., Guthrie, A.J., Fowler, W.K., Knowles, D.P., 2012. Re-emergence of the apicomplexan *Theileria equi* in the United States: Elimination of persistent infection and transmission risk. *PLoS One*, 7, 44713.
- Viljoen, A., Saulez, M.N., Donnellan, C.M., Bester, L., Gummow, B., 2009. After-hours equine emergency admissions at a university referral hospital (1998-2007): Causes and interventions. *Journal of the South African Veterinary Association*, 80, 169-173.

World Animal Health Information Database (WAHID). Available at:
<http://www.oie.int/>

Xu, Y., Zhang, S., Huang, X., Igarashi, I., Fujisaki, K., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T., 2003. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Jilin province of China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 1015–1017.

Xuan, X., Chahan, B., Huang, X., Yokoyama, N., Makala, L. H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Maruyama, S., Sakai, T., and Mikami, T., 2002. Diagnosis of equine piroplasmiasis in Xinjiang province of China by the enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant antigens. *Veterinary Parasitology*, 108, 179–182.

Xuan, X., Nagai, A., Battsetseg, B., Fukumoto, S., Makala, L.H., Inoue, N., Igarashi, I., Mikami, T., Fujisaki, K., 2001. Diagnosis of equine piroplasmiasis in Brazil by serodiagnostic methods with recombinant antigens. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 63, 1159–1160.

Yin, C., Pettigrew, A., Loftus, J.P., Black, S.J., Belknap, J.K., 2009. Tissue concentrations of 4-HNE in the black walnut extract model of laminitis: Indication of oxidant stress in affected laminae. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129, 211–215.

Yoshida, M., Takakuwa, Y., 1997. Method for the simultaneous assay of initial velocities of lactate dehydrogenase isoenzymes following gel electrophoresis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 34, 167–175.

Zobba R., Ardu M., Nicollini S., Chessa B., Manna L., Cocco R., Parpaglia M.L.P.
2008. Clinical and laboratory findings in equine piroplasmiasis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 301-308.

БИОГРАФИЈА

Дарко Давитков рођен је 20. новембра 1987. године у Пироту. Основну и средњу школу завршио је у Димитровграду. Студије ветеринарске медицине у Београду уписао је 2006. године, а дипломирао у марту 2012. године са просечном оценом 9,91 (девет и 91/100) и стекао звање доктора ветеринарске медицине. Од стране Универзитета у Београду додељена му је повеља за студента генерације. Током студија награђиван је пет пута од стране Факултета поводом Дана Факултета 2007-2011. године и био је носилац бројних стипендија (стипендије Министарства образовања и спорта 2007-2009., стипендије Универзитета у Београду 2009/2010, стипендије Фонда за младе таленте „Доситеја“ 2010/2011). Након дипломирања, исте године уписао је Докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду, одслушао све три године и положио све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,95 (девет и 95/100).

Од 11.03.2013. год. Дарко Давитков је ангажован као истраживач сарадник на пројекту под називом „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“ (руководилац проф. др Зоран Станимировић; ев. бр. 46002) које финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Од марта 2015. године Дарко Давитков је запослен као асистент на Катедри за болести копитара, месоједа, живине и дивљачи Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Од школске 2012/2013 године изводи практичну наставу из предмета Општа клиничка дијагностика и Болести малих животиња.

Учествовао је на бројним симпозијумима и конгресима у земљи и иностранству. У домаћим и страним часописима укупно је публиковао 18 стручних и научних радова. Од тог броја, осам радова је публиковао у часописима са SCI листе (1 рад у категорији M21, 5 радова у категорији M22 и 2 рада у категорији M23).

Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписани Дарко Давитков

број уписа 16/1

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом „Клиничко-епизоотиолошко испитивање пироплазмозе коња на простору централног Балкана и њен утицај на оштећење ДНК домаћина“

- 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 ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 19.04.2018. год.

Потпис докторанда

Прилог 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И
ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА**

Име и презиме аутора: Дарко Давитков

Број уписа: 16/1

Студијски програм: докторске академске студије

Наслов рада: „Клиничко-епизоотиолошко испитивање пироплазмозе коња на простору централног Балкана и њен утицај на оштећење ДНК домаћина“

Ментори: Др Јевросима Стевановић, ванредни професор
Др Вања Крстић, редовни професор

Потписани Дарко Давитков

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао 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, 19.04.2018. год.

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: „Клиничко-епизоотиолошко испитивање пироплазмозе коња на простору централног Балкана и њен утицај на општећење ДНК домаћина“, која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао 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.

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

У Београду, 19.04.2018. год.

Потпис докторанда
