

**MOLEKULARNA DETEKCIJA BABESIA SPP. U KRPELJIMA  
UZORKOVANIM SA ASIMPTOMATSKIH PASA NA PODRUČJU  
ODREĐENIH BEOGRADSKIH OPŠTINA\***

***MOLECULAR DETECTION OF BABESIA SPP. IN TICKS SAMPLED FROM  
ASYMPTOMATIC DOGS IN THE AREA OF SOME BELGRADE MUNICIPALITIES***

**Davitkov Darko, Terzić Srećko, Davitkov Dajana, Radaković Milena, Gajić Bojan,  
Krstić Vanja, Stanimirović Zoran\*\***

*Babezioza domaćih životinja predstavlja vektorski prenosivo i klinički veoma značajno oboljenje, uzrokovano protozoama rodova Babesia i Theileria. Uzročnici koji mogu da izazovu oboljenje kod pasa u Evropi su: Babesia canis, B. gibsoni, B. vogeli i B. microti-like. Dijagnostika babezioze pasa se dugo vremena bazirala na vizuelizaciji uzročnika pregledom obojenog krvnog razmaza pod mikroskopom, dok se danas sve više koriste molekularne metode detekcije u preciznoj, specijskoj dijagnostici. Cilj ovog rada je bila molekularna detekcija različitih uzročnika babezioze pasa u krpeljima uzorkovanim sa asimptomatskih pasa na prostoru određenih beogradskih opština, radi boljeg razumevanja epizootiološke situacije. Sa tri lokacije u Beogradu je prikupljeno 49 krpelja, uzorkovanih sa pasa bez simptoma bolesti. Izvršena je determinacija krpelja, a nakon toga je izolovana DNK za molekularna ispitivanja. Prvo je urađena reakcija lančane polimerizacije (PCR) za utvrđivanje vrsta iz roda Babesia, a nakon toga i određivanje polimorfizma u dužini restrikcionih fragmenata (RFLP) u cilju specijske identifikacije uzročnika. Od ukupnog broja ispitanih krpelja 18,34% je bilo pozitivno na Babesia spp. RFLP metodom je u dva slučaja (4,08%) identifikovana B. gibsoni, dok u 7*

\* Rad primljen za štampu 27.09.2016.

\*\* Davitkov Darko, dr vet.med., asistent, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Terzić Srećko, student, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; Davitkov Dajana, dr vet. med., dr Radaković Milena, naučni saradnik, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija, dr Gajić Bojan, asistent, Katedra za parazitologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Krstić Vanja, profesor, Katedra za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija; dr Stanimirović Zoran, profesor, Katedra za biologiju, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Srbija

slučajeva (14,92%) nije bilo restriktivnih mesta za korišćene enzime, što ukazuje da se najverovatnije radilo o *B. canis*. Pozitivni krpelji na uzročnike babezioze su bili *Dermacentor reticulatus* (4 slučaja), *Rhipicephalus sanguineus* (4 slučaja) i *Ixodes ricinus* (1 slučaj). Ovaj rad potvrđuje prisustvo *Babesia* spp. u krpeljima uzorkovanim sa asimptomatskih pasa na teritoriji grada Beograda, kao i značaj PCR-RFLP metode u dijagnostici i identifikaciji uzročnika babezioze pasa. Prvi put u Srbiji je utvrđeno prisustvo *B. gibsoni* kod krpelja (vrsta *Rhipicephalus sanguineus*)

**Ključne reči:** *Babesia canis/gibsoni*, Beograd, krpelji, PCR-RFLP

### Uvod / Introduction

Babezioza domaćih životinja predstavlja vektorski prenosivo oboljenje koje izazivaju protozoe iz rodova *Babesia* i *Theileria* (Irwin, 2009). Molekularnim metodama detekcije potvrđeno je svega četiri uzročnika ovog oboljenja kod pasa na području Evrope: *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli*, *B. microti-like* (Solano-Gallego i Baneth, 2011; Matijatko i sar., 2012). Kliničke manifestacije babezioze pasa mogu da variraju, od subkliničkih do veoma ozbiljnih (čak i sa smrtnim ishodom) i zavise od faktora kao što su imunološki status jedinke, starost životinje, prisustvo oboljenja druge etiologije i patoloških procesa (Irwin, 2009). Najčešći simptomi babezioze pasa su apatija, anoreksija, groznica, promenjena boja urina, blede sluznice, ikterus, splenomegalija, povraćanje i hipotenzija (Matijatko i sar., 2012; Davitkov i sar., 2015).

Geografska rasprostranjenost uzročnika babezioze pasa je svakako u sprezi sa rasprostranjenošću adekvatnih vektora, izuzimajući *B. gibsoni* kod koje je dokazan i direktan prenos između pasa (Jefferies i sar., 2007; Yeagley i sar., 2009). Glavni vektori koji učestvuju u širenju ovog oboljenja su krpelji *Dermacentor reticulatus* (*B. canis*), *Rhipicephalus sanguineus* (*B. vogeli*, *B. gibsoni*) i *Ixodes hexagonus* (*B. microti-like*) (Solano-Gallego i Baneth, 2011). Od momenta pričvršćivanja krpelja za životinju pa do formiranja infektivnih oblika prođe najčešće 2-3 dana. Pretpostavlja se da promena temperature i prisustvo krvi u crevu krpelja deluju kao podsticaj za sazrevanje infektivnih sporozoita. Životinja se inficira kada se sporozoit ubrizga u kožu domaćina pljuvačkom krpelja tokom hranjenja krvlju. Vrste iz roda *Babesia* se mogu prenositi transstadijalno (kroz razvojne stadijume krpelja), ali i transovarijalno (Taboada i Lobetti, 2006; Uilenberg, 2006). Shodno tome, uzročnici babezioze pasa se mogu prenositi generacijama krpelja, a da uopšte ne dolaze u kontakt sa inficiranom jedinkom (Chauvin i sar., 2009).

Detekcija babezija na obojenom krvnom razmazu svetlosnom mikroskopijom je godinama bila standardna dijagnostička tehnika. Vizuelna detekcija babezija u krvnom razmazu na osnovu prisustva merozoita u eritrocitima može u pojedinim slučajevima za kratko vreme obezbediti dijagnostiku oboljenja na nivou roda, dok je za određivanje vrste neophodna reakcija lančane polimerizacije (*Polymerase*

*chain reaction* - PCR). Ogromna prednost molekularnih metoda u odnosu na tradicionalne metode dijagnostike babezioze pasa jeste njihova značajno veća osetljivost i specifičnost (Bashiruddin i sar., 1999). PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) metoda je brza, pristupačna i često korišćena tehnika za molekularnu identifikaciju parazitskih vrsta (Solano-Gallego i sar., 2008; Stevanovic i sar., 2011; Stevanovic i sar., 2013). Specijska identifikacija uzročnika je od ogromnog značaja u odabiru adekvatne terapije, predviđanju toka bolesti i svakako od neprikosnovenog značaja u praćenju globalne epizootiološke situacije.

Prevalencija *Babesia* spp. u krpeljima na području Evrope je različita u različitim regijama: 0,10% do 0,90% na severu Poljske (Cieniuch i sar., 2009), 0,85% na severu Italije (Cassini i sar., 2010), 2,30% na jugu i 14,70% na severu Slovačke (Kubelová i sar., 2011), 2,70% u Luksemburgu (Reye i sar., 2010), 29,90% u Mađarskoj (Földvári i sar., 2007), a u Austriji čak 51,70% (Blaschitz i sar., 2008). Na području severne Srbije je sprovedeno istraživanje 2012. godine upotrebom molekularnih metoda detekcije, kada je kod krpelja prikupljenih u prirodi utvrđena prevalencija 10,61% (Mihaljica i sar., 2012).

Cilj ovog rada je bila molekularna detekcija različitih uzročnika babezioze pasa u krpeljima sakupljenim sa asimptomatskih pasa na prostoru grada Beograda, radi boljeg razumevanja epizootiološke situacije.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

##### **Ispitivani krpelji / *Analysed ticks***

Ispitano je 49 krpelja skinutih sa asimptomatskih pasa, poreklom iz 3 beogradske opštine (Savski venac – 18 krpelja, Novi Beograd – 11 krpelja, Zemun – 20 krpelja). Svi uzorci su bili pojedinačni, odnosno sa svakog psa je skinut samo po jedan krpelj. Izvršena je determinacija vrsta krpelja na osnovu standardnih taksonomskih ključeva (Pomerancev, 1950). Nakon toga, svaki krpelj je stavljen u obeleženu, sterilnu epruvetu zapremine 1,5ml, preliven 70% alkoholom i čuvan u frižideru na temperaturi od 4°C do trenutka izolacije DNK.

##### **Izolacija DNK, PCR i PCR-RFLP / *DNA isolation, PCR and PCR-RFLP***

Nakon eliminacije 70% alkohola iz epruveta, svaki krpelj je ispran PBS puferom i prebačen u novu sterilnu epruvetu zapremine 1,5 ml i preliven sa 0,5ml PBS pufera. Maceracija krpelja je vršena sterilnim štapićima predviđenim za homogenizaciju uzoraka. Izolacija DNK je vršena korišćenjem komercijalnog kita „QIAamp DNK Tissue kit“ (Qiagen), u skladu sa uputstvom proizvođača. Izolovana DNK je čuvana na -20°C do PCR amplifikacije.

*In vitro* kloniranje fragmenta DNK je obavljeno putem reakcije lančane polimerizacije, odnosno putem PCR amplifikacije u aparatu

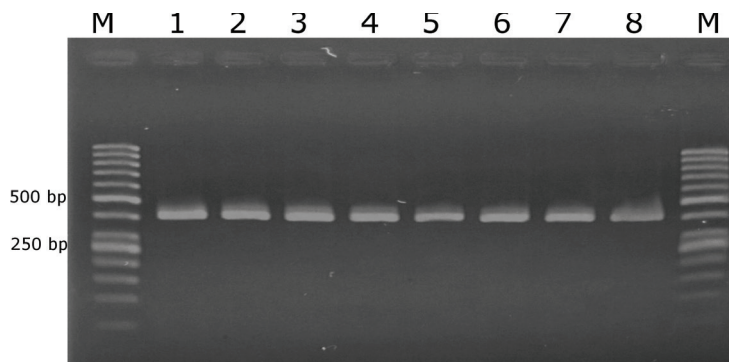
koji ima mogućnost brze promene temperaturnih uslova (Stevanović i sar., 2011). Za potrebe detekcije parazita roda *Babesia* korišćeni su prajmeri PIRO-A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3') i PIRO-B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3'), koji umnožavaju segment veličine oko 410 bp 18S-rRNA gena *Babesia* spp. (Olmeda i sar., 1997). Sve PCR reakcije su izvođene u aparatu Multigene Gradient Thermal Cycler (Labnet International Inc.). 25 µL PCR reakciona smeša je sadržala 1×PCR-pufer (Kapa Biosystems), 1,5 µM MgCl<sub>2</sub> (Kapa Biosystems), 100 µM dNTP (Kapa Biosystems), 2 µM svakog prajmera, 0,5 U Taq polimeraze (Kapa Biosystems) i 5 µL izolovane DNK.

Početna denaturacija se odvijala na 95°C tokom 3 minuta, zatim je u 40 ciklusa ponovljena denaturacija 30 sekundi na 94°C, hibridizacija 30 sekundi na 62°C i ekstenzija na 72°C tokom 1 minuta. Finalna DNK ekstenzija se odvijala na 72°C tokom 7 minuta. Produkti PCR amplifikacije su razdvojeni elektroforezom (pri struji od 50 mA i naponu od 50V u trajanju od 45 minuta) na 2% agaroznom gelu. Za vizuelizaciju DNK u gelu korišćen je etidijum bromid koji fluorescira kad se osvetli UV svetlom.

Na osnovu objašnjenog postupka moguće je samo utvrditi da se radi o nekoj od vrsta iz roda *Babesia* ili pak isključiti sumnju, ukoliko nije dobijena traka na gelu. Za dalju specijsku identifikaciju izvršeno je određivanje polimorfizma u dužini restrikcionih fragmenata (RFLP metoda). Izvršena je digestija PCR produkata sa *TaqI* i *Hinf I* restrikcionim enzimima. Nakon tretmana restrikcionim enzimima, dobijeni fragmenti su analizirani putem elektroforeze. Gel je bojen etidijum bromidom, a vizuelizacija je vršena na UV transiluminatoru. Na osnovu digestije sa *TaqI* restrikcionim enzimom može se utvrditi infekcija sa *B. vogeli* (pošto samo ona poseduje restrikciono mesto za ovaj enzim i dobiće se dva fragmenta, dužine 175 i 210bp). Kod svih drugih vrsta PCR produkti će ostati nepresečeni. *HinfI* restrikcioni enzim ne seče amplikone *B. canis* i *B. vogeli*, ali seče *B. rossi* (pa će se dobiti dva fragmenta dužine 175 i 230 bp), *B. gibsoni* (fragmenti dužine 200 i 205 bp) i *B. microti-like* (fragmenti dužine 70 i 370 bp). Od uzročnika babezioze pasa jedino *Babesia canis* ne poseduje restrikciono mesto ni za jedan od dva navedena enzima (Solano-Gallego i sar., 2008).

## Rezultati / Results

Morfološkom determinacijom 49 ispitivanih krpelja skinutih sa asimptomatskih pasa ustanovljeno je prisustvo tri vrste krpelja, i to *R. sanguineus* (18 ženki i 13 mužjaka), *D. reticulatus* (5 ženki i 4 mužjaka) i *I. ricinus* (9 ženki). Od ukupnog broja ispitanih krpelja 18,34% (49/9) je bilo pozitivno na *Babesia* spp (Slika 1). Prevalencija uzročnika babezioze po vrstama krpelja je iznosila 44,44% za *D. reticulatus*, 12,90% za *R. sanguineus* i 11,11% za *I. ricinus*. Prisustvo uzročnika babezioze je utvrđeno u krpeljima sa sva tri ispitivana lokaliteta (Tabela 1). Pozitivni uzorci su podvrgnuti RFLP analizi, kojom je utvrđeno prisustvo *B. gibsoni* u 4,08% (49/2) slučajeva, dok 14,29% (49/7) uzoraka nije posedovalo restrikciono mesto ni za jedan enzim, što najverovatnije ukazuje na *B. canis*. Rezultati RFLP



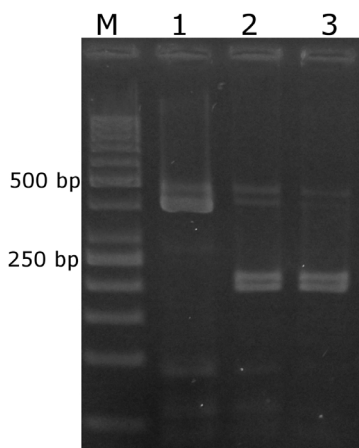
Slika 1. Prikaz rezultata dobijenih na agaroznom gelu obojenom u etidijum bromidu. *Babesia* spp. daje trake veličine 410bp. M-Marker (50bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-8 pozitivni uzorci na *Babesia* spp.

Picture 1. Presentation of the results obtained by agarose gel stained with ethidium bromide. *Babesia* spp. Forms strips size 410bp. M-Marker (50bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-8 positive samples for *Babesia* spp.

analize su prikazani na slici 2. Nije bilo ni jednog slučaja *B. vogeli*, *B. microti*-like i *B. rossi*. U oba slučaja *B. gibsoni* je detektovana u krpelju vrste *R. sanguineus*.

Tabela 1. Zastupljenost vrsta iz roda *Babesia* u krpeljima na teritoriji tri beogradske opštine. Table 1. Presence of species of the genus *Babesia* in ticks in the area of three Belgrade municipalities

Opština / Municipality	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
	Broj pozitivnih - broj ispitanih / Number of positive - Number of tested		
Savski venac	0/2	3/10	1/6
Zemun	1/4	1/14	0/2
Novi Beograd	3/3	0/7	0/1
Ukupno / Total	4/9	4/31	1/9



Slika 2. Prikaz rezultata RFLP metode sa *HinfI* restrikcionim enzimom na agaroznom gelu obojenom u etidijum bromidu. M-Marker (50bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-*Babesia* spp., 2,3- *Babesia gibsoni*.

Picture 2. Presentation of the results of RFLP method with *HinfI* restriction enzyme by agarose gel stained with ethidium bromide. M-Marker (50bp DNA ladder Nippon Genetics, Germany); 1-*Babesia* spp., 2,3- *Babesia gibsoni*.

## Diskusija / Discussion

Iako Srbija predstavlja endemsko područje za babeziozu pasa, podaci o uzročnicima, kao i o uključenim vektorima su veoma oskudni. Tri vrste krpelja koje su uzorkovane sa asimptomatskih pasa se u potpunosti poklapaju sa vrstama koje su Potkonjak i saradnici našli na psima na prostoru Novog Sada (Potkonjak i sar., 2016).

Molekularnim metodama detekcije u krpeljima na prostoru Srbije do sada je potvrđeno prisustvo *B. canis* (Mihaljica i sar., 2012; Potkonjak i sar., 2016), a iz krvi pasa *B. canis* i *B. gibsoni* (Davitkov i sar., 2015). U ovom istraživanju vrste iz roda *Babesia* su detektovane kod svih vrsta krpelja, sa ukupnom prevalencijom od 18,37%. Ustanovljena prevalencija je veća u odnosu na prethodno istraživanje sprovedeno u Srbiji kada je ustanovljena prevalencija od 10,61% (Mihaljica i sar., 2012). Navedena razlika u visini prevalencije može se objasniti činjenicom da su krpelji uzorkovani sa pasa u regionu gde je babezioza veoma često oboljenje, za razliku od prethodnog istraživanja gde su krpelji uzorkovani iz prirode.

Oba slučaja *B. gibsoni* su dijagnostikovana u krpeljima vrste *R. sanguineus*, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da je smeđi pseći krpelj najčešći vektor ovog uzročnika (Solano-Gallego i Baneth, 2011). Sedam pozitivnih uzoraka na *Babesia* spp. nisu posedovali restrikciono mesto ni za jedan od korišćenih restrikcioni enzima, što sigurno isključuje prisustvo sledećih vrsta: *B. rossi*, *B. vogeli* i *B. microti-like*. Sprovedeno istraživanje potvrđuje da je najčešći uzročnik babezioze pasa na teritoriji grada Beograda *B. canis*, što je prethodno potvrđeno i iz krvi pasa (Davitkov i sar., 2015).

## Zaključak / Conclusion

U istraživanju je po prvi put u Srbiji utvrđeno prisustvo *B. gibsoni* kod krpelja (vrsta *R. sanguineus*). Ispitivanje prisutnih krpelja na određenom prostoru, kao i utvrđivanje prevalencije patogena koje prenose, neopodno je za procenu rizika, kao i za adekvatnu prevenciju krpeljski prenosivih bolesti. Ovo istraživanje je potvrdilo korisnost molekularnih metoda u preciznoj detekciji uzročnika vektorski prenosivih bolesti. Neophodna su dalja istraživanja koja će obuhvatiti mnogo veći broj krpelja, poreklom sa više lokaliteta, kao i kontinuirano praćenje tokom godina. Jedino na taj način možemo biti bliži realnoj epizootološkoj situaciji na teritoriji Srbije kad su u pitanju uzročnici babezioze pasa.

## Literatura / References

1. Bashiruddin JB, Cammà C, Rebêlo E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Vet Parasitol* 1999; 84: 75-83.

2. Blaschitz M, Narodoslavsky-Gfoller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J. *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4841-6.
3. Cassini R, Bonoli C, Montarsi F, Tessarin C, Marcer F, Galuppi R. Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in northern Italy. *Vet Parasitol* 2010; 171: 151-4.
4. Cieniuch S, Stańczak J, Ruczaj A. The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (*Acari, Ixodidae*) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Pol J Microbiol* 2009; 58: 231-6.
5. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* 2009; 40: 37.
6. Davitkov D, Vučićević M, Stevanović J, Krstić V, Tomanović S, Glavinić U, Stanimirović Z. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta Vet Hung* 2015; 63 (2): 199-208.
7. Földvári G, Márialigeti M, Solymosi N, Lukács Z, Majoros G, Kósa J, Farkas J. Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. *Parasitol Res* 2007; 101: 25-34.
8. Irwin PJ (2009) Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors* 2009; 2 (Suppl. 1): S4.
9. Jefferies R, Ryan UM, Jardine J, Broughton DK, Robertson ID, Irwin PJ. Blood, Bull Terriers and babesiosis: further evidence for direct transmission of *Babesia gibsoni* in dogs. *Aust Vet J* 2007; 85: 459-63.
10. Kubelová M, Tkadlec E, Bednář M, Roubalová E, Široký P. West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. *Vet Parasitol* 2011; 180: 191-6.
11. Matijatko V, Torti M, Schetters TP. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends Parasitol* 2012; 28: 99-105.
12. Mihaljica R, Radulović Ž, Tomanović S, Čakić S, Penezić A, Milutinović M. Molecular detection of *Babesia* spp. in ticks in North Serbia. *Arch Biol Sci* 2012; 64: 1591-8.
13. Olmeda AS, Armstrong PM, Rosenthal BM, Valladares B, del Castillo A, de Armas F, Miguelez M, Gonzalez A, Rodriguez JA, Spielman A, Telford 3rd SR. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Trop* 1997; 67: 229-34.
14. Pomerancev BL. Fauna SSSR. Paukoobraznie. Iksodovieklešči (*Ixodidae*), Akadem Nauk SSSR, Moskva - Leningrad 1950.
15. Potkonjak A, Gutiérrez R, Savić S, Vračar V, Yaarit Nachum-Biala Y, Jurišić A, Kleinerman G, Rojas A, Petrović A, Baneth G, Harrus S. Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick borne dis* 2016; 7: 199-203.
16. Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microb* 2010; 76: 2923-31.
17. Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T. *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol* 2008; 157: 211-21.
18. Solano-Gallego L, Baneth G. Babesiosis in dogs and cats - expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol* 2011; 181: 48-60.
19. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie* 2013; 44: 522-36.
20. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie* 2011; 42: 49-58.
21. Taboada J, Lobetti R. Babesiosis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Elsevier, St. Louis, Missouri, USA, 2006: 722-36.

22. Uilenberg G. *Babesia* - A historical overview. Vet Parasitol 2006; 138: 3-10.
23. Yeagley TJ, Reichard MV, Hempstead JE, Allen KE, Parsons LM, White MA, Little SE, Meinkoth JH. Detection of *Babesia gibsoni* and the canine small Babesia 'Spanish isolate' in blood samples obtained from dogs confiscated from dog fighting operations. J Am Vet Med Assoc 2009; 235: 535-9.

ENGLISH

**MOLECULAR DETECTION OF *BABESIA* SPP. IN TICKS SAMPLED FROM ASYMPTOMATIC DOGS IN THE AREA OF SOME BELGRADE MUNICIPALITIES**

**Davitkov Darko, Terzić Srećko, Davitkov Dajana, Radaković Milena, Gajić Bojan, Krstić Vanja, Stanimirović Zoran**

Babesiosis of domestic animals is a vector transmissible and clinically significant disease, caused by protozoa of genus *Babesia* and *Theileria*. Possible causative agents for this disease in dogs in Europe are: *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli* and *B. microti-like*. Diagnostics of babesiosis of dogs was for a long time based on the visual inspection of stained blood smear under a microscope, while today there have been increasingly used molecular methods of detection in precise, species diagnostics. The objective of this work was molecular detection of the cause of babesiosis of dogs in the ticks sampled from asymptomatic dogs in the region of some Belgrade municipalities, all for better understanding of epizootiological situation. From three sites in Belgrade, there were collected 49 ticks, sampled from the dogs with no symptoms. There was carried out the determination of the ticks, and after that, DNA was isolated for molecular examination. First, there was performed Polymerase Chain Reaction (PCR), for determining the species of the genus *Babesia*, and after that there was also carried out the determining of polymorphism in the length of restriction fragments (RFLP) for the purpose of the causative agent species determination. Out of the total number of the examined ticks, 18,34% were positive on *Babesia* spp. By RFLP method, in two cases (4,08%) *B. gibsoni* was identified, while in 7 cases (14,92%) there were no restriction sites for the used enzymes, what suggests that most likely it was *B. canis*. The ticks positive on the cause of babesiosis were: *Dermacentor reticulatus* (4 cases), *Rhipicephalus sanguineus* (4 cases) i *Ixodes ricinus* (1 case). This work confirms the presence of *Babesia* spp. in the ticks sampled from asymptomatic dogs on the territory of Belgrade as well as the significance of PCR-RFLP method in diagnostics and identification of the causative agent of babesiosis in dogs. For the first time in Serbia, there was determined the presence of *B. gibsoni* in ticks (Species *Rhipicephalus sanguineus*)

*Key words: Babesia canis/gibsoni, Belgrade, ticks, PCR-RFLP*



**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ *BABESIA* SPP. В ОБРАЗЦАХ КЛЕЩЕЙ,  
ПОЛУЧЕННЫХ ОТ АСИМПТОМАТИЧНЫХ СОБАК НА ТЕРРИТОРИИ НЕКОТОРЫХ  
РАЙОНОВ БЕЛГРАДА**

**Давитков Дарко, Терзич Сречко, Давитков Дайана, Радакович Милена,  
Гайич Боян, Крстич Ваня, Станимирович Зоран**

Бабезиоз домашних животных является векторным заболеванием с серьезными клиническими проявлениями, вызываемым простейшими рода *Babesia* и *Theileria*. Возбудителями, вызывающими заболевание у собак на территории Европы, являются: *Babesia canis*, *B. gibsoni*, *B. vogeli* и *B. microti-like*. Диагностика бабезиоза собак долгое время базировалась на обнаружении возбудителя путем микроскопического исследования окрашенных мазков крови, но в настоящее время все более широко используются молекулярные методы детекции в рамках точной специфической диагностики. Целью данной работы являлась молекулярная детекция различных возбудителей бабезиоза собак в образцах клещей, полученных от асимптоматичных собак на территории некоторых районов Белграда в целях наиболее эффективной оценки эпизоотической ситуации. В трех районах Белграда было собрано 49 клещей, снятых с собак, у которых отсутствовали симптомы заболевания. Был определен вид клещей, а затем выделена ДНК для молекулярных исследований. Сначала была проведена полимеразная цепная реакция (ПЦР) для определения видов из рода *Babesia*, а затем определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в целях специфической идентификации возбудителя. Из общего количества исследованных клещей 18,34% было позитивно на *Babesia* spp. Методом ПДРФ в двух случаях (4,08%) идентифицирована *B. gibsoni*, а в 7 случаях (14,92%) отсутствовали сайты рестрикции для использованных ферментов, что с большой вероятностью указывает на *B. canis*. Позитивными на наличие возбудителей бабезиоза были клещи *Dermacentor reticulatus* (4 случая), *Rhipicephalus sanguineus* (4 случая) и *Ixodes ricinus* (1 случай). Результаты данной работы подтверждают присутствие *Babesia* spp. в образцах клещей, полученных от асимптоматичных собак на территории г. Белграда, а также значимость методов ПЦР-ПДРФ в диагностике и идентификации возбудителей бабезиоза собак. Впервые в Сербии было установлено присутствие *B. gibsoni* у клеща вида *Rhipicephalus sanguineus*.

Ключевые слова: *Babesia canis/gibsoni*, Белград, клещи, ПЦР-ПДРФ