

Универзитет у Београду  
Факултет ветеринарске медицине

Оливер Н. Стевановић

**Епизоотиолошко, клиничко и молекуларно  
испитивање бабезиозе оваца узроковане  
врстом *Babesia ovis* (Babes, 1892) у  
југоисточном региону Босне и Херцеговине**

Докторска дисертација

Београд, 2022

**University of Belgrade**  
**Faculty of Veterinary Medicine**

**Oliver N. Stevanović**

**Epizootiological, clinical, and molecular  
investigation of ovine babesiosis caused by  
*Babesia ovis* (*Babes*, 1892) in the southeastern  
region of Bosnia and Herzegovina**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2022**

Ментори:

Др Тамара Илић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Драго Н. Недић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Чланови комисије:

Др Даница Богуновић, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Андреа Радаљ, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Алмедина Зуко, редовни професор

Ветеринарски факултет Универзитета у Сарајеву

Датум одбране: \_\_\_\_\_

*Своју докторску дисертацију посвећујем дједу Мили Стевановићу, као и мојим колегама:  
Богославу Готовцу, Сави Суботићу, Љиљани Новаковић-Пјевчевић и Сретену Пушари.*

*Без Вас не бих добио прилику да се изградим у области ветеринарске медицине, нити да  
завершим овај рад.*

*Желим да се захвалим свим ветеринарима и узгајивачима оваца који су дали допринос у овој студији. Хвала вам!*

*Захваљујем се Ивони Субић, јер ми је значајно помогла око молекуларне дијагностике.*

*Слободанки Делић и др Драгану Касагићу се захваљујем на техничкој помоћи.*

*Значајну подршку приликом израда овог рада ми је пружио и др Жељко Сладојевић. Хвала му на томе.*

*Директору Драгану Кнежевићу и руководству ЈУ Ветеринарског института „Др Васо Бутозан“ Бања Лука морам да се захвалим што су подржали моје школовање и израду овог рада.*

*Посебну захвалност дугујем менторима Тамари Илић и Драги Недићу на посвећености коју су показали током вишегодишње сарадње.*

*Алмедини Зуко се захваљујем што ми је подарила дио свог знања из паразитологије и остала истрајна да ми помогне да се изградим у области.*

*На крају, породици највише дугујем, а посебно мојој супрузи Александри и сину Василију што су трпили, и даље трпе моје одсуство од куће.*

*Аутор*

**Епизоотиолошко, клиничко и молекуларно испитивање бабезиозе оваца  
узроковане врстом *Babesia ovis* (Babes, 1892) у југоисточном региону  
Босне и Херцеговине**

**САЖЕТАК**

У периоду од јула 2019. до августа 2022. године спроведено је епизоотиолошко испитивање на одабраном географском подручју региона југоисточне Босне и Херцеговине, где је узоркована пуна крв од 192 овце из 53 стада. Узорковано је укупно 109 крпеља са испитиваних оваца. Циљ овог истраживања је да се идентификује и молекуларно потврди, изврши анализа секвенци циљног гена и одреди присутност инфекције врстом *B. ovis* код клинички сумњивих и асимптоматски инфицираних оваца. Комбиновањем два PCR протокола (*Babesia ovis* и *Babesia/Theileria*) позитиван налаз пироплазмозе је установљен код 98,68% клинички сумњивих оваца. Присуство врсте *B. ovis* је утврђено код 75% симптоматских и 11,21% асимптоматски инфицираних оваца. Утврђена је значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у погледу присуства врсте *B. ovis* између оваца млађих од четири мјесеца у односу на овце старости 1-2 године, код оваца које су биле инфициране крпељима у односу на оне које нису, као и између оваца планинске и медитеранске климе. Анализом секвенци циљног сегмента 18S рРНК врсте *B. ovis* из Гацка и Рудог, установљено је груписање са пријављеним врстама овог паразита из Турске, Уганде, Туниса и других земаља Блиског Истока. Примјеном геоинформатичког система установљен је образац агрегације жаришта малигне бабезиозе оваца (ензоотски фокус) у Рудом. Спроведеном „cost benefit“ анализом установљена је економска оправданост спроведеног превентивног акарицидног третмана, како би овчарска производња у испитујућем подручју била рентабилна и одржива. С обзиром на то да испитивани регион представља и уже погранично подручје са Републиком Србијом, Републиком Хрватском и Републиком Црном Гором, добијени резултати и прва молекуларна потврда врсте *B. ovis* на овом подручју, имају регионални значај и представљају корисну базу епизоотиолошких података.

**Кључне ријечи:** бабезиоза оваца, *Babesia ovis*, фактори ризика, молекуларно испитивање, cost-benefit анализа, клинички статус, Босна и Херцеговина

**Научна област:** Ветеринарска медицина

**Ужа научна област:** паразитологија, епизоотиологија, ветеринарска економика

**UDK:** 619:576.8(043.3).

**Epizootiological, clinical, and molecular investigation of ovine babesiosis caused by *Babesia ovis* (Babes,1892) in the southeastern region of Bosnia and Herzegovina**

**ABSTRACT**

In the period from July 2019 to August 2022, an epizootiological survey was conducted in a selected geographical area of the region of southeastern Bosnia and Herzegovina, during which whole blood samples were collected from 192 sheep from 53 flocks. A total of 109 tick samples were collected from the examined sheep. The aim of this study is to identify and molecularly confirm, perform sequence analysis of the target gene and determine the presence of *B. ovis* infection in clinically suspicious and asymptotically infected sheep. By combining two PCR protocols (*Babesia ovis* and *Babesia/Theileria*), 98.68% of sheep with clinical suspicion were found to be positive for piroplasmiasis. The presence of *B. ovis* species was detected in 75% of symptomatic and 11.21% of asymptotically infected sheep. A significant difference ( $p < 0.05$ ) was found regarding the presence of *B. ovis* species between sheep younger than four months compared to sheep aged 1-2 years, in sheep infested with ticks compared to those not infested, and between sheep with mountain and Mediterranean climates. By analyzing the sequences of the target segment of the 18S rRNA species *B. ovis* of Gacko and Rudo, a grouping was made with the reported species of this parasite from Turkey, Uganda, Tunisia and other Middle Eastern countries. By applying the geoinformatics system, the aggregation pattern of the foci of malignant ovine babesiosis (enzootic focus) in Rudo was determined. The performed "cost-benefit" analysis showed the economic justification of the performed preventive acaricide treatment, so the sheep production in the studied area would be profitable and sustainable. Since the studied region is also a close border area with the Republic of Serbia, the Republic of Croatia and the Republic of Montenegro, the obtained results and the first molecular confirmation of *B. ovis* in this area are of regional importance and represent a useful basis for epizootiological data.

**Key words:** ovine babesiosis, *Babesia ovis*, risk factors, molecular examination, *cost-benefit* analysis, clinical status, Bosnia and Herzegovina

**Major scientific field:** Veterinary medicine

**Special scientific field:** parasitology, epizootiology, veterinary economics

**UDK:** 619:576.8(043.3).

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. Историјски осврт на бабезиозу оваца.....	3
2.2. Распрострањеност бабезиозе оваца узроковане врстом <i>Babesia ovis</i> .....	6
2.3. Етиопатогенеза инфекције оваца изазване врстом <i>Babesia ovis</i> .....	8
2.4. Животни циклус крпеља врсте <i>Rhipicephalus bursa</i> .....	11
2.5. Клиничко-дијагностички осврт на бабезиозу оваца.....	12
2.6. Терапијске и профилактичке могућности у сузбијању клиничке бабезиозе оваца.....	15
2.6.1. Употреба хемиотерапеутика у сузбијању бабезиозе оваца.....	16
2.6.2. Сузбијање крпеља код животиња и у спољашњој средини.....	17
2.6.3. Зоохигијенске и биосигурносне мјере.....	18
2.7. Економски значај клиничке бабезиозе оваца.....	18
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА.....	20
3.1. Циљ испитивања.....	20
3.2. Задаци испитивања.....	20
4.1. Материјал испитивања.....	21
4.1.1. Подручје испитивања.....	21
4.1.2. Животиње.....	22
4.1.3. Метеоролошки подаци.....	24
4.2. Методе испитивања.....	24
4.2.1. Иницијална теренска запажања и дефинисање подручја испитивања.....	24
4.2.2. Узорковање.....	25
4.2.3. Епизоотиолошко испитивање.....	26
4.2.4. Клиничко испитивање без контролне групе.....	27
4.2.5. Паразитолошко испитивање.....	27
4.2.5.1. Микроскопски преглед крви клинички сумњивих оваца.....	27
4.2.5.2. Морфолошка идентификација и детерминација крпеља.....	27
4.2.5.3. Праћење дистрибуције вектора на основу метеоролошких података.....	27
4.2.6. Молекуларна идентификација врсте <i>Babesia ovis</i> и других пироплазми.....	28
4.2.6.1. Екстракција нуклеинске киселине.....	28
4.2.6.2. Амплификација ДНК и анализа резултата.....	28
4.2.6.3. Електрофореза и визуелизација добијених PCR продуката.....	30
4.2.6.4. Валидација PCR протокола - репродуктивност.....	30
4.2.7. Секвенцирање и филогенетска анализа.....	30



4.2.8. Одређивање обрасца просторне дистрибуције жаришта применом ГИС ( <i>Geographic Informaton System</i> ) методологије .....	31
4.2.9. Статистичка обрада података и економетријске анализе.....	31
<b>5. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Резултати епизоотиолошког испитивања .....</b>	<b>32</b>
5.1.1. Епизоотиолошки подаци добијени од надлежне ветеринарске службе..	32
5.1.2. Епизоотиолошки подаци на нивоу стада оваца добијени од узгајивача.	33
<b>5.2. Резултати клиничког испитивања бабезиозе оваца .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3. Резултати паразитолошког испитивања .....</b>	<b>40</b>
5.3.1. Резултати микроскопског прегледа крви клинички сумњивих оваца .....	40
5.3.2. Резултати морфолошке идентификације и детерминације крпеља.....	44
5.3.3. Поређење дистрибуције вектора са сезоном испитивања и метеоролошким подацима.....	45
<b>5.3.3.1. Метеоролошки подаци у 2019. години .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.3.2. Метеоролошки подаци у 2020. години .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3.3.3. Метеоролошки подаци у 2021. години .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4. Резултати молекуларних испитивања .....</b>	<b>49</b>
5.4.1. Резултати молекуларних испитивања код клинички сумњивих оваца...	49
5.4.2. Поређење резултата микроскопског прегледа са резултатима молекуларних метода .....	53
5.4.3. Резултати молекуларних испитивања у крпељима <i>Rhipicephalus bursa</i> ...	53
5.4.4. Резултати молекуларних испитивања код асимптоматских оваца .....	53
5.4.5. Резултати секвенирања циљног гена врсте <i>Babesia ovis</i> .....	58
<b>5.5. Резултати геоинформатичке анализе.....</b>	<b>61</b>
<b>5.6. Резултати економетријске „cost-benefit“ анализе.....</b>	<b>64</b>
<b>6. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>67</b>
<b>8. СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ .....</b>	<b>79</b>

## 1. УВОД

Бабезиоза оваца је значајно паразитско обољење крви које преносе крпељи. Узроковано је са неколико врста рода *Babesia*, при чему је најзначајнији узрочник патогена врста *Babesia ovis*. У питању је облигатна, интраеритроцитна високопатогена хемопротозоа, посебно за овце које нису раније развиле имунски одговор или премунисију. Бабезиозу оваца проузроковану врстом *B. ovis* или малигну бабезиозу оваца карактеришу сезонска појава, тешки акутни знаци болести, значајан морбидитет и висок морталитет, упркос примјени терапијских мјера. Болест је раније била позната под називом пироплазмоза и актуелна је била све до осамдесетих година прошлог вијека, од када се смањује број литературних података у научној и стручној литератури. Наведено стање у расположивој литератури настало је као последица:

- 1) мањег броја евидентираних случајева обољења на терену;
- 2) смањења броја оваца у екстензивном типу производње;
- 3) интензивне и неконтролисане употребе акарицидиних средстава против крпеља на терену, од стране држалаца животиња и
- 4) мањег броја епизоотиолошких испитивања.

Тренутно, бабезиоза оваца је актуелна у земљама Блиског истока. Ово обољење се појављивало у појединим регионима Балкана, посебно деловима са медитеранском климом, у стадима оваца која су гајена екстензивно. Сматрало се да је то једна од најпогубнијих болести за екстензивно овчарство. Пошто је болест сезонског карактера, често се клиничка бабезиоза јављала нагло код оваца у истим подручјима, у истом периоду године, чак и у истим стадима, због чега је добијала опсјега ензоотског фокуса или карактер дистрикта. Таква подручја се још могу назвати и ензоотски нестабилна подручја, при чему се сматра да постоји неравнотежа између степена имунитета домаћина и интензитета циркулације узрочника у пријемчивој популацији. У наведеним подручјима честа је сезонска појава значајног броја клиничких случајева болести са појавом директних економских штета усљед угинућа тешко обољелих оваца.

Индиректне штете проузроковане бабезиозом подразумевају трошкове спроведених терапијских и профилактских мјера у стадима оваца. У ензоотским фокусима, потпуна ерадикација бабезиозе је тешко изводљива у пракси, али је могућа контрола болести и смањење губитака ако се правилно примјењују терапијске и профилактске мјере. У терапијске мјере спада апликација антипротозоалног лијека имидокарб дипропионата овцама обољелим или сумњивим на присуство обољења, док најчешћа профилактска мјера подразумјева апликацију акарицидних средстава у изложеним или стадима инфицираним крпељима. Вакцинација се тренутно не спроводи.

Примарни вектор врсте *B. ovis* је овчји медитерански крпељ *Rhipicephalus bursa*. Клиничко испољавање болести се јавља 14 дана након појаве адултних облика крпеља *R. bursa* на овцама. У медитеранском географском подручју, то је период од маја до августа мјесеца. Основни клинички знаци акутне клиничке бабезиозе су грозница, летаргија, респираторни дистрес, анемија, иктерус и хемоглобинурија. Хронични случајеви бабезиозе оваца су нешто ређа појава и карактеришу се кахексијом, slabим апетитом, анемијом и иктерусом. Углавном настају као последица неуспјешног лечења акутног тока болести.

На терену, паразитска болест која није зооноза и пролази у субклиничкој форми, губи значај за ветеринарску службу и држаоце животиња. С обзиром на описане клиничке симптоме, код бабезиозе оваца то није случај. На неким подручјима рани неспецифични клинички знаци бабезиозе и посљедична нагла угинућа оваца се клинички тешко могу разликовати од тровања, клостридијалних инфекција, антракса и топлотног удара. Постављање правовремене дијагнозе микроскопским прегледом крвних размаза понекад је тешко и зависи од фазе инфекције, знања и искуства прегледача. Из наведеног разлога потврда инфекције применом молекуларних – РСР метода има значај за клиничку праксу, посебно ако је позната чињеница да се у неким подручјима ензоотски фокуси бабезиозе оваца поклапају са антракским дистриктима када није препоручен постмортални преглед лешева угинулих животиња.

Пошто нема релевантних података о епизоотиолошким и клиничким карактеристикама бабезиозе оваца у Републици Српској (Босна и Херцеговина) и земљама регије Балкана, на терену је током три године извршено селективно епизоотиолошко испитивање у географском подручју југоисточне Босне и Херцеговине. Основни циљ спроведене студије је утврђивање потенцијалног присуства *B. ovis*, молекуларна потврда ове врсте и анализирање епизоотиолошких карактеристика бабезиозе оваца у том подручју државе.

Истраживањем је обухваћен географски регион Херцеговине и Подриња, при чему су активно узорковање и анализа извршени у епизоотиолошким јединицама Рогатица, Рудо, Чајниче, Невесиње, Гацко, Билећа, Љубиње и Требиње. У овом брдско-планинском и планинском подручју је овчарство примарна грана сточарства. Већина сеоског становништва Подриња гаји мања стада оваца за личне потребе, а у Херцеговини су типична велика стада са динамичним кретањима и планинском испашом на крашким херцеговачким пољима. Пошто је испитивани регион уједно и уже погранично подручје са Републиком Србијом, Републиком Хрватском и Црном Гором, добијени резултати докторске дисертације имају регионални значај и представљају значајну епизоотиолошку базу података.

Имајући у виду да је екстезивно овчарство типично за испитивано рурално подручје, економске штете у мањим породичним стадима проузроковане бабезиозом могу озбиљно да угрозе егзистенцију економски угрожених домаћинстава. Овако настале економске штете често постају немјерљиве и није их могуће компензовати, поготово ако овчарство представља главни извор примања за домаћинство.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1. Историјски осврт на бабезиозу оваца

Хемоглобинурија оваца под локалним називом „*Carceag*” или „*Carcean*” се први пут помиње у насељеном мјесту Констанца у Румунији 1800. године (*Mihalca* и сар., 2010). Ову болест је 1892. године описао љекар др Виктор Бабеш (*Babes*, 1892), а узрочника је грешком назвао *Haematococcus ovis* мислећи да је ријеч о бактеријској врсти. По Бабешовим описима, болест је имала брз, краткотрајан ток са високим морталитетом који је достигао и до 50%, а појављивала се углавном код оваца у долини Дунава. Следеће године, *Starcovici* (1893) такође детектује пироплазму у крвним размазима обољелих оваца и назива је *Babesia ovis*. *Bonome* (1895) описује сличну болест оваца у Падови (Италија) коју назива „паразитска иктеро-хемоглобинурија оваца”. Након ових првих извјештаја, у Француској се појављују додатни описи болести која клинички одговара пироплазмози оваца, а од раније је била позната међу сточарима као „жутица” (*Inchiestri*, 1912). Неколико година касније, *Laveran* и *Nicolle* (1899) описују болест оваца у Цариграду, а узрочник се први пут у литератури наводи као *Piroplasma ovis*. Прилог познавању пироплазмозе оваца у Румунији 1903. године даје румунски паразитолог *Motas* (1903), када описује крупније хемоспоридије у крви и закључује да болест преносе артропозе. У Бугарској је болест описана под називом „*Karchan*” (*Bichev*, 1908).

Постоје кратки описи сличне болести у Америци, Африци и на Кавказу, која је описана у сјеверном дијелу Африке као „маларијска катарална грозница” (*Inchiestri*, 1912). Ипак, увидом у оригиналну литературу и на основу клиничког описа болести плавог језика, а не пироплазмозе оваца (*Hutcheon*, 1902). Ово је био примјер проблематике диференцијалне дијагностике и разликовања пироплазмозе оваца од других заразних болести у прошлости. Крајем 19. вијека откривени су узрочници пироплазмоза домаћих животиња, а *B. ovis* је описана након што су идентификовани узрочници бабезиозе говеда и коња. После првобитних налаза пироплазмозе оваца у Руминији и Бугарској, 1911. године *P. ovis* је установљена код овце у Тесалији (Грчка) (*Cardamatis*, 1911). На подручју западног Балкана пироплазмоза оваца је први пут описана 1912. године код оваца у околини Задра (данашња Република Хрватска). Тадашња Далмација је била под управом Аустроугарске, а главни рејонски ветеринар у служби Аустроугарске, др *Hugo Inchiestri* установио је епизоотију пироплазмозе док је регистровао помор оваца, који је код локалних овчара погрешно називан „метиљ”. Аутор је запазио да узрочника болести преносе крпељи врсте *Rhipicephalus bursa* и да болест има искључиво сезонски карактер са неколико клиничких токова. Од тог периода, ова болест оваца је на подручју Далмације (*Inchiestri*, 1912) и Македоније (*Angelovski* и сар., 1963) позната под називом „маларија оваца”. Овај термин је утемељен као народни или сточарски назив за болест у медитеранским земљама и погрешно је интерпретиран, јер назив „маларија” значи „лош ваздух” (*Hutcheon*, 1902).

Налаз врсте *P. ovis* код оваца у Далмацији је представљао први описан случај пироплазмозе у тадашњој Аустроугарској, а касније у Краљевини Југославији. Бугарски научник *Vladimir Markoff* у току Првог свјетског рата извештава о појави пироплазмозе оваца у јужним и источним дијеловима Србије (*Markoff*, 1916). Године 1922., приликом рада Антималаријске комисије у Македонији, закључује се

да је пироплазмоза оваца изразито раширена и да прави значајне економске штете у овој регији (*Dschunkovsky* и *Urodschevich*, 1924). Сљедећи подаци о појави пироплазмозе оваца на нашим просторима потичу од домаћих аутора. У десетогодишњем извјештају Хигијенског завода у Скопљу *Mlinac* (1937) описује појаву, раширеност и терапију пироплазмозе оваца у Македонији, која је узрокована врстом *Babesiela ovis*. На основу овог извјештаја се закључује да је сузбијање пироплазмозе било учинковитије употребом акаприна, а настале штете су се дјелимично финансирале из средњих и котарских буџета. Слично тим описима, *Šterk* (1939) у своме извјештају Ветеринарског завода у Скопљу описује присуство врсте *Theileria ovis* и других пироплазми. *Davor Mikačić* (1952) пише прву значајну интернационалну публикацију о пироплазмозама у Југославији, гдје по први пут наводи да је у Далмацији присутна тајлериоза оваца. *Kosta Petrović*, познати српски паразитолог из Ветеринарског завода у Нишу, даје приказ о пироплазмози оваца у југостичном дијелу Србије, гдје наводи да су установљене *Babesia motasi* и *B. ovis* (*Petrović*, 1958). Проблематика праћења бабезиозе оваца на југу Србије се заснивала на недовољном пријављивању од стране сточара, због чега аутор наводи да прикупљени подаци нису дали увид у праву слику са терена. Пироплазмоза оваца у тадашњој НР Србији се јавља у свим дијеловима земље, осим у Војводини. Почетак болести регистровао се у априлу, а затим достигао врхунац појаве у јулу мјесецу, а до септембра мјесеца се број случајева смањивао. Поред пироплазмозе оваца, у раду су приказани подаци који су везани за раширеност пироплазмозе говеда и коња.

Период до 1955. године је био значајан због кампањског сузбијања пироплазмоза оваца, гдје су учествовали и ветеринарски заводи. Године 1955. донет је законски пропис о обавезном пријављивању и сузбијању пироплазмозе у НР Србији „Службени гласник бр. 25. 1955.“ (*Anonimus*, 1955). Даљим увидом у домаћу литературу прошлог вијека евидентно је да су израђене значајне докторске дисертације које су биле посвећене епизоотиологији пироплазмоза домаћих животиња. Једно од најистакнутијих истраживања на тему пироплазмозе оваца је извршио албански научник, преводилац и књижевник *Esad Mekuli* 1959. године. Он је проучавајући појаву пироплазмоза на територији Косова и Метохије од 1954. до 1959. године, констатовао да инфекција оваца врстом *B. ovis* кулминира у јуну и јулу. *Angelovski* и сар. (1963) извјештавају о бабезиози оваца узрокованој врстом *B. ovis* која је на територији НР Македоније била веома заступљена и запажају неколико важнијих чињеница: 1) болест оваца се јављала од маја до августа мјесеца, са високим морбидитетом до 60% и морталитетом до 15%; 2) предиспозиција је била примјетна код мерино и каракул раса оваца; 3) није уочена старосна предиспозиција; 4) учинковитост лечења је била директно повезана са брзином ветеринарске интервенције; 5) апликација антибабезидног препарата диминазена је показивала најбоље резултате у терапији пироплазмозе; 6) профилактичко купање оваца линданом, као и друге зоохигијенске мјере у стадима су биле од највећег значаја у борби против пироплазмозе (*Angelovski* и сар., 1963).

У НР Црној Гори спроведено је трогодишње испитивање (1958-1961) пироплазмозе оваца узроковане врстама *B. ovis* и *B. motasi*, као и фауне крпеља (*Tomašević*, 1961). Године 1963. пироплазмоза се јавила у већини села општине Пљевља, а као профилактичко средство је примјењиван акаприн - дериват квинуронијума (*Nenadić*, 1964). Аутор описује да је у неким дијеловима Црне Горе прибјежавано апликацији крви пребољелих оваца млађим овцама или јагњадима.

Након шездесетих година прошлог вијека, значајно се смањује број радова на тему пироплазмоза оваца у домаћој стручној и научној литератури. Исте године је спроведена једна од ријетких клиничко-патолошких студија пироплазмозе оваца на нашим просторима (Milić, 1964). Župančić и сар. (1981) описују хроничне случајеве пироплазмозе оваца у Хрватској, а наведени подаци представљају један од последњих радова на ову тему у регионалној стручној литератури.

На основу резултата претраге и ревизије домаће и регионалне стручне и научне литературе, може се закључити да је пироплазмоза оваца била веома заступљена на подручју јужне Србије, Косова и Метохије, Македоније, Црне Горе и Далмације (Angelovski и сар., 1963). Подаци о појави и раширености пироплазмозе оваца на територији Босне и Херцеговине су оскудни. У домаћој литератури налазимо кратко саопштење о ензоотској појави пироплазмозе оваца 1951. и 1952. године у селима Сељани, Радава, Шаторовићи и Пешурићи, среза Рогатице, источна Босна и Херцеговина (Mandušić, 1953). На основу сазнања од локалних сточара, болест је била позната од турског доба под називима „огњица“, „жуч“ и „ватра“. Није познато зашто је пироплазмоза била присутна баш у Рогатици, јер по правилу, подручје Подриња нема медитеранску климу која је присутна у Херцеговини, Далмацији и Црној Гори. Аутор помиње исте проблеме у сузбијању пироплазмозе оваца као и аутори из сусједних земаља, а то је закаснела ветеринарска интервенција и разуђен терен. Превентивно купање оваца „шугованом“ (органохлорни инсектицид) је давало најбоље резултате. Крвни размази прављени од узорака пореклом из капилара уха су прослеђивани у Ветеринарски завод у Сарајеву, гдје је постављана дијагноза.

Анегдотски подаци о пироплазмози оваца се помињу у радовима који испитују феномен „зајуживања“ оваца у Босни и Херцеговини. На основу ових испитивања, постоје такозвани „јесењи и прољетни поболи оваца“ на територији Херцеговине (Cvjetanović, 1963). „Зајуживање“ није болест у етиолошком смислу, већ је феномен или синдром који настаје јесењим кретањем стада оваца у вријеме пада температуре, југовине и киша, са сјеверних пашњака и планина Зеленгоре, Волујака и Лебршника у јужне крајеве Херцеговине. Угињавања усљед „зајуживања“ су регистрована код овнова пештерске расе у власништву државних добара НР Босне и Херцеговине, који су са Морина доведени на зимовање у околини Стоца, са циљем оплемењивања локалне овце (Cvjetanović, 1963). Јесење зајуживање је болест углавном планинских оваца или оваца које су купљене из других географских подручја и првобитно је повезивана са лошом адаптацијом на оскудније држање и прелазак на лошију исхрану. Многе овце почињу показивати знакове опште депресије и парализе, а на крају угињавају. Старија грла су осјетљивија на болест. Прегледом таквих оваца установљено је да су углавном биле инфестиране крпељима врсте *Ixodes ricinus*, а постмортални налази оваца су били негативни, или су пак утврђени знаци енцефалитиса (Cvjetanović, 1963). На основу тога је закључено да су ове овце боловале од енцефалитиса или крпељске парализе, а обољење је међу херцеговачким сточарима било познато под називом „леђаница“.

Други талас обољевања се дешавао са почетком прољећа, када су се поједина стада из Далмације и југа Херцеговине кретала у нека од херцеговачких крашких поља (невесињко и гатачко поље) и мјешала са аутохтоним овцама. Тада се дешавало да овце из таквих стада масовно обољевају (грозница, општа слабост, иктерус) што је било повезано са појавом крпеља врсте *R. bursa*, а ови „прољетни поболи“ су довођени у везу са пироплазмозом (Cvjetanović, 1963). Сматрало се да

пироплазмоза прави мање штете ако овце одрастају у подручјима јужних крајева Далмације, Херцеговине и Црне Горе гдје узрочника има више, јер је тада степен премунитивности висок и самим тим степен отпорности већи, него у подручјима херцеговачких крашких поља, гдје је појава клиничке пироплазмозе учесталија, јер је по правилу узрочника мање (Cvjetanović, 1963). Значи пироплазмоза је, заједно са другим болестима које преносе вектори, била један од узрока „прољетних побола“ односно прољећних болести.

Cvjetanović (1963) помиње појаву „анаплазмозидних бабезијела“ код оваца које су обољеле услед кретања стоке са југа у планинска крашка поља Херцеговине. Поред бабезиозе, аутор напомиње постојање других пироплазмоза, анаплазмозе, рикециозе и „медитеранску рикециозу оваца“ као узроке прољетних обољевања оваца, уз наглашавање да су различите крпељске болести узрок „зајуживања“. Такође, „медитеранска рикециоза оваца“ је била узрок бројних угинућа оваца у Далмацији, а клиничка слика је била веома слична клиничкој слици бабезиозе оваца. Исти аутор, 1955. године наводи да је „медитеранска рикециоза оваца“ слична „heartwater“ болести (облик ерлихиозе), која се појавила код каракул оваца увезених из Француске (Cvjetanović, 1963). Нешто касније, етиологију „јесењег зајуживања“ је детаљније објаснила група аутора из БиХ, који су спознали да се код угинулих или жртвованих оваца и коза у нервном систему налазе изражене промјене специфичне за енцефалитис који преносе крпељи (Sudarić и Matuka, 1975).

Осим наведених података, јасне епизоотиолошке слике о пироплазмозама оваца у Босни и Херцеговини нема. Поред тога, важно је нагласити да до сада нису спровођене молекуларне студије у оквиру епизоотиологије пироплазмоза оваца у Босни и Херцеговини, али и другим сусједним земљама (Србија, Хрватска, Црна Гора и Македонија) гдје су ове болести у прошлости биле стационарне. Из наведених разлога не може се са сигурношћу рећи да ли су ове болести и даље актуелне, или имају само историјски значај.

## **2.2. Распрострањеност бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis***

Дистрибуција врсте *B. ovis* је углавном у корелацији са присуством примарног вектора *R. bursa* (Yeruham и сар., 1998а). Литературни наводи указују да је хемопротозоа *B. ovis* присутна у јужној палеоарктичкој зони, која укључује ширу медитеранску регију и дијелове континента Европе, Африке и Азије (Waal, 2000; Ahmed и сар., 2006). Географски гледано, болест се појављује искључиво у зони између 31. и 45. степена сјеверне паралеле (Ahmed и сар., 2006). Нешто старији подаци указују да је ова бабезија раширена у земљама бившег Совјетског савеза (Украјина, Бјелорусија), Шпанији, Португалији, Италији, Турској, Сирији, Израелу, Јордану, Ирану, Ираку, Нигерији, Гани и Сомалији (Waal, 2000). Молекуларна потврда узрочника је констатована у Турској и у неким земљама Блиског истока: Палестини (Azmi и сар., 2016), Ирану (Habibi и сар., 2020), Пакистану (Iqbal и сар., 2011) и Ираку (Renneker и сар., 2013). За сада се са сигурношћу може рећи да је бабезиоза актуелан проблем у Турској, гдје су констатована ензоотски нестабилна подручја која се карактеришу великим бројем клиничких случајева у сезони крпеља из родова *Haemaphysalis* и *Rhipicephalus* (Ceylan и Sevinc, 2020). Разлог за то је свакако начин узгоја оваца. Традиција турских овчара је позната по номадском, пашном и екстезивном узгоју великих стада на планинским пашњацима и степама, а болести које преносе вектори су тренутно од економског значаја за цијели пољопривредни сектор (Ceylan и сар.,

2021). Сасвим је разумљиво што је ветеринарска служба ове земље фокусирана на значајну контролу и испитивања болести које преносе вектори, укључујући и бабезиозу оваца, која представља приоритет за овај сектор. Из наведеног разлога тренутно највећи број публикованих испитивања о бабезиози оваца потиче управо од турских истраживача (*Sevinc* и сар., 2013; *Ozubek* и *Aktas*, 2017; *Sevinc* и сар., 2018; *Ceylan* и *Sevinc*, 2020; *Ceylan* и сар., 2021). Интересантно је да су турски истраживачи у испитивању епизоотиологије врсте *B. ovis* код малих преживара прихватили концепт „ензоотске стабилности“ који је примјењен на врсти *B. bovis* (*Smith*, 1984). Националне серолошке студије анализе присуства врсте *B. ovis* су потврдиле серопреваленцију до 80% у појединим подручјима Турске (*Ceylan* и *Sevinc*, 2020).

Поред Турске, значајан број теренских епизоотиолошких студија на тему инфекције врстом *B. ovis* и вектора *R. bursa* спроведен је у Израелу (*Yeruham* и сар., 1998а). У овим студијама, по први пут се у епизоотиологији ове болести примјењује термин „ензоотски фокус“ (*Yeruham* и сар., 1995). Аутори су сезонским праћењем установили да се клиничка бабезиоза јавља са највећом инциденцијом у мају, 14 дана након појаве адултних облика *R. bursa*. Клинички обољевају млађа грла до годину дана старости, сваке сезоне у истим стадима, чак и са високим процентом серопозитивности – до 84,5% (*Yeruham* и сар., 1995). Ово указује да се епизоотиологија врсте *B. ovis* разликује од врсте *B. bovis* код говеда (*Yeruham* и сар., 1992; *Yeruham* и сар., 1995). Од других земаља Блиског истока, сматра се да бабезиоза оваца има ензоотски карактер у појединим провинцијама Ирана (*Fakhar* и сар., 2012), гдје је доказана преваленција врсте *B. ovis* до 86,4% (*Habibi* и сар., 2020). О сличној епизоотиолошкој ситуацији у овој земљи извјештавају *Ranjbar-Bahadori* и сар. (2011) који потврђују да је *B. ovis* доминантан узрочник бабезиозе оваца. Молекуларно испитивање указује да је *B. ovis* присутна и код коза на Филипинима, односно далеком истоку Азије (*Galon* и сар., 2022).

Иако се од раније зна да је дистрибуција *B. ovis* установљена у земљама сјеверне Африке које припадају медитеранском појасу (*Waal*, 2000), најновији подаци указују да је ова врста молекуларним методама потврђена у Уганди (*Tumwebaze* и сар., 2020), Тунису (*Rjeibi* и сар., 2016) и Алжиру (*Aouadi* и сар., 2017). Најинтересантнији је налаз *B. ovis* код асимптоматских коза у Уганди, која не спада у медитерански појас, што потврђује да дисперзија ове врсте захвата много веће подручје од сјеверне Африке. Све три епизоотиолошке студије у Африци су вршене по принципу студије пресека у периоду прољећа и љета када се очекује највећа инфестација крпељима, при чему су доказана асимптоматска клицоноштва код оваца и коза. За разлику од испитивања у другим подручјима Медитерана, гдје је доминантно присуство вектора *R. bursa*, ентомолошка испитивања у Африци су показала значајну заступљеност врсте *Rhipicephalus turanicus* (*Rjeibi* и сар., 2016; *Aouadi* и сар., 2017).

Нови подаци из Европе указују да инфекције врстом *B. ovis* нису од већег значаја, јер се болест ријетко појављује у опсјегу жаришта са већим бројем клиничких случајева. Установљено је присуство ДНК ове врсте примјеном PCR метода у Португалији (*Horta* и сар., 2014), Шпанији (*Nagore* и сар., 2004), Грчкој (*Theodoropoulos* и сар., 2006) и Италији (*Savini* и сар., 1999). Као што се види из наведених података, бабезиоза оваца је установљена на Пиринејском, Апенинском и Балканском полуострву.

Примјећено је да су локални сојеви врсте *B. ovis* у Португалији мање патогени у односу на друге земље гдје је болест присутна, као и да на патогеност



ове бабезије могу да утичу коинфекције са другим крвним паразитима (*Horta* и сар., 2014). Ови аутори такође наводе да упоредна примјена двије различите PCR методе повећава осјетљивост детекције генома врсте *B. ovis* код субклиничких инфекција, односно повећава могућност утврђивања клицоноша. У сјеверној Шпанији постоје наводи да је идентификован геном *B. ovis* методом реверзне хибридизације у 2,5% случајева од укупно 400 прегледаних здравих оваца, иако нису јасно презентовани епизоотиолошки подаци географске дистрибуције патогена (*Nagore* и сар., 2004). Битна је чињеница да присуство генома *B. ovis* није установљено у групи оваца које су биле пореклом из планинске регије сјеверне Шпаније. Присуство ове бабезије у Шпанији потврђује на неки начин и присуство главног вектора *R. bursa*, али и других врста крпеља из овог рода (*Rhipicephalus sanguineus*) (*Estrada-Peña* и сар., 2004б). О клиничкој бабезиози код девет оваца у Шпанији извјештавају *Criado-Fornelio* и сар. (2003), док су *Ferrer* и сар. (1998) у Каталонији потврдили серопреваленцију инфекције врстом *B. ovis* од 6,1% на испитаном узорку од 2174 асимптоматских оваца. Интересантан је налаз жаришта пироплазмозе код имунонаивних високопродуктивних оваца које су настањене у ензоотском подручју Шпаније, код којих је доказано истовремено присуство *B. ovis*, *Theileria ovis* и *Anaplasma ovis* (*Hurtado* и сар., 2015). Ово је један од малобројних описаних и изолованих случајева жаришта клиничке пироплазмозе у Европи.

У Италији, описано је мање жариште бабезиозе оваца узроковано врстом *B. ovis* у јужној италијанској регији Абруцо (*Savini* и сар., 1999). На јужном дијелу Балканског полуострва прије више од 15 година спроведена је само једна молекуларна студија која потврђује присуство врсте *B. ovis* код асимптоматских оваца (*Theodoropoulos* и сар., 2006). Ово испитивање је спроведено у Тесалији и Епиру, двије грчке регије које представљају специфично овчарско подручје. Установљена је молекуларна преваленција ДНК *B. ovis* од 15%, након што је прегледано 97 оваца из 21 стада. Десет година раније од наведене молекуларне студије, у Грчкој је спроведена серолошка студија, применом технике индиректне имунофлуоросценције при чему је констатована висока серопреваленција инфекције врстом *B. ovis* (*Paradopoulos* и сар., 1996). Обе студије указују на то да је ова патогена бабезија високо заступљена у популацији оваца у Грчкој, али и на чињеницу да нису детектовани клинички случајеви болести.

Радови на тему епизоотиологије бабезиозе оваца у Европи су оскудни, а у постојећим наводима није описан значајан број жаришта или клиничких случајева. Наведени случајеви углавном су опсервациони и потврђују само присуство узрочника без дискусије о патогености и утицају на здравствено стање оваца.

### **2.3. Етиопатогенеза инфекције оваца изазване врстом *Babesia ovis***

Протозое из родова *Babesia* и *Theileria*, заједно са хемопатогенима из родова *Anaplasma*, *Ehrlichia* и *Hepatozoon* изазивају групу болести које преноси крпељи. Код оваца и коза је установљено укупно пет врста интрацелуларних паразита из рода *Babesia*: *B. ovis* (*Babeş*, 1892; *Starcovici*, 1893), *B. motasi* (*Wenyon*, 1926), *B. crassa* (*Hashemi-Fesharki* и *Uilenberg*, 1981), *B. foliata* (*Ray* и *Raghavachari*, 1941) и *B. taylori* (*Sarwar*, 1935). Подјела бабезија по врстама је заснована углавном на морфолошким и морфометријским разликама. Сматра се да су валидне врсте *B. ovis* (*Babeş*, 1892; *Starcovici*, 1893), *B. motasi* (*Wenyon*, 1926) и *B. crassa* (*Hashemi-Fesharki* и *Uilenberg*, 1981). Према таксономској класификацији врста *B. ovis*

припада царству: Protista; типу: Protozoa; подтипу: Apicomplexa; реду: Piroplasmorida; породици: Babesiidae и роду: *Babesia*.

*Soulsby* (1982) описује врсту *B. ovis* као типичну малу пироплазму величине од 1 до 2,5  $\mu\text{m}$ . Интрацелуларни облици ове бабезије су округлог до крушколиког облика и смјештени су на периферији еритроцита, при чему формирају типичан туп угао између два мала мерозоиота. Доминантан микроскопски налаз код ове врсте су појединачни округли, субсферични, анаплазмодни до прстенасти облици (*Suleimanov*, 1976; *Habela* и сар., 1990). Облик мерозоиота у периферној крви је у корелацији са током и степеном инфекције. Сходно томе, у фундаменталној литератури (*Soulsby*, 1982), описани су типични дупли крушколики облици, који су видљиви у иницијалној фази инфекције (*Habela* и сар., 1990).

Умножавање мерозоиота *B. ovis* се под утицајем имунског одговора успорава, тако да се микроскопским прегледом у каснијој фази болести чешће налазе само појединачни облици паразита (*Habela* и сар., 1990). Крушколики облици су само видљиви у дуплој форми (*Purnell*, 1981). Атипична, крупна форма врсте *B. ovis* са полиморфним мерозоиотима (округли, крушколики и прстенасти облици), слична врсти *B. motasi*, је потврђена молекуларним методама (*Shayan* и сар., 2008). Овакви мерозоиоти су правили оштре до тупе углове у различитим дијеловима еритроцита и били су дужине преко 2,7  $\mu\text{m}$ . Слично томе, установљена је *B. ovis* која прави интраеритроцитне форме у облику „крста“ кога чине четири мерозоиота (*Yeruhant* и сар., 1992). Морфолошки описи ове врсте указују на полиморфизам у облику, величини и локализацији у еритроцитну.

Без обзира што је врста *B. ovis* позната 130 година у стручној литератури, бројни механизми патогенезе ове патогене хемопротозое нису и даље разјашњени (*Rahbari* и сар., 2008). Прихваћени су општи ставови да је имунопатогени процес инфекције овом врстом сличан инфекцији врстом *B. bovis* код говеда (*Habela* и сар., 1991). Ова констатација је повезана са чињеницом да је врста *B. bovis* много чешће била предмет испитивања, у односу на друге врсте. *Babesia ovis* индукује лезије на нивоу еритроцита и крвних судова повећавајући пермеабилност капилара, вазодилатацију и стазу у васкуларном кориту. Сматра се да је висок ниво паразитемије, коју постиже *B. ovis* у циркулацији домаћина након инокулације спорозоиота из пљувачке крпеља, повезан са значајним поремећајима оксидативног система еритроцита и других ћелија крвног система доводећи до општег инфективног синдрома кога прати хиперпирексија, а одмах затим и анемија (*Esmailnejad* и сар., 2014а).

Хемолиза еритроцита код инфекције пироплазмама из рода *Babesia* настаје из сљедећих разлога: 1) механичко оштећење мембране еритроцита усљед репликације мерозоиота; 2) имунопосредовани процес, који има за последицу аутоимунску хемолитичку анемију и 3) еритрофагоцитоза у слезини (*Rahbari* и сар., 2008). У случају инфекције врстом *B. ovis*, сматра се да је еритрофагоцитоза од стране активираних макрофага у слезини доминантан процес, који доводи до хемолитичке анемије (*Esmailnejad* и сар., 2014а). Хемолиза еритроцита води у анемију са брзим падом хематокрита, хемоглобина и броја еритроцита у крви, а забиљежене су и тромбоцитопенија и панцитопенија (*Sevinc* и сар., 2013). Микроцитна и хипохромна анемија је највише изражена четвртог дана након инфекције и у директној је корелацији са степеном паразитемије (*Esmailnejad* и сар., 2014а). Ниво леукоцита варира у крви, а регистрована је и честа леукоцитоза усљед ткивног оштећења (*Koch*, 1968). Нова клиничко-патолошка испитивања

указују да је леукоцитопенија доминантан налаз код високог степена паразитемије са *B. ovis* (Sevinc и сар., 2013).

Од биохемијских промјена у крвном серуму се биљежи значајан пораст билирубина, ензима јетре (аспартат аминотрансферазе) и урее (Esmailnejad и сар., 2014а; Sevinc и сар., 2013). Пораст урее у крвном серуму код теже обољелих оваца може имати за посљедицу повећање тјелесне температуре и грозницу (Turgut, 2000; Sevinc и сар., 2013). Статистички значајан пораст билирубина у серуму обољелих оваца у односу на здраве је повезан са хемолизом еритроцита и посљедичним оштећењем јетре усљед аноксије, односно хепатоцелуларном некрозом, што доводи и до пораста ензима јетре у крви (Sevinc и сар., 2013). Пораст ензима аспартат аминотрансферазе у крви обољелих оваца дијелом потиче од оштећења еритроцита (Latimer и сар. 2003; Esmailnejad и сар., 2014а). Биљежи се и пад укупних протеина и албумина у крви код обољелих оваца (Yeruham и сар., 1998б). Поред промјена у броју крвних елемената, односно ћелија и ензима у крви, један од основних патогених процеса који настаје код паразитемије изазване врстом *B. ovis* је дисеминована интраваскуларна коагулација - ДИК (Habela и сар., 1991; Yeruham и сар., 1998б).

Дисеминована интраваскуларна коагулација је комплексни патогени процес који је повезан са генерализованим оштећењима крвних судова на нивоу ендотела капилара, при чему се запажају васкулитис, микротромбови, некроза и крварење. Овај процес значајно „троши“ зреле тромбоците и због тога је напоменута тромбоцитопенија доминантан знак акутне инфекције (Yeruham и сар., 1998а; Sevinc и сар., 2013). Често, ДИК је иререверзибилни процес и доводи до ендотоксичног шока, аноксије и посљедичног угинућа. За разлику од врсте *B. bovis*, прелазни облици *B. ovis* нису установљени у крвним судовима мозга, при чему изостају и нервни симптоми код бабезиозе оваца (Yeruham и сар., 1998б). Ово указује да *B. ovis* нема изражен ендотелиотропизам као наведена врста бабезија говеда.

У подручјима ензоотског фокуса или ензоотски нестабилним подручјима, јагњад старости 2-3 мјесеца не обољевају од клиничке бабезиозе због присуства активних колостралних антитијела (Yeruham и сар., 1998а). Међутим, касније је доказано да титар антитијела након вјештачке инфекције врстом *B. ovis* није у корелацији са степеном имунитета који је формиран након природне инфекције (Erster и сар., 2016а). То значи да је старосно зависни имунитет, у пракси, уједно и вид природно урођеног имунитета јагњади. Ова појава је уочена и код бабезиозе говеда (Bock и сар., 2004). У теренским условима, три су основна критична фактора која регулишу патогеност и тежину клиничке слике која ће се манифестовати: 1) количина инокулисаних спорозита паразита (степен инфекције); 2) диверзитет соја; и 3) пријемчивост домаћина која је регулисана имунским статусом јединке (Esmailnejad и сар., 2012; Bilgic и сар., 2020).

Имунска реакција на инфекцију врстом *B. ovis* подразумева комбиновани, хуморални и целуларни одговор на инокулацију спорозита овцама (Bilgic и сар., 2020). Од раније је познато да је за *B. ovis* специфична премунисија - инфективни имунитет, јер се ради о интрацелуларном паразиту. Овај имунолошки феномен није до краја разјашњен, а сматра се да инфициране животиње задржавају низак ниво паразитемије у крви и на тај начин формирају реактивни одбрамбени одговор који их штити од развоја теже клиничке слике. Ако у ензоотско подручје гдје циркулише *B. ovis* у локалној популацији оваца, буду укључене овце са неензоотског подручја и без претходног контакта са узрочником, онда по правилу

те животиње обољевају са тежом клиничком сликом (*Angelovski и сар., 1963; Hurtado и сар., 2015*). Очигледно да постоји динамичка равнотежа између домаћина и паразита, а ако је она неким факторима нарушена, онда се формирају ензоотски фокуси, дистрикти или ензотски нестабилна подручја. Од раније је познато да патогеност врсте *B. ovis* може да зависи и од локације испитивања, при чему је утрђено присуство патогенијих изолата ове врсте у Румунији и Бугарској (*Lewis, 1980*). Новом студијом је установљен висок степен генетског диверзитета *B. ovis* у популацији оваца са различитих географских локација (*Mira и сар., 2020*). Остаје отворено питање да ли постоји разлика у патогености појединачних изолата *B. ovis* или је у патогени процес инфекције укључено више фактора, као што су имунски статус популације оваца, степен инфестације крпељима, присуство коинфекција и типови спроведених мјера на терену.

Патоморфолошки налаз након угинућа оваца обољелих од акутне клиничке бабезиозе је типичан. Видљиве слузнице су анемичне, а на лешевима је примјетна хидремија и умјерена до тешка кахексија. Поткожно масно ткиво је анемично до субиктерично, а ако је болест имала дужи ток онда је примјетан узнапредовао иктерус. Припадајући лимфни чворови су благо увећани, проквашени са јасно видљивом разликом између коре и сржи. У абдоминалној и торакалној шупљини се налази хеморагични исцједак. На плеури и перитонеуму, као и на другим слузницама, могуће је установити тачкаста до мрљаста крварења. Јетра је увећана, заобљених рубова и жућкасте боје. Слезина је увећана, као и бубрези који су меки на додир. Код неких оваца се уочавају знаци хеморагичног ентеритиса. У мокраћној бешици је присутан урин, тамно-црвене боје. На слузници мокраћне бешике не морају бити присутна крварења. Плућа су едематозна, а на перикарду и миокарду су могућа крварења са хемоперикардом. Опсервацијом централног нервног система, првенствено мозга, може се дефинисати конгестија са депозитима фибрина између можданих вијуга. Хистопатолошким прегледом могу се поставити сљедеће дијагнозе: гломерулонефритис, интерстицијални нефритис и инфаркти у бубрезима; хеморагије и алвеоларни едем у плућима, холангиохепатитис са депозитима хемосидерина у јетри, миокардијална крварења, лимфаденитис са хеморагијама у лимфним чворовима и лимфоцитна инфилтрација нервног ткива (*Habela и сар., 1991*).

#### **2.4. Животни циклус крпеља врсте *Rhipicephalus bursa***

*Rhipicephalus bursa* (*Canestrini и Fanzago, 1877*) или смеђи ушни крпељ се сматра главним паразитом оваца на подручју медитеранског басена. Посебно је битан у трансмисији врста: *B. bigemina*, *B. bovis* и *A. marginale*; оваца и коза: *B. ovis*, *B. motasi*, *Theileria separata*, *A. ovis*, *Ehrlichia ovina*; коња: *B. caballi*, *Th. equi*. Доказано је и да преноси вирус кримске-конго грознице, као и да може да изазове парализу код малих преживара.

Ларве крпеља *R. bursa* су инактивне за вријеме љета, односно за вријеме присуства адултних облика – период високих температура и ниске влаге. Инфестирана подручја се углавном налазе 100-200 метара изнад нивоа мора. На Блиском истоку је утврђено присуство овог крпеља на планинама (*Ziapour и сар., 2016*). Са падом температура, скраћењем фотопериода и повећањем релативне влажности ваздуха, ларве се постепено пењу на биљке (*Yeruham и сар., 1995*). Највећи број ларви у станишту је присутан у октобру и децембру, док се њихов број смањује до фебруара, када се могу у мањем броју наћи на пашњаку и ушима домаћина. Адултни облици се јављају у априлу и налазе се на домаћинима до краја

јула мјесеца. Углавном, ларве и лутке су неактивне за вријеме љетних и зимских мјесеци, када улазе у дијапаузу.

*Rhipicephalus bursa* свој цјелокупни развој завршава у једној години (једна генерација по години), током које исти крпељ максимално може паразитирати код два домаћина. Домаћини за *R. bursa* су мали преживари, али се он може наћи и на говедима, копитарима и понекад на псима. Од дивљачи, *R. bursa* се често налази на зечевима који служе као “мултипликатор” овог крпеља на терену. Што се тиче температуре, адулти *R. bursa* постају активни када дневне температуре пређу 18°C, а ноћне 12°C (Yeruham и сар., 1995). Углавном, овај крпељ је присутан на подручјима за која су специфична дуга сува љета и кратке, благе зиме (Yeruham и сар., 1995). Сматра се да је минимална температура за развој крпеља *R. bursa* 10°C (Feider и сар., 1958). Фитогеографски гледано, најчешће станиште крпеља се састоји од каменитог тла са грмљем, гаригом и макијом.

## 2.5. Клиничко-дијагностички осврт на бабезиозу оваца

Према појединим литературним подацима, бабезиоза оваца узрокована врстом *B. ovis* се назива „малигна бабезиоза оваца“ (Bilgic и сар., 2020). Узрочник поседује висок степен патогености за овце, а обољење протиче у акутном току и у почетку је праћено неспецифичним знацима општег инфективног синдрома: летаргија, општа слабост и грозница (>41°C). Редовно се појављују знаци тахикардије и тахипнеје, а у неким случајевима се биљежи диспнеја (Angelovski и сар., 1963; Yeruham и сар., 19986; Sevinc и сар., 2013). После неспецифичних симптома, јављају се нешто специфичнији знаци ове болести: анемија и иктерус видљивих слузница, хемоглобинурија, пролив и понекад кашаљ (Sevinc и сар., 2013). Клиничка форма болести се јавља искључиво сезонално за вријеме активности крпеља *R. bursa* (мај-август). Морбидитет доста варира, а у ензоотским подручјима морталитет код нелијечених животиња може да буде и 50% (Hashemi-Fesharki, 1997; Sevinc и сар., 2013). У екстремним случајевима могућа су нагла угинућа оваца без претходних клиничких знакова и то првенствено код грла која потичу из не-ензоотског подручја (Uilenberg, 2006; Hurtado и сар., 2015). Постоји разлика у испољавању клиничке слике бабезиозе у односу на расу, пол и старост оваца. Аутохтоне расе се сматрају отпорнијим на паразита, као и млађе јединке, код којих је присутан одређен ниво природног урођеног имунитета (Bock и сар., 2004).

У теренским условима могућа је и ремисија болести након примјене антипротозоарне терапије (Sevinc и сар., 2013). Сматра се да фактори стреса, као што су лоша исхрана и конкурентне инфекције, доприносе ремисији клиничке бабезиозе оваца у ензоотским подручјима (Yeruham и сар., 1998а). Опоравак након терапије акутног тога болести, може у појединим случајевима да буде пролонгиран, када се посљедично запажају проблеми у репродукцији и смањена производња вуне и млијека (Renneker и сар., 2013). Један од могућих клиничких исхода акутног тока болести су хронични случајеви бабезиозе оваца, праћени кахексијом, општом слабашћу и анемијом (Yin и сар., 2007). За ову форму болести је типична ниска паразитемија, а животиње могу бити перзистентне клицоноше паразита годинама (Župančić и сар., 1981; Uilenberg, 2006; Yin и сар., 2007; Kage и сар., 2019).

Клиничка сумња се може поставити на основу анамнестичких података, као што су експлозивна и сезонска појава фебрилних стања уз присуство адултних облика крпеља *R. bursa*. Такође, нагла угинућа оваца страних, неаутохтоних раса у

ензоотском подручју могу да пробуде сумњу на бабезиозу оваца. Специфични знаци бабезиозе оваца као што су жутица и хемоглобинурија се појављују у каснијем току и некада су од мањег значаја на терену. Патоанатомски преглед може да употпуни клиничку дијагнозу.

Диференцијално дијагностички се клиничка бабезиоза оваца може помјешати са антраксом, поготово ако се ради о подручјима територијалног поклапања дистрикта ове двије болести (*Miaoulis*, 1931). У случају масовнијих угинућа, бабезиоза оваца се може тешко диференцијално разликовати од тровања биљкама (*Abo-Shehada* и сар., 1988). Друге болести које се морају разликовати од бабезиозе су клостридијалне септикемије, топлотни удар и сунчаница. Ово је важно навести, јер је опште познато да се бабезиоза јавља у врелим љетним мјесецима, када се може јавити топлотни стрес код оваца. Ово је могуће код оваца које се држе у малим загушљивим овчарницима и које нису благовремено шишане.

Дефинитивна или лабораторијска дијагноза се поставља специјалистичким прегледима. Прије ере молекуларних метода дијагностике у клиничкој паразитологији, као „златни“ стандард у дијагностици бабезиозе се користио микроскопски преглед периферне венске или капиларне крви обољелих оваца (*Aktas* и сар., 2005). Направљени танки крвни размази фиксирани метанолом су бојени стандардизованом методом по Гимзи, Врајту, Романовском и „*Diff-Quik*“ методом. Претпоставка је да се врсте које се накупљају у капиларима или мањим крвним судовим (*B. bovis*), лакше могу детектовати у капиларној крви узоркованој из врха уха (*Figueroa* и сар., 2010). Остале врсте се могу установити у венској крви. Недостаци ове методе су релативно ниска осјетљивост и специфичност у односу на друге софистицираније лабораторијске методе (*Uilenberg*, 2006). Резултати микроскопског прегледа су повезани са знањем и искуством прегледача, тако да „људски“ фактор и субјективност значајно утичу на квалитет ове анализе. Понекад је тумачење микроскопског препарата тешко због велике количине артефаката које прави раствор боје по Гимзи. Као посљедица тога и због чињенице да су еритроцити оваца мањих димензија у односу на еритроците других животиња, мале пироплазме се тешко визуелизују. Мерозоити врсте *B. ovis* у одређеним фазама инфекције морфолошки одговарају и прелазним облицима рода *Theileria* чији су интраеритроцитни облици (округли, прстенести и овални) величине 1,0x2,0  $\mu\text{m}$  (*Urquhart*, 1996).

Додатни проблем у интерпретацији крвног размаза је морфолошки полиморфизам и мале димензије врсте *B. ovis* (мање од 3  $\mu\text{m}$ ), као и низак ниво паразитемије код неких животиња, што смањује осјетљивост детекције мерозоиота (*Friedhoff*, 1997; *Uilenberg*, 2006; *Aktas* и сар., 2005, 2007). Значајна предност ове методе је што се може брзо извести на терену, без захтјевне лабораторијске опреме и што је доста јефтина. Искусан клиничар на основу микроскопског прегледа крвног размаза, уз анамнезу и клинички преглед, може са сигурношћу да потврди или искључи сумњу на бабезиозу у ензоотском подручју.

Поред микроскопских анализа крви, у лабораторијској дијагностици бабезиозе малих преживара већ дужи низ година се користи техника индиректне имунофлуоросценције (*Indirect Fluorescent Antibody Test* - IFAT) (*Ozkuc*, 1979; *Yeruham* и сар., 1995; *Papadopoulos* и сар., 1996; *Ceylan* и *Sevinc*, 2020). Недостатак ове методе је што не може детектовати ране инфекције пироплазмама, као и појава унакрсне реакције са другим врстама бабезија и тајлерија (*Calder* и сар., 1996; *Passos* и сар., 1998; *Aktas* и сар., 2005). Предност ове технике се огледа у томе

што је јефтинија и што може са сигурношћу да утврди епизоотиолошки статус болести, након прегледа већег броја узорака. Под епизоотиолошким статусом се подразумјева анализа: 1) присуства или одсуства патогена у пријемчивој популацији; 2) степена заступљености патогена на одређеним епизоотиолошким подручјима; 3) имунског статуса након примјењене вакцинације и 4) процјене ензоотске стабилности/нестабилности на неком епизоотиолошком подручју (Calder и сар., 1996; Ceylan и Sevinc, 2020). Поред IFAT методе, у дијагностици инфекције врстом *B. ovis* се користила и имуноензимска метода (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) (Duzgun и сар., 1991). Међутим, ова метода није заживјела, тако да је њена употреба у дијагностици доста лимитирана.

Почетком 2000. године почела су интензивна молекуларна испитивања пироплазми родова *Babesia* и *Theileria*. За сада је дизајнирано неколико конвенционалних и *Real-time* PCR протокола за детекцију циљног генома пироплазми родова *Babesia* и *Theileria* код кичмењака и крпеља. У зависности од циљног гена, ове методе омогућавају идентификацију хемопротозоа до нивоа групе, рода или саме врсте и показују при томе значајно већу осјетљивост и поузданост од рутинске микроскопије (Wang и сар., 2015). Употреба специфичних PCR протокола који детектују пироплазме до нивоа рода је препоручена у епизоотиолошким студијама када се очекује присуство више врста пироплазми, или у циљу дијагностичке потврде пироплазмозе, када PCR протокол за детекцију узрочника до нивоа врсте не даје задовољавајуће резултате (лоше дијагностичке перформансе), а на основу микроскопског прегледа се сумња на присуство крвних паразита (Lempereur и сар., 2017).

Са друге стране, PCR протокол који детектује пироплазме до нивоа врсте се примјењује у оним случајевима када се очекује присуство само једне врсте на терену или када се жели извршити испитивање према приоритетима патогености. Таргет гени за детекцију врста из родова *Babesia* и *Theileria* су: *V4* регион - 18S рРНК, *HSP70*, *ITS1*, *CCteta*, *Ema-1* и *Tams* гени, али најчешће се примјењују прајмери који амплификују ген 18S рРНК (Lempereur и сар., 2017). Сматра се да су ови таргет гени најмање склони генским алтерацијама и конзервиране су природе, а да се при PCR реакцији амплификује довољно ДНК за филогенетске студије (Herwaldt и сар., 2003; Lempereur и сар., 2017).

У PCR детекцији врсте *B. ovis* највише се примјењује класични PCR са високо специфичним прајмерима за дио гена комплементаран секвенци рРНК мале субјединице (18S) рибозома величине 549 парова база (Aktas и сар., 2005). Наведени протокол се показао довољно осјетљивим да детектује субклиничке инфекције до нивоа 0,00001% паразитемије и 100 пута је осјетљивији од свјетлосне микроскопије. Уз то, овај протокол је довољно робустан и практичан да се може користити и у детекцији ДНК фрагмента врсте *B. ovis* у крпељима *R. bursa* (Esmaeilnejad и сар., 2014б). Хиперваријабилни *V4* регион гена 18S РНК је добра основа за секвенцирање, што је неопходно за валидацију PCR-а и филогенетско упоређивање са узрочницима исте врсте или истог рода (Salim и сар., 2010). Као слабост класичног PCR-а може се навести да је мање осјетљив од „*nested*” или PCR-а у два степена, гдје у пракси, продукт из прве PCR реакције служи као узорак за другу PCR реакцију (Horta и сар., 2014). Иако је овај PCR показао већу осјетљивост, према литературним подацима, мање се примјењује у лабораторијској дијагностици у односу на наведени класични PCR (Aktas и сар., 2005).

Као алтернативна метода у дијагностици бабезиозе и тејлериозе може се користити метода реверзне хибридизације (Schnittger и сар., 2004). Предност ове

методе је висока осјетљивост, која омогућује детекцију више узročника истовремено, што је од практичног значаја код мјешовитих инфекција (*Schnittger* и сар., 2004; *Nagore* и сар., 2004). У молекуларној дијагностици дизајниран је и *Real-time PCR* за квантификацију генома *B. ovis* (*Erster* и сар., 2015б), али према литературним подацима ова метода није наишла на ширу примјену као конвенционални PCR.

У самој идентификацији *B. ovis*, као и при скринингу више патогена из крви може се користити технологија *Luminex xMAP* (*Ros-García* и сар., 2013; *Hurtado* и сар., 2015). Међутим, ни ова техника није заживјела у свакодневној дијагностици и потврди инфекције врстом *B. ovis*, вјероватно зато што је неопходно издвојити значајна финансијска средства за одржавање или спровођење методе. Предност ове методе је што може за релативно кратко утрошено вријеме идентификовати више „таргет“ патогена у једном узорку.

Не постоје „лоше“ или „добре“ лабораторијске методе у дијагностици бабезиозе оваца и коначном утврђивању врсте *B. ovis*. Важно је исправно интерпретирати примјену процедуре и упоређивати са стањем на терену, затим потребно је познавати ограничења дијагностичких могућности метода и познавати под којим оптималним околностима се могу примјењивати. У појединим ситуацијама неке методе је потребно комбиновати како би добили што валидније резултате (*Lempereur* и сар., 2017). Другим ријечима, прије примјене једне или више метода потребно је одлучити шта се жели постићи одабраним процедурама и како се добијени резултати адекватно могу примјенити на терену.

## **2.6. Терапијске и профилактичке могућности у сузбијању клиничке бабезиозе оваца**

Без обзира на то што су антипротозоарни лијекови и акарицидна средства позната деценијама, сузбијање бабезиозе оваца у ензоотским подручјима је тешко постићи, јер ова болест као и све друге природно жаришне инфекције, зависи од више епизоотиолошких фактора. То су у пракси биотички или абиотички фактори, односно фактори везани за домаћина, вектора и спољашњу средину. *Yeruham* и сар. (1998а) наводе да је неповољно епизоотиолошко стање у ензоотском фокусу директно повезано са сљедећим факторима: 1) промјена праксе сточарења или транслокација стада у ензоотска подручја; 2) неповољни климатски услови; 3) неправилно сузбијање крпеља акарицидним средствима; и 4) интензивна употреба антибабезиозних лијекова у хемопрофилакти. Прије него што се анализира терапијска и профилактичка могућност сузбијања клиничке бабезиозе и инфекције врстом *B. ovis*, потребно је дефинисати опште прихваћени концепт ензоотске стабилности (*Mahoney* и *Ross*, 1972). Познавање овог концепта помаже у одређивању мјера сузбијања које је потребно спровести на неком епизоотиолошком подручју, а постоји тенденција да се овај концепт примјени на бабезиозу оваца (*Ceylan* и *Sevinc*, 2020).

Први пут прихваћен код инфекције врстом *B. bovis*, термин ензоотска стабилност подразумјева специфичну интеракцију између домаћина-крпеља-узročника, гдје постоји мали број клиничких случајева болести упркос значајном присуству узročника и крпеља, због ране имунизације домаћина (*Mahoney* и *Ross*, 1972; *Jonsson* и сар., 2012). Упростиена дефиниција овог концепта може бити: „стање гдје су ријетки случајеви клиничке болести, упркос високом степену инфекције“ (*Coleman* и сар., 2001). Парадокс ове идеје је тај што се сматра да ако спроведемо мјере сузбијања инфекције на подручју гдје је формирана ензоотска



стабилност, постоји ризик да се дестабилизује равнотежно стање између домаћина, крпеља и узрочника и самим тим и да порасте инциденција клиничке болести (Jonsson и сар., 2012). Иако је примјењен математички модел одређивања ензоотске стабилности или нестабилности код оваца (Ceylan и Sevinc, 2020), његово тумачење мора да се врши са резервом (Yeruham и сар., 1995). Разлог за то је свакако што се интеракција домаћин-крпељ-узрочник код оваца разликује од оне код говеда. Сматра се да овце не могу постићи имунитет стада, за разлику од говеда (Ekici и сар., 2012).

Иако је било значајних испитивања на тему вакцинације против бабезиозе оваца, ова мјера до данас није заживјела на терену. Експериментални рад је показао да коимунизација оваца рекомбинантним апикалним мембранским антигеном-1 и атенуираним живим сојем *B. ovis* на ћелијској линији даје најбољу заштиту од природне инфекције (Bilgic и сар., 2020). Према Bilgic и сар. (2020) вакцинални режим коимунизације би вјероватно смањило економске штете у ензоотским подручјима гдје је честа клиничка појава болести, али се коимунизација препоручује као алтернативни метод сузбијања болести. Дуги низ година се користила жива атенуирана вакцина против бовине бабезиозе узроковане врстом *B. bovis*, али највећи проблем су биле тешке поствакциналне компликације на терену и значајан број грла код којих није дошло до оптималног имунског одговора (Bock и сар., 2004). Један од отежавајућих фактора за припрему вакцине против бабезиозе оваца је чињеница да је неопходно извести преко 12 пасажа *B. ovis* кроз организме спленектомизираних јагњади, како би се смањила вируленција (Sevinc и сар., 2014).

Опште је прихваћено да се све мјере сузбијања бабезиозе оваца на терену могу подјелити на три групе:

- 1) употреба хемиотерапеутика у сузбијању клиничке бабезиозе оваца;
- 2) сузбијање крпеља код животиња и у спољашњој средини и
- 3) спровођење зоохигијенских и биосигурносних мјера.

### **2.6.1. Употреба хемиотерапеутика у сузбијању бабезиозе оваца**

У терапији бабезиозе оваца се успјешно примјењују диминазен ацетурат и имидокарб дипропионат (Uilenberg, 2006; Stuen, 2016). Ефикасност имидокарба у терапији бабезиозе оваца у дози од 1,2 mg/kg је евалуирана, при чему је доказано да у наведеној дози овај лијек може да контролише и редукује паразитемију (Sevinc и сар., 2007). У случају ремисије болести и дијагностичке потврде рецидива, могуће је поновити терапију (Sevinc и сар., 2013). Када се апликује у дози од 2,4 mg/kg, профилактичко дејство имидокарба траје 1-2 седмице (Sevinc и сар., 2007). Овај лијек је у Европи регистрован за говеда и псе, док код оваца и даље нису испитани сви фармакокинетички параметри овог препарата. Након једнократне интрамускуларне примјене код малих преживара, резидуе имидокарба перзистентно и дуго остају у јетри и бубрезима (Belloli и сар., 2006). Према доступним подацима, резидуе овог лијека се задржавају у меду и ткивима до шест мјесеци, па препоручене каренце нису у потпуности дефинисане (Traunor и сар., 2013).

Током 2003. године, Европска агенција за евалуацију медицинских средстава (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - ЕМЕА) је предложила максимално толерантну концентрацију резидуа (MRL - *Maximum Residue Limit*) имидокарба код малих преживара: 300 µg/kg у мишићима, 50 µg/kg у масти, 2.000 µg/kg у јетри, 1.500 µg/kg у бубрегу (Belloli и сар., 2006). Максимално

толерантна концентрација резидуа за кравље млијеко у случају имидокарба износи 50µg/kg, а може да се примјени и у случају малих преживара. Међутим, испитивања су показала да елиминација имидокарба путем млијека код оваца и коза значајно варира и потребно је продужити каренцу на десет дана (*Belloli и сар., 2006*).

Диминазен је други лијек који се користи у терапији бабезиозе оваца, али је његова употреба лимитирана на подручју Европе (*Stuen, 2016*). Ефикасност диминазена у теренским условима износи приближно 80% (*Rashid и сар., 2010*). Друга *in vivo* испитивања наговјештавају да ефикасност диминазена у дози од 3,5mg/kg значајно заостаје за комбинацијом имидокарб (2mg/kg) + окситетрацилин (10mg/kg) (*Ijaz и сар., 2013*). Фармаколошке студије указују да је препоручена каренца диминазена за месо код оваца 14-26 дана, ако се користи у дози 2,5 mg/kg и понавља након 24 часа у дози 2,0 mg/kg (*Aliu и Ødegaard, 1985*). У млијеку, након 72 часа од апликације могу се наћи трагови диминазена (0,05 µg/ml), због чега је препоручена каренца за млијеко три дана (*Peregrine и Mamman, 1993*). За разлику од имидокарба, диминазен нема профилактичко дејство против бабезија (*Peregrine и Mamman, 1993*). Од наведених лијекова који се ефективно могу користити у терапији бабезиозе оваца, само имидокарб је регистрован на тржишту Босне и Херцеговине. Ови подаци потичу из важећег регистра ветеринарско- медицинских производа за које је издато одобрење за стављање на тржиште Босне и Херцеговине, од јула 2021. године.

### **2.6.2. Сузбијање крпеља код животиња и у спољашњој средини**

Сузбијање инфестираности оваца крпељима врсте *R. bursa* се углавном спроводи хемијским средствима. У већини земаља гдје органофосфати нису забрањени, најчешће се примјењују прољећна купања органофосфатним једињењима (*Davey и сар., 1989*). Најчешћи представници ових препарата су кумафос, дихлорвос, диазинон, диокситон и хлорпирифос. Један од разлога за ту стратегију је свакако што су органофосфати јефтина средства. Купање оваца се спроводи у прољећном периоду након шишања.

У сузбијању крпеља код оваца на терену су се користили пиретрини и пиретроиди, са најзначајнијим представницима: делтаметрин, флуметрин и циперметрин (*Laing и сар., 2018*). Пиретроиди су од 1949. године у интензивној употреби и имају неколико предности у односу на органофосфате: а) мање су токсични за животиње и људе, али и спољашњу средину и живи свијет; б) крпељи у мањем обиму развијају резистенцију на ове инсектициде. Неријетко су се ова средства налазила у комбинацији са органофосфатима (циперметрин и дихлорвос). За разлику од пиретрина, ова средства нису осјетљива на свјетлост. Флуметрин и делтаметрин су учинковити у релативно ниским концентрацијама, и по први пут су се користили као „*pour on*” средства, а не у облику спрејева и течности за купање. Ова средства се стављају дорзално, дуж кичменог стуба. Испитивања акарицидних средства код врсте *R. bursa* су ријетка, али постоје подаци да акарицидни ефекат делтаметрина у „*pour on*” формулацији траје 21 дан код врсте *R. sanguineus* (*Mehlhorn и сар., 2011*). Доказана је резистенција крпеља *R. bursa* на органофосфате и циперметрин (*Enayati и сар., 2009; Ziapour и сар., 2016*).

Друга акарицидна средства која се користе у пракси су авермектини и то ивермектин, дорамектин и моксидектин. Наведени препарати се користе као „*pour on*” и као инјекциона средства (*Laing и сар., 2018*). На основу општих запажања, макролактонски акарициди су добра и ефикасна средства, али њихову

употребу лимитира висока цијена коштања у односу на друге акарициде. Додатни лимитирајући фактори су и дуга каренца након употребе и то што није препоручена употреба код животиња чије се млијеко користи за људску исхрану. Врло су учинковита против крпеља из рода *Rhipicephalus* (Davey и Georg, 2002).

Од осталих акарицидних средстава, потребно је напоменути амитраз, флуазурон и фипронил. Међутим, ова средства се ређе користе у пракси, посебно код животиња чије се млијеко користи за јавну употребу. Без обзира на учинковитост хемијских акарицидних средстава, важније је осмислити системе контроле и апликације акарицидних средстава, што је процес директно повезан са екологијом појединих врста крпеља. Значајан проблем код примене ових средстава представљају токсичност и резистенција крпеља на активне супстанце, без обзира у којем су се облику примјењивали (Laing и сар., 2018).

Сузбијање крпеља у спољашњој средини може бити хемијско и физичко. У физичке методе уништавања крпеља спадају све методе којима се уништавају станишта крпеља. У наведене методе спадају спаљивање корова, високих жбунастих биљака на пашњацима, затим преоравање и култивација инфестираних површина биљкама које не представљају подесно природно окружење за развој крпеља. Хемијске методе сузбијања крпеља у спољашњој средини подразумевају употребу акарицида којима се уништавају прелазни облици крпеља у станишту (De Meneghi и сар., 2016). У те сврхе се најчешће врши прскање свих постојећих станишта крпеља пиретроидима (перметрин), који су се показали као најбоља средства у сузбијању крпеља у спољашњој средини. Перметрин се најчешће налази у облику аеросол спреја, или долази у облику гранула које се растварају у води. Друга акарицидна средства која се могу користити за сузбијање крпеља у спољашњој средини су: цифлутрин, циперметрин, карбарил, делтаметрин, фипронил, имидоклоприд и пропоксур. Ове методе су непрактичне на великим пашњацима и користе се искључиво на зеленим урбаним површинама.

### **2.6.3. Зоохигијенске и биосигурносне мјере**

Опште је познато да начин држања животиња условљава патологију потенцијалног обољења. Бабезиоза је болест пашног начина узгоја и појављује се на оним подручјима гдје се спроводи екстензиван и традиционалан начин узгоја оваца (Ergüney и сар., 2020). Једна од једноставних метода превентиве клиничке бабезиозе је прегонско напасање и избегавање подручја и пашњака инфестираних крпељима. Фармски узгој и промјена навика овчара би свакако смањили клиничку инциденцију болести. Данас, многе фарме не користе пашу као основни извор кабастог obroка, већ је то силажа и сјенажа, што значи да би смањење испаше смањило и могућности инфестације крпељима. Генерално гледано, повећање биосигурносних мјера на модерним фармама смањује могућности избијања заразних и паразитских обољења.

### **2.7. Економски значај клиничке бабезиозе оваца**

Већ из ранијих литературних навода се закључује да бабезиоза оваца лимитира узгој оваца на оним подручјима гдје за то постоје оптимални услови (Nenadić, 1964). У литератури нема података који служе као економетријски показатељи колико појава ове болести наноси штете овчарству неког подручја, али сви губици усљед болести могу бити директни или индиректни.

Директне штете настају као посљедица високог морталитета проузрокованог овом болешћу и слабији прираст обољелих грла за вријеме акутног и још чешће хроничног тока болести. Директне штете усљед угинућа смањују у коначници производњу меса и вуне. У хроничном току болести смањује се плодност грла и она углавном не улазе у сезонско гоњење. Индиректне штете су цијена ветеринарске интервенције и утрошак новца на куповину и примјену акарицидних средстава у ризичним стадима. Ако није осмишљен оптималан програм сузбијања крпеља у стадима, ови трошкови постају још већи (*De Meneghi* и сар., 2016).

Цијене ветеринарских интервенција драстично расту на тешким и разуђеним теренима због трошкова транспорта и амортизације возила. На крају је важно навести, да ензоотска подручја из којих се купују овце могу да служе као извор инфекција за друга подручја гдје болести нема, а ширење бабезиозе може увећати економске губитке за цјелокупни аграрни сектор. Бабезиоза може да проузрокује и извесне економске проблеме који су везани за чињеницу да се у ензоотска подручја болести ријетко могу увести племенита и високопродуктивна грла, која би служила за оплемењивање локалних раса. Пошто је ријеч углавном о музним расама, производња овчијих млијечних производа у таквим подручјима изостаје (*Angelovski* и сар., 1963).

### 3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА

#### 3.1. Циљ испитивања

Испитивање у докторској дисертацији има за циљ да идентификује, молекуларно потврди, изврши анализу секвенци циљног гена и одреди заступљеност инфекције врстом *Babesia ovis* код клинички сумњивих и асимптоматски инфицираних оваца, на одабраним географским подручјима југоисточне Босне и Херцеговине.

#### 3.2. Задаци испитивања

На основу утврђеног циља истраживања, постављени су сљедећи задаци студије, који су спроведени у изради докторске дисертације:

1. одређивање подручја епизоотиолошког истраживања на основу података прикупљених од теренске ветеринарске службе у југоисточном региону Републике Српске (Босна и Херцеговина);
2. спровођење теренског епизоотиолошког истраживања у стадима оваца на основу:
  - тренутних и ранијих клиничких индиција за болест у стаду,
  - доступних литературних података и
  - анамнезе непознатог угинућа оваца;
3. прикупљање релевантних епизоотиолошких података од теренске ветеринарске службе и узгајивача на испитиваном подручју у циљу идентификације фактора ризика везаних за присуство бабезиозе узроковане врстом *Babesia ovis* на нивоу стада;
4. спровођење групног и индивидуалног клиничког прегледа оваца у стадима која су предмет епизоотиолошког испитивања;
5. вршење паразитолошког прегледа крви код клинички сумњивих оваца из стада која су предмет епизоотиолошког испитивања и морфолошка детерминација крпеља сакупљених у испитујућим стадима оваца;
6. молекуларна детекција врсте *Babesia ovis* применом методе ланчане реакције полимеризације (PCR) у циљу потврде присуства наведеног паразита у узорцима крви оваца и у пуловима крпеља скинутих са оваца;
7. опис клиничке презентације потврђених случајева бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* по принципу клиничке студије без контролне групе;
8. секвенцирање и филогенетска анализа циљног гена мале субјединице рибозомалне рибонуклеинске киселине (18S рРНК) одабраних узорака, у којима је потврђено присуство врсте *Babesia ovis*;
9. формирање обрасца просторне дистрибуције жаришта и дефинисање природног фокуса болести на одабраним епизоотиолошким јединицама Републике Српске (Босна и Херцеговина) помоћу географског информационог система - ГИС;
10. спровођење економетријске анализе и формирање модела „cost-benefit“, како би се извршила компарација трошкова проузрокованих бабезиозом оваца и трошкова превентивних мјера, односно апликације акарицидних средстава овцама у сезони крпеља.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСПИТИВАЊЕ

### 4.1. Материјал испитивања

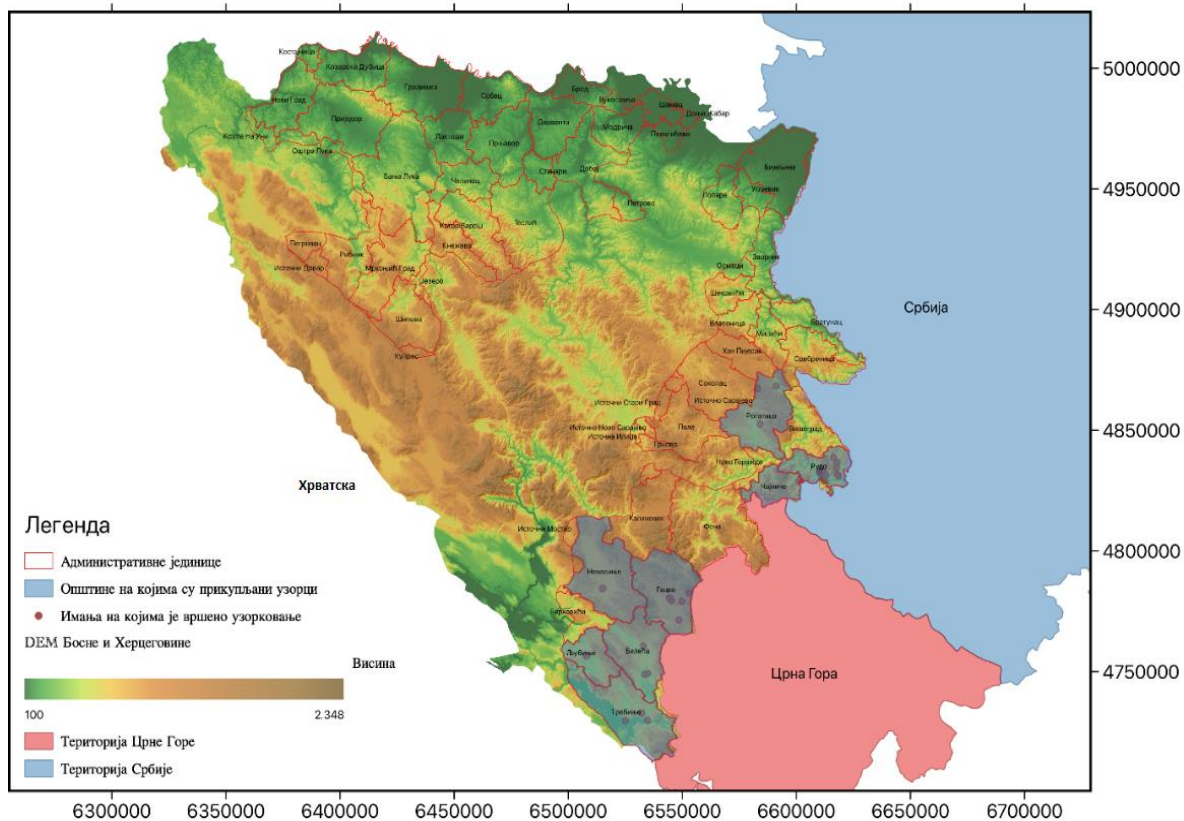
#### 4.1.1. Подручје испитивања

За епизоотиолошко подручје истраживања докторске дисертације је методолошки одабрана географска регија Подриња и Херцеговине са епизоотиолошким јединицама: Рудо, Чајниче, Рогатица, Гацко, Невесиње, Билећа, Љубиње и Требиње. Према члану 34. Закона о ветеринарству у Републици Српској (“Службени гласник Републике Српске 75/17”), епизоотиолошка јединица је подручје које обухвата територију јединице локалне самоуправе или њен дио, на коме се спроводе мјере прописане овим законом, док став 2. члана 34. овог Закона дефинише да је епизоотиолошко подручје састављено од више поменутих јединица (Anonimus, 2017). У овом случају, наведене епизоотиолошке јединице територијално заузимају цијело географско подручје одговарајућих локалних самоуправа. Географски гледано, у регију Подриња спадају епизоотиолошке јединице Рогатица, Чајниче и Рудо. Према основној дефиницији, Подриње је меридијански издужена југоисточна регија око ријеке Дрине и представља погранични појас Републике Српске (Босна и Херцеговина) са Републиком Србијом и Црном Гором (Табела 1; Мапа 1).

Регији Херцеговине припадају епизоотиолошке јединице Гацко, Невесиње, Билећа, Љубиње и Требиње. Херцеговина је значајно географско подручје у Републици Српској (БиХ) специфично по типичном планинском и медитеранском подручју кога чини дио Динарских планина. У овом географском подручју, специфични су предјели карста, плодних крашких поља и највећих планинских масива са природним котлинама и језерима. Због диференцијалне дијагнозе, значајно је нагласити да су поједина херцеговачка крашка поља била подручја појаве антракса. Тренутно су према члану 2. важећег Правилника о мјерама за сузбијање и искорјењивање бедренице код животиња („Службени гласник Републике Српске 11/95“) поједина подручја епизоотиолошке јединице Гацка и Билеће проглашена дистриктима антракса (Anonimus, 1995). Ово подручје се граничи са Црном Гором и Републиком Хрватском.

**Табела 1. Основни географски, климатски и територијални подаци испитиваног епизоотиолошког подручја Подриња и Херцеговине и број регистрованих ветеринарских организација**

Епизоотиолошка јединица	Површина	Рељеф/клима	Број ветеринарских организација
Рогатица	664 km <sup>2</sup>	планинско-котлински/континентална	3
Рудо	344 km <sup>2</sup>	брдско-планински/континентална	1
Чајниче	275 km <sup>2</sup>	брдско-планински/континентална и планинска	1
Гацко	736 km <sup>2</sup>	планински/континентална до планинска	2
Невесиње	877 km <sup>2</sup>	брдско-планински/умјерена континентална	3
Билећа	633 km <sup>2</sup>	брдско-крашки/медитеранска и континентално-планинска клима	1
Љубиње	341 km <sup>2</sup>	брдско-крашки/медитеранска	1
Требиње	854,5 km <sup>2</sup>	брдско-крашки/медитеранска	3



**Мапа 1. Испитивано подручје Подриња и Херцеговине - епизоотиолошке јединице (општине) у којима су прикупљени узорци**

#### 4.1.2. Животиње

Предмет испитивања на епизоотиолошком подручју су биле овце и крпељи (вектори). Испитани су узорци крви од 192 овце из 53 стада, при чему је 76 јединки показивало тренутну (*status praesens*) клиничку сумњу на акутну и хроничну бабезиозу (Табела 2).

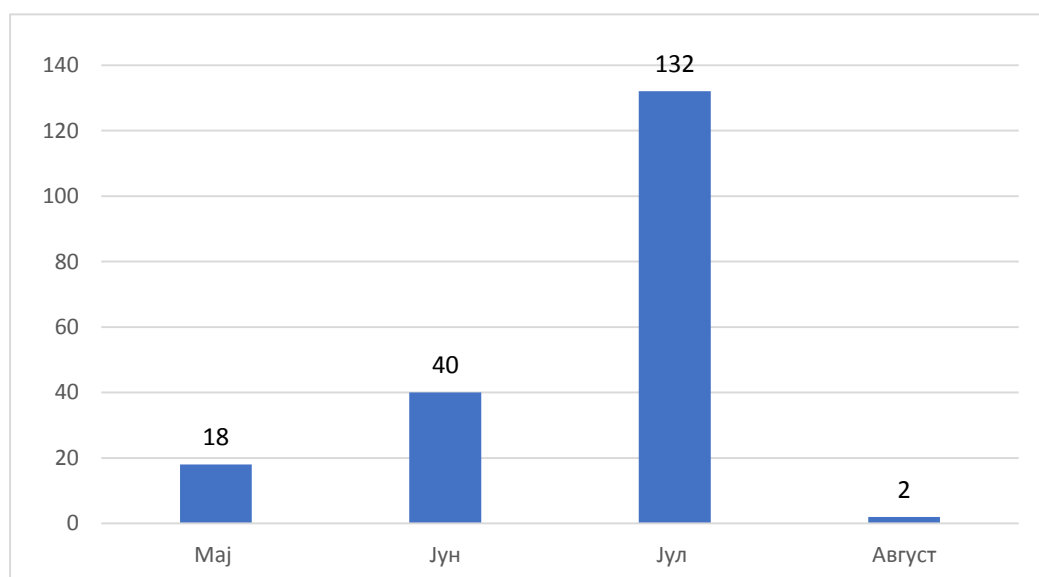
**Табела 2. Број испитаних оваца по епизоотиолошким јединицама**

Епизоотиолошка јединица	Број испитаних оваца	Број претражених стада
Рогатица	15	3
Рудо	75	33
Чајниче	10	1
Гацко	47	7
Невесиње	8	2
Билећа	20	3
Љубиње	10	1
Требиње	7	3
<b>Укупно</b>	<b>192</b>	<b>53</b>

Истраживање је спроведено у периоду од 2019. до 2021. године, а број испитаних животиња по годинама је био: 18 (у 2019. години), 104 (у 2020. години) и 70 (у 2021. години). Највећи број оваца је испитан у епизоотиолошким јединицама Рудо (75) и Гацко (47), затим у Билећи (20), Рогатици (15), Чајничу и Љубињу (по 10) и Требињу (7) (Табела 3).

**Табела 3. Број испитаних животиња по годинама у епизоотиолошким јединицама**

Епизоотиолошка јединица	Година истраживања		
	2019.	2020.	2021.
Рогатица	-	15	-
Рудо	18	18	39
Чајниче	-	10	-
Гацко	-	31	16
Невесинје	-	-	8
Билећа	-	20	-
Љубиње	-	10	-
Требиње	-	-	7
<b>Укупно</b>	<b>18</b>	<b>104</b>	<b>70</b>



**Графикон 1. Период узорковања од испитаних оваца у епизоотиолошким јединицама од 2019. до 2021. године**

Што се тиче периода узорковања током сезона 2019-2021. године, од испитиваних оваца у мају је сакупљено 18 узорка, у јуну 40, у јулу 132 узорка и у августу мјесецу два узорка (Графикон 1). Током наведеног периода истраживања, у мају су утврђене две клинички сумњиве овце, у јуну 26, у јулу 46, а у августу две клинички сумњиве овце.

Истраживање је укључило и сакупљање адултних облика крпеља из праћених стада. У сезони периода (мај-август) 2019-2021. године укупно је прикупљено 109 адултних облика крпеља из 13 стада епизоотиолошких јединица Рудо, Рогатица и Билећа. Крпељи су сакупљени са животиња у подручју репа,



вимена, ингвинална регија и абдомена. Од укупно 13 стада у којима су сакупљани крпељи, у осам је потврђена тренутна клиничка сумња на болест код оваца.

#### **4.1.3. Метеоролошки подаци**

Метеоролошки подаци по епизоотиолошким јединицама, за епизоотиолошко подручје од интереса, добијени су од Републичког хидрометеоролошког завода (Републике Српске) након службеног захтјева. Прикупљени су подаци за 2019-2021. годину и то за мјесеце (мај-август) у сезони испитивања, на подручјима гдје је постојала сумња на клиничку бабезиозу оваца.

### **4.2. Методе испитивања**

#### **4.2.1. Иницијална теренска запажања и дефинисање подручја испитивања**

Крајем јула 2019. године, спроведено је службено теренско испитивање у општини Рудо, која је смјештена у географској регији познатој као Подриње и заузима географски положај крајњег истока Босне и Херцеговине. Разлог за испитивање је била сезонска и експлозивна појава фебрилних стања код оваца у неколико села. Локални ветеринари су спроводили терапију имидокарбом, антибиотцима и нестероидним антиинфламаторним лијековима, због сумње да се ради о пироплазмози или некој другој болести коју преносе крпељи. Након узорковања крви сумњивих и здравих оваца из стада са историјом сумње на клиничку пироплазмозу, микроскопским прегледом је установљено присуство пироплазми. Узорци пореклом од осам оваца, од укупно 18 праћених, су послати у Лабораторију за паразитологију Хрватског ветеринарског института (Загреб, Хрватска) на РСР анализу. Код свих осам узорака је установљено присуство генома пироплазми и анаплазми. Укупно 18 узорака пуне крви оваца из Руда, сакупљених у иницијалном теренском испитивању, сачувани су на  $-20^{\circ}\text{C}$ , док су крпељи детерминисани и сачувани у 96% етанолу. Подаци добијени иницијалним испитивањем узорака ( $n=18$ ) су укључени у резултате докторске дисертације.

Након постављене дијагнозе пироплазмозе у Рудом 2019. године, извршено је кратко епизоотиолошко анкетање 13 регионалних теренских ветеринара из 12 ветеринарских организација у оквиру јединица: Рогатица, Вишеград, Чајниче, Ново Горажде, Фоча, Калиновик, Невесиње, Гацко, Билећа, Љубиње и Требиње (Табела 1). Анкете су послате поштом, електронском поштом или су попуњаване лично приликом посјете ветеринарској организацији.

Кратка анкета је садржала следећа питања:

- „Да ли постоји сумња да се на вашој епизоотиолошкој јединици појављује пироплазмоза оваца?“

- „Да ли је лабораторијски потврђена пироплазмоза оваца?“

- „Који је оквирни проценат клиничког појављивања пироплазмозе оваца утврђен по стаду?“

- „Који је проценат морталитета установљен као последица пироплазмозе оваца?“

- „Који су лијекови примењивани у терапији?“

- „Које су превентивне методе спровођене у контроли пироплазмозе?“

На основу одговора добијених из спроведене епизоотиолошке анкете, формиран је план да се настави шире географско истраживање пироплазмозе и

одабрана је *Babesia ovis* као предмет истраживања. Овом узрочнику је дат приоритет због већег степена патогености у односу на остале врсте рода *Babesia*.

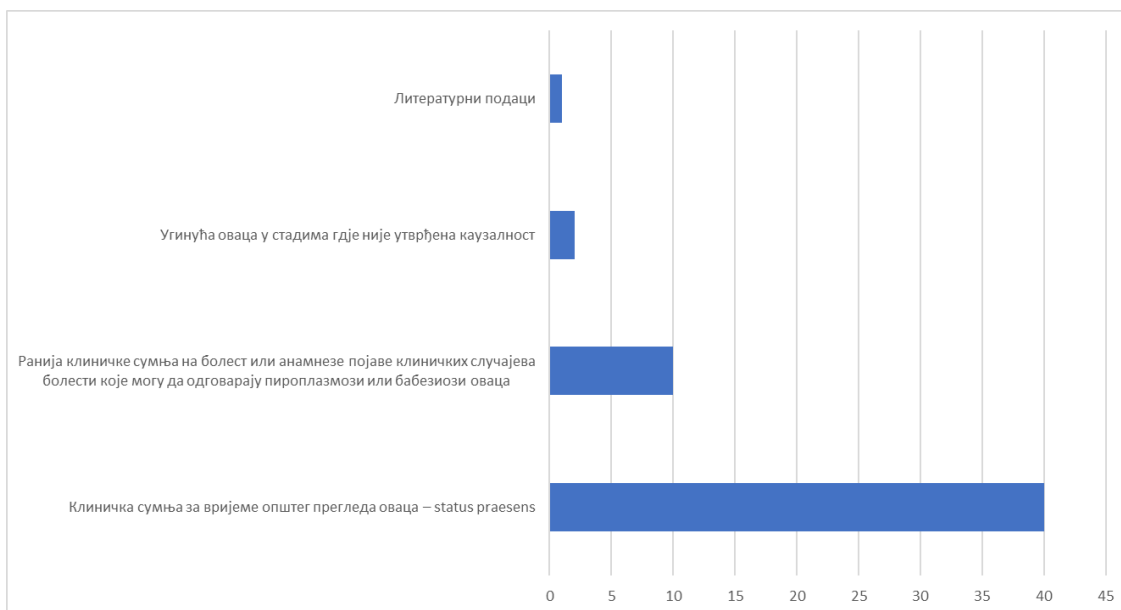
Ветеринари из епизоотиолошких јединица Чајниче, Гацко, Невесиње, Билећа, Љубиње и Требиње су навели да постоји сумња на пироплазмозу оваца на припадајућем терену и да је морталитет низак, односно да се јављају спорадична угинућа. Лабораторијски је болест била потврђена само у једном стаду у Невесињу током 2017. године. Ветеринари су емпиријски у терапији користили имиδοкарб дипропионат, а као превентивне мјере су препоручивали купање оваца растворима акарицидних средстава.

По завршетку иницијалног испитивања из 2019. године и епизоотиолошке анкете и након одређивања подручја истраживања, ветеринарске организације су обавјештене да ће се спроводити активни и клинички надзор са циљем да се испита присуство врсте *B. ovis* на епизоотиолошким јединицама Чајниче, Рудо (наставак надзора), Гацко, Билећа, Невесиње, Љубиње и Требиње. Иако су ветеринари из епизоотиолошке јединице Рогатица за вријеме анкетирања наговјестили да се ова болест не појављује на том подручју, теренско испитивање и узорковање је извршено због ванредне клиничке сумње у једном стаду.

#### **4.2.2. Узорковање**

Узорковање пуне крви од 192 овце из 53 стада је базирано на принципу селективног или циљаног бирања животиња и стада за укључивање у студију (без постављања интервала вјероватноће) на основу сљедећих критеријума: 1) клиничке сумње за вријеме општег прегледа оваца – *status praesens*; 2) раније клиничке сумње на болест или анамнезе појаве клиничких случајева болести, који могу да одговарају пироплазмози; 3) доступних литературних података и 4) угинућа оваца у стадима гдје није утврђена каузалност (Графикон 2). Овај модел узорковања је извршен у циљу детекције болести по принципу потраге за клиничким случајем (*Smith, 2019*).

Селективно је узоркована пуна крв (максимално 3 ml са додатком антикоагуланса EDTA - *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) из југуларне вене оваца. Крпељи су сакупљени са оваца мануелно у пластичне чаше запремине 50 ml и идентификовани након неколико часова. За потребе молекуларних испитивања крпељи су чувани у 96% етанолу на температури -20°C. Од укупно 53 испитана стада, крпељи су сакупљени у 13 стада, са оваца које су показивале клиничке симптоме бабезиозе, али и са оваца код којих у том тренутку није постојала сумња на болест.



**Графикон 2. Критеријуми селективног узорковања у стадима оваца**

#### 4.2.3. Епизоотиолошко испитивање

Поштујући основне нормативе эпизоотиологије, ово испитивање је урађено као квалитативна, лонгитудинална и теренска студија, са описом и анализом клиничке групе болесних оваца, уз примену терапије и без контролне групе (Smith, 2019).

Пошто је ријеч о континуираном просторно – временском испитивању, током кога су утврђиване детерминанте појаве болести у току сезоне мај-август, эпизоотиолошки подаци су узети од надлежних ветеринара у испитиваним эпизоотиолошким јединицама, од узгајивача чија су стада испитивана, а прикупљени су и дескриптивни подаци на нивоу сваке испитиване јединке (старост, пол и раса) (Табела 4).

**Табела 4. Подаци који су узети од узгајивача и ветеринара током обиласка стада оваца**

Надлежни ветеринар	Узгајивач/држалац
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Да ли је присутна болест на ужем подручју эпизоотиолошке јединице?</li> <li>2. Да ли је болест стационарна дуже на терену?</li> <li>3. Опште особине начина држања оваца:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- екстензивно/интензивно;</li> <li>- период јагњења;</li> </ul> </li> <li>4. Да ли постоји ефикасна контрола кретања?</li> <li>5. Да ли је подручје антраксни дистрикт?</li> <li>6. Каква је пракса контроле вектора у стаду? (од стране ветеринара или држалаца животиња)</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Да ли су упознати са болести?</li> <li>2. Број оваца у стаду?</li> <li>3. Доминантан тип производње:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- месо, млијеко, комбиновани;</li> </ul> </li> <li>4. Да ли су биљежили угинућа усљед болести?</li> <li>5. Да ли су спроводили контролу против крпеља у току године (апликација ивермектина, купање у акарицидним средствима)?</li> </ol>

#### **4.2.4. Клиничко испитивање без контролне групе**

Извршен је групни преглед 53 стада оваца, а затим је приступљено индивидуалном прегледу животиња, при чему су евидентирани најважнији клинички знаци болести (Smith, 2019). Приликом прегледа оваца евидентирани су подаци о присуству крпеља на нивоу стада. Основни критеријум за постављање тренутне клиничке сумње акутне бабезиозе била је појава повишене телесне температуре. Критеријуми за сумњу на хроничне случајеве бабезиозе су били: историја акутне форме болести са апликацијом имидокарба, кахексија, жутица и слабији апетит.

Свим обољелим животињама после узорковања је интрамускуларно апликован имидокарб дипропионат (*Imizol, Intervet International B.V., Holandija; Imochem, Interchemie, Holandija*) у дози 1,2 mg/kg. Изузетак су хронични случајеви, код којих није спровођена терапија. Клиничка контрола је вршена након 24 часа, а у неким случајевима су узгајивачи телефонски контактирани и питани за опште здравствено стање лијечених оваца.

#### **4.2.5. Паразитолошко испитивање**

##### **4.2.5.1. Микроскопски преглед крви клинички сумњивих оваца**

Од укупно 76 клинички сумњивих оваца, у 74 случаја извршен је микроскопски преглед крви методом крвног размаза који се боји по Гимзи. У једном случају препарат није тумачен због значајне количине артефаката, док је у другом случају узорак подвргнут PCR испитивању прије микроскопског прегледа. Од венске крви направљени су танки крвни размази, који су након сушења на собној температури фиксирани метанолом у трајању од пет минута. После фиксације, препарати су бојени раствором по Гимзи (*GramMol doo, Хрватска*) у трајању од 20 минута. Након испирања боје водом и сушења препарата на собној температури, приступило се микроскопском прегледу препарата на увећању 1000x уз додатак имерзионог уља и идентификацији развојних облика пироплазми у еритроцитима. Током микроскопског прегледа, евидентирани су подаци о присуству пироплазми на крвном размазу и извршен је оквирни морфолошки опис развојних облика паразита у еритроциту.

##### **4.2.5.2. Морфолошка идентификација и детерминација крпеља**

У периоду истраживања, од јула 2019. до краја јула 2021. године, насумично је сакупљено укупно 109 адултних облика крпеља са оваца из епизоотиолошких јединица Рогатица, Рудо и Билећа. Морфолошка идентификација и детерминација је вршена до нивоа пола и врсте на основу паразитолошког кључа (*Estrada-Peña и сар., 2004а*). У случајевима када крпељи нису сакупљени, само је евидентирано њихово присуство.

##### **4.2.5.3. Праћење дистрибуције вектора на основу метеоролошких података**

Извршена је анализа локације и временског периода када су узорковани крпељи, у односу на добијене метеоролошке податке испитиваног подручја.

#### **4.2.6. Молекуларна идентификација врсте *Babesia ovis* и других пироплазми**

У циљу молекуларне детекције врсте *B. ovis* и групе *Babesia/Theileria* из узорака пуне крви оваца и молекуларне детекције врсте *B. ovis* из пулова крпеља, спроведени су конвенционални PCR протоколи.

##### **4.2.6.1. Екстракција нуклеинске киселине**

Екстракција ДНК паразита из пуне крви оваца и крпеља вршена је применом комерцијалног кита *IndiSpin Pathogen Kit (Qiagen GmbH for Indical Bioscience, Немачка)* према упутству произвођача. Пуна крв оваца је процесуирана без претходне предприпреме узорка.

Од 109 детерминисаних крпеља, за PCR анализу је употребљено 55 крпеља из стада гдје је постављена клиничка сумња на бабезиозу. Од 55 адултних облика претходно детерминисаних крпеља, формирано је шест пулова, при чему је сваки пул представљао једно стадо оваца. Пуловани узорци крпеља (максимално 15 крпеља у пулу) су претходно хомогенизовани у фосфатном сланом пуферу (*PBS*) уз помоћ апарата за разлагање ткива *Tissue Lyser LT (Qiagen, Немачка)*. Прије саме хомогенизације, крпељи су извађени из 96% етанола и осушени на собној температури на једнократном убрбус папиру. Крпељи су стављени у микроепрувете од 2 ml заједно са фосфатним сланим пуфером (*PBS*) у приближном односу 1:1 (однос запремине крпеља и фосфатног сланог пуфера). Крпељи су затим хомогенизовани у *Tissue Lyser* хомогенизатору 2 минуте на 25 Hz уз помоћ металне куглице. После обраде у хомогенизатору, узорци су центрифуговани на 14 000 обраћаја укупно 2 минуте, при чему 200 микролитара супернатанта коришћено за даљу екстракцију.

У процедури екстракције нуклеинске киселине коришћена је следећа опрема:

- водено купатило (Grant, Велика Британија);
- ламинарна комора *IBK 1V1 (ISKRA, Словенија)*;
- ламинарна комора *HeraSafe (Немачка)*
- центрифуга *MiniSpin plus (Eppendorf, Немачка)*;
- центрифуга *5418R (Eppendorf, Немачка)*
- мешалица (*Velp Scientifica, Италија*);
- микропипете (*Eppendorf, Немачка*).

##### **4.2.6.2. Амплификација ДНК и анализа резултата**

У циљу детекције нуклеинске киселине *B. ovis* и групе *Babesia/Theileria* коришћена су два валидирана PCR протокола. Сви узорци су прво анализирани примјеном протокола за идентификацију врсте *B. ovis*, а затим су негативни узорци поријеклом од клинички сумњивих оваца додатно испитани на присуство ДНК протозоа из родова *Babesia/Theileria*. Интерну позитивну контролу за оба PCR протокола представљао је узорак ДНК екстракта пуне крви клинички обољеле овце из епизоотиолошке јединице Гацко (Босна и Херцеговина), претходно потврђен на присуство ДНК *B. ovis* секвенцирањем и депонован у базу података Банке гена (*GenBank*) под бројем MZ853105, док је као негативна контрола коришћена вода за PCR (*Thermo Scientific, САД*). Смјеша реагенаса за извођење PCR припремана је у ламинарној комори *BIOSAN* и *IBK 1V1 (ISKRA, Словенија)* уз употребу микропипета (*Eppendorf, Немачка*), микроепрувета запремине 1,5 ml

(Sarstedt, Немачка) и микроепрувета за PCR запремине 0,2 ml (Greiner Bio-One, Аустрија). Реакције су изведене на апарату Eppendorf Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf, Немачка).

У циљу идентификације врсте *B. ovis* коришћен је пар прајмера (Bbo F 5'-TGG GCA GGA CCT TGG TTC TTCT-3' и Bbo R 5'-CCG CGT AGC GCC GGC TAA ATA-3) за доказивање фрагмента дужине 549 парова база (bp) који је комплементаран секвенци мале субјединице рРНК (18S) *B. ovis* (Aktas и сар., 2005). Коришћени термални протокол за извођење PCR наведен је у Табели 5.

Реакција је извођена у запремини од 25 µl са наведеним компонентама:

- *FastGene Taq 2x Ready Mix* (Nippon Genetics Europe, Немачка) - 12,5 µl;
- *forward* прајмер (Metabion International AG, Немачка) - 1 µl;
- *reverse* прајмер (Metabion International AG, Немачка) - 1µl;
- екстракт нуклеинске киселине - 5 µl и
- вода за PCR (Thermo Scientific, САД) - 5,5 µl.

**Табела 5. Термални протокол за извођење PCR реакције са прајмерима за регион мале субјединице рРНК (18S рРНК) гена врсте *Babesia ovis***

Корак	Температура	Време	Понављање
Иницијална денатурација	95°C	3 мин.	1x
Денатурација	95°C	30 сек.	35x
Хибридизација прајмера	62°C	1 мин.	
Екстензија	72°C	1 мин.	
Финална екстензија	72°C	1 мин.	1x

Уколико је приликом анализе узорака поријеклом од клинички сумњивих оваца примјеном наведеног PCR протокола добијен негативан налаз, коришћен је пар прајмера: ВЈ 5'-GTC TTG TAA TTG GAA TGA TGG-3' и ВN2: 5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3' - за идентификацију протозоа родова *Babesia/Theileria*. Резултат се сматрао позитивним у случају визуелизације PCR продукта у облику траке на нивоу 452 bp (Casati и сар., 2006; Hornok и сар. 2014). Коришћени термални протокол за извођење PCR наведен је у Табели 6. Реакција је извођена у запремини од 25 µl са наведеним компонентама:

- *FastGene Taq 2x Ready Mix* (Nippon Genetics Europe, Немачка) - 12,5 µl;
- *forward* прајмер (Metabion International AG, Немачка) - 1 µl;
- *reverse* прајмер (Metabion International AG, Немачка) - 1 µl;
- екстракт нуклеинске киселине - 5 µl и
- вода за PCR (Thermo Scientific, САД) - 5,5 µl.

**Табела 6. Термални протокол за извођење PCR реакције са прајмерима за детекцију ДНК групе *Babesia/Theileria***

Корак	Температура	Време	Понављање
Иницијална денатурација	94°C	2 мин.	1x
Денатурација	94°C	30 сек.	40x
Хибридизација прајмера	53°C	30 сек.	
Екстензија	72°C	30 сек.	
Финална екстензија	72°C	1 мин.	1x

#### **4.2.6.3. Електрофореза и визуелизација добијених PCR продуката**

Анализа добијених резултата PCR вршена је применом електрофорезе у 1,5% агарозном гелу. Агарозни гел је припреман топљењем агарозе у праху (EURx, Пољска) у радном раствору ТАЕ (Трис-ацетат-ЕДТА) пуфера. Радни раствор ТАЕ пуфера припреман је растварањем 50x концентрованог пуфера (*Thermo Scientific*, САД) у дестилованој води. Након хлађења агарозног гела, у формиране базенчиће у гелу је додавано 3  $\mu$ l ДНК маркера (*Thermo Scientific*, САД) и по 5  $\mu$ l PCR продуката претходно помешаних са флуоресцентном бојом *Midori Green Direct* (*Nippon Genetics Europe*, Немачка) у односу 1:10.

Електрофореза је извршена у апарату *Blue Marine Horizontal Electrophoresis Unit* са стабилизатором напона *Blue Power 500* (*Serva*, Немачка) током 45 минута, под напоном 120 V и при јачини струје 30 mA. Визуелизација PCR продуката извршена је применом трансилуминатора (*Vilber Lourmat*, Француска). Позитивна реакција се испољавала као трака флуоресцентно зелене боје на позицији која је у поређењу са позитивном контролом и референтним фрагментима ДНК маркера одговарала броју парова база траженог PCR продукта.

#### **4.2.6.4 Валидација PCR протокола - репродуктивност**

Репродуктивност, као метода валидације, оба PCR протокола је доказана на одабраним позитивним узорцима. Позитивни узорци добијени у Лабораторији за вирусологију и молекуларну дијагностику ЈУ Ветеринарског института Републике Српске „Др Васо Бутозан“ (Бања Лука) су послати у лабораторију Катедре за микробиологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (Република Србија). На Катедри за микробиологију потврђена је позитивност узорака, након чега су одабрани PCR амплификати послати на секвенцирање.

#### **4.2.7. Секвенцирање и филогенетска анализа**

Одабрани узорци позитивних PCR амплификата код којих је доказан фрагмент који је комплементаран секвенци региона 18S рРНК гена *B. ovis* послати су на услужно секвенцирање у Центар за хуману молекуларну генетику Биолошког факултета Универзитета у Београду (Република Србија).

Филогенетска анализа добијених нуклеотидних секвенци извршена је у биоинформатичком компјутерском програму *MEGA*, верзија 7.0 (енг. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Добијене нуклеотидне секвенце комплементарне региону гена 18S рРНК *B. ovis* су анализирани у оба смера, а затим су применом софтвера *MEGA 7.0* формиране комплетне (консензус) секвенце које су затим даље коришћене за испитивање.

Применом *BLAST* програма (енг. *Basic Local Alignment Search Tool*), испитиване секвенце су упоређиване са аналогним секвенцама доступним у бази података у банци гена (*GenBank*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). За формирање филогенетског стабла коришћене су добијене секвенце комплементарне фрагменту 18S рРНК гена *B. ovis* и одабране компатибилне секвенце из базе података банке гена: *Babesia ovis* isolate Z 3 (MN309738.1), *Babesia ovis* isolate KT39 (KY283960.1), *Babesia ovis* isolate 620 (KJ829366.1), *Babesia ovis* isolate 65 (KU342694.1), *Babesia ovis* isolate goat 2 (DQ287954.1), *Babesia* sp. isolate P34 (MH618772.1), *Babesia ovis* isolate 352 (KU342698.1), *Babesia ovis* isolate 345

(KU342696.1), *Babesia ovis* isolate Meshkinshar (KY581550.1), *Babesia ovis* isolate Urmia1 (KY581551.1), *Babesia ovis* clone Bo124 (MN611762.1), *Babesia ovis* isolate 8kz1 (MN493112.1), *Babesia ovis* isolate SEL38 (MG569902.1), *Babesia ovis* isolate ayn2 (KY867435.1), *Babesia ovis* isolate Urmia2 (KY581552.1), *Babesia ovis* clone Bo123 (MN611761.1), *Babesia ovis* isolate BovisIraq24.1 (KC778787.1), *Babesia ovis* clone Bo782 (MN611759.1), *Babesia bigemina* (KU206297.1), *Babesia bigemina* (EF458191.1), *Babesia motasi* (AY260180.1), *Babesia motasi* (AY533147.1).

Филогенетска анализа извршена је на основу стабла креираног помоћу *Maximum Likelihood* методе са *bootstrap* вредности од 1000 пермутација. Приликом креирања стабла одабрани су следећи параметри: тип супституције - нуклеотид и опција комплетне делеције.

#### **4.2.8. Одређивање обрасца просторне дистрибуције жаришта применом ГИС (*Geographic Information System*) методологије**

За свако испитано стадо оваца узете су координате епизоотиолошког подручја коме су овце припадале. Карте испитаних епизоотиолошких подручја су дизајниране у *QGIS* програму, при чему је урађена и просторно-дистрибутивна анализа жаришта у којима су потврђени клинички случајеви бабезиозе оваца узроковане врстом *B. ovis*. Модел карте је рељефна карта са основном детерминантом надморске висине. Дефинисање природног фокуса болести (ПФБ) је извршено на основу критеријума наведених у раду *Daniel* и сар. (2004). Образац дистрибуције жаришта у епизоотиолошким јединицама Рудо и Гацко је урађен на основу препорука *Zeman* и сар. (1990).

#### **4.2.9. Статистичка обрада података и економетријске анализе**

Статистичка обрада добијених резултата извршена је применом дескриптивних статистичких показатеља, као и параметријских (Студентов *t*-тест) и непараметријских тестова (*chi-kvadrat* и Фишеров тест). Статистичка анализа изведеног експеримента урађена је у статистичком пакету *GraphPad Prism* верзија 6.00 за *Windows*, (*GraphPad Software, San Diego, California, USA*) [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) и *MS Excel*-у.

У циљу економетријске анализе формиран је модел „*cost-benefit*“ при чему је извршена компарација трошкова услед појаве малигне бабезиозе оваца и трошкова оптималних превентивних мјера, односно апликација акарицидних средстава овцама у сезони појаве крпеља.



## 5. РЕЗУЛТАТИ

Резултати добијени у испитивању груписани су у шест цјелина: 1) резултати епизоотиолошког испитивања; 2) резултати клиничког испитивања бабезиозе оваца; 3) резултати паразитолошког испитивања; 4) резултати молекуларног испитивања; 5) резултати геоинформатичке анализе и 6) резултати економетријске „*cost-benefit*“ анализе.

### 5.1. Резултати епизоотиолошког испитивања

#### 5.1.1. Епизоотиолошки подаци добијени од надлежне ветеринарске службе

**Епизоотиолошка јединица Рудо.** Према подацима који су добијени од ветеринарске службе из Рудог, обољење које по клиничкој слици, директним и индиректним штетама одговара бабезиози оваца присутно је на ужем подручју општине Рудо, посебно у селима: Ресићи, Николићи, Пребидоли, Гојава, Цикоте, Омарине, Трнавци и Микавица. Болест је на терену стационарна, експлозивног и сезонског карактера. За Рудо је типично уситњено, екстензивно овчарство, у коме се овце држе искључиво за личне потребе. Овце се јагње у периоду јануар-март, а мањи број у јесен. На терену епизоотиолошке јединице Рудо не постоји активна контрола кретања оваца, које се напасају на пашњацима и ливадима, гдје постоји могућност контакта између стада. Подручје Руда није дистрикт антракса, а ветеринари у циљу сузбијања крпеља и других ектопаразита препоручују апликацију ивермектина.

**Епизоотиолошка јединица Чајниче.** Према подацима који су добијени од ветеринарске службе из Чајниче, обољење које одговара бабезиози оваца није карактеристично за ово подручје, мада су могућа спорадична фебрилна стања. Ово подручје није дистрикт антракса и за њега је типично екстензивно, пашно овчарство. Слично епизоотиолошкој јединици Рудо, у јединици Чајниче не постоји ефикасан систем контроле кретања оваца. Овце се јагње до марта. За сузбијање вектора се препоручују акарициди за купање оваца и апликација ивермектина.

**Епизоотиолошка јединица Рогатица.** Ветеринарској служби Рогатице бабезиоза оваца није била позната до 2020. године, када се појавио ванредни случај сумње на болест у Жепи. Према анамнези, овце су биле купљене у Рудом. Ово подручје располаже великим бројем оваца, које се доминантно узгајају на планинском појасу према планини Романији. Држање је екстензивно, пашно. Интензиван период јагњења је током фебруара и марта. Не постоји ефикасан систем контроле кретања оваца. Рогатица није дистрикт антракса, а према изјави ветеринара, за сузбијање ектопаразита се користе ивермектин (парентерално), амитраз (за купање) и делтаметрин („*pour on*“).

**Епизоотиолошка јединица Гацко.** Од свих епизоотиолошких јединица на подручју Херцеговине, у јединици Гацко налази се највећи број оваца и најразвијеније је овчарство. За овај крај типично је планинско-крашко и пашно овчарство. Крашко, јер се овце у прољеће пуштају на пашњак гатачког поља, гдје нема контроле кретања оваца. Поједина стада се изгоне на „катуне“, планинске пашњаке динарских планина Лебршника, Волујака и Зеленгоре. Пошто је ријеч о планинској висоравни, у Гацко се често допремају овце на испашу из других дијелова Херцеговине. Према изјави надлежног ветеринара, обољење које одговара бабезиози се спорадично јавља на цијелој епизоотиолошкој јединици,

али се чешће јавља у планинским пограничним селима епизоотиолошке јединице (према Црној Гори). Овце се јагње интензивно у периоду фебруара и марта. Поједина јужна села у Гацку су проглашена дистриктом антракса. Опште сузбијање вектора у овој епизоотиолошкој јединици се спроводи углавном купањем оваца препаратима на бази диазинона.

**Епизоотиолошка јединица Билећа.** Према извештајима ветеринарске службе, бабезиоза оваца је стационарна на цијелом подручју епизоотиолошке јединице Билећа. Јавља се сезонски и спорадично у одређеним стадима. Овце се за вријеме прољећа и лета изгоне из Билеће на планинске пашњаке Зеленгоре, Морина и Гацка. Производња је екстензивна и пашна. Поједина подручја епизоотиолошке јединице су проглашена дистриктом антракса. Овце се јагње око марта мјесеца. За сузбијање вектора се препоручују средства за купање оваца на бази диазинона.

**Епизоотиолошка јединица Невесиње.** Према изјави надлежног ветеринара у Невесињу, обољење које по карактеристикама одговара бабезиози, јавља се сезонски и спорадично. Последњи пут пироплазмоза је утврђена 2017. године, када је болест лабораторијски доказана у Хрватском ветеринарском институту у Загребу. Том приликом је угинуло 30 оваца у селу Раст, а обољеле овце су биле допремљене из јужне Херцеговине, односно општине Берковића. На пашњаке Невесиња овце се често допремају из Берковића, Љубиња и Билеће. Овце се јагње до марта. Производња је екстензивна без контроле кретања. На овом подручју нису познати, нити успостављени дистрикти антракса. Препоручена је употреба ивермектина и диазинона у сузбијању вектора, од стране надлежне ветеринарске службе.

**Епизоотиолошка јединица Љубиње.** Љубиње је једна од мањих јединица епизоотиолошког подручја Херцеговине. Према изјави ветеринара, болест се јавља спорадично, а велики број оваца са овог подручја се током лета шаље на планинску испашу Зеленгоре, Морина и на пашњаке општине Невесиње. Ово указује да није успостављена контрола кретања оваца. Ова епизоотиолошка јединица нема развијено овчарство. Овце се држе углавном за личне потребе, а углавном се јагње у јануару, фебруару и марту. Могућа су јагњења у јесен када се овце „зајуже“ са планинских пашњака. На овом подручју нису успостављени дистрикти антракса. За сузбијање вектора се препоручују средства за купање, на бази диазинона.

**Епизоотиолошка јединица Требиње.** Према изјави ветеринара, болест која по карактеристикама одговара пироплазмози се појављује од јуна мјесеца на подручју цијеле општине и нису регистрована већа жаришта. Обољење се јавља у селима око урбаног дијела града Требиња. За ово подручје није типично сточарство, овце се углавном држе у мањим стадима за личне потребе, не шаљу се на планинску испашу и јагње се углавном у марту и априлу (мањи број у јесен). Подручје Требиња није дистрикт антракса. За сузбијање вектора препоручује се прољећна апликација ивермектина и купање оваца органофосфатним средствима.

#### **5.1.2. Епизоотиолошки подаци на нивоу стада оваца добијени од узгајивача**

**Клиничка сумња на бабезиозу.** У периоду од јула 2019. до августа 2021. године укупно су прегледана 53 стада на подручју Подриња и Херцеговине. Клиничка сумња на бабезиозу за вријеме клиничког прегледа је постављена код 69,81% (37/53) испитаних стада оваца. Највећи број стада са тренутном

клиничком сумњом (*status praesens*) на бабезиозу оваца је утврђен у Рудом – 78,78% (26/33). У Гацком је клиничка сумња постављена код 71,43% (5/7) испитаних стада током 2020. и 2021. године. Током 2020. године у Билећи је клиничка сумња постављена у 66,66% (2/3) испитаних стада, а у Рогатици код 33,33% (1/3) испитаних стада (једно стадо у Жепи). Током 2021. године, у испитивање су укључена и стада оваца из Требиња, тако да је клиничка сумња постојала код сва три испитана стада - 100% (3/3). У Рудом је евидентирано понављање клиничке сумње на болест у четири иста стада, кроз сезоне у периоду 2019-2021. године (Табела 7).

**Крпељи.** Од укупно 53 стада која су укључена у ово испитивање, крпељи су евидентирани у 18 (33,9%), при чему је број инфицираних стада оваца био у Рудом – 28,95% (11/33). У Гацком крпељи су евидентирани у 28,57% (2/7) испитаних стада, у Билећи код 100% (3/3), у Рогатици код 33,33% (1/3), у Требињу такође код 33,33% (1/3), као и у једном стаду из Чајничка, које је укључено у испитивање. У стадима оваца из епизоотиолошких јединица Љубиње и Невесиње, нису нађени крпељи.

**Табела 7. Број стада са клиничком сумњом на бабезиозу оваца**

Епизоотиолошка јединица	Број прегледаних стада	Стада са клиничком сумњом	
		Број	%
Рудо	33	26	78,78
Гацко	7	5	71,43
Билећа	3	2	66,66
Рогатица	3	1	33,33
Требиње	3	3	100
Невесиње	2	0	-
Чајничка	1	0	-
Љубиње	1	0	-
<b>УКУПНО</b>	<b>53</b>	<b>37</b>	<b>69,81</b>

Од укупно 53 власника испитиваних стада оваца, са бабезиозом оваца је од раније било упознато 49 (92,45%) узгајивача у Рудом, Гацком, Невесињу, Љубињу и Требињу. Четири узгајивача (7,55%) стада оваца из Чајничка и Рогатице никада раније нису чула за ово обољење, нити су се сусрели с њим.

**Анамнестички подаци о ранијим угинућима.** За вријеме теренске посјете испитиваним стадима оваца узета је основна анамнеза о ранијим угинућима оваца, које су током живота показивале клиничку слику, која би могла одговарати клиничкој бабезиози. Угинућа су евидентирана код 20% (11/53) испитиваних стада, која су се налазила у епизоотиолошким јединицама Рудо, Рогатица и Требиње. Највећи број евидентираних угинућа је забиљежен у Рудом - код 27,27% (9/33) испитаних стада, док су у Требињу и Рогатици евидентирана угинућа у по једном стаду од испитана три – 33,33% (1/3).

**Анамнестички подаци о спровођењу акарицидног третмана.** Од сточара је узет и анамнестички податак везан за праксу спровођења акарицидног третмана у стадима оваца. Од укупног броја прегледаних стада, код 35,85% (19/53) стада је редовно спровођен прољећни акарицидни третман оваца. Власници шест стада (11,32%) нису дали информацију о редовности спровођења акарицидног третмана, док код 52,83% (28/53) стада нису спроведене редовне

антипаразитске мјере у циљу сузбијања инфестације крпељима. Ветеринарска служба у Рудом прије сезоне крпеља спроводи активни третман искључиво инјекционом апликацијом ивермектина, док су у Херцеговини, власници углавном користили раствор диазинона за сузбијање ових ектопаразита. Само у једном стаду је апликована комбинација инјекционог ивермектина и диазинона.

**Број оваца са јагњадима.** Број оваца са јагњадима је значајно варирао међу стадима испитиваних епизоотиолошких јединица и подручја. У Рудом, просјечан број оваца по испитиваном стаду је био 19 (мин. 5; макс. 50). У Гацком је регистрован значајно већи број оваца по испитиваном стаду, услед чега је просјечан број оваца износио 331 (мин. 37; макс. 800). У Рогатици просјечан број оваца по стаду је био 68 (мин. 40; макс. 100), у Билећи 114 (мин. 30; макс. 250), док је у Требињу просјек броја оваца у три испитијућа стада био 52 (мин. 20; макс. 75). У два испитивана стада у Невесињу 2021. године, просјечан број оваца по стаду је био 200 (мин: 100; макс: 300). У Љубињу једно испитивано стадо је бројило 187 оваца, док је стадо у Чајничу за вријеме теренског испитивања и посјете имало 130 оваца са јагњадима. Сва испитивана стада су припадала истом власнику, осим два стада из Херцеговине (једно у Гацком и једно у Невесињу). Власници ових стада су услужно чували овце, што је имало за посљедицу мјешање њихових оваца са овцама других власника.

**Циљеви производње.** Што се тиче циљева производње, овце из 53 испитивана стада су узгајане искључиво за производњу меса.

**Надморска висина.** Највећи број стада (69,81% - 37/53) за вријеме теренског испитивања био је стационаран на 400-800m надморске висине (подручје епизоотиолошких јединица Рудо, Чајниче, Билећа и Љубиње), док је најмање стада (3,77% - 2/53) испитано на надморскј висини преко 1200m (подручје епизоотиолошких јединица Рогатица и Гацко) (Табела 8).

**Табела 8. Број испитаних стада по надморској висини**

Надморска висина	Број испитаних стада оваца	Епизоотиолошка јединица/јединице
≤ 400	6	Рудо, Требиње
400-800	37	Рудо, Чајниче, Билећа, Љубиње
800-1200	8	Гацко, Невесиње
≥ 1200	2	Рогатица, Гацко

## 5.2. Резултати клиничког испитивања бабезиозе оваца

Током теренског испитивања спроведеног у периоду од 2019. до 2021. године прегледане су 192 овце из 53 стада. Клиничка сумња на акутну бабезиозу постављена је код 35,97% (71/192) оваца и на хроничну бабезиозу код 2,61% (5/192) оваца. Посматрано на нивоу стада, сумња је постављена у 69,81% (37/53) стада обухваћених истраживањем. Сумња на акутну клиничку бабезиозу је постављена у епизоотиолошким јединицама Рудо, Рогатица, Гацко и Требиње, док је сумња на хроничну бабезиозу оваца постављена у Рудом и Билећи. Паразитолошким и молекуларним прегледима, од 76 клинички сумњивих оваца, *B. ovis* је установљена код 57 оваца, док су пироплазме потврђене код 75 оваца (описано детаљно у резултатима паразитолошког и молекуларног испитивања).

Сви клинички евидентирани и PCR потврђени случајеви присуства врсте *B. ovis* су имали клиничку слику типичну за акутну бабезиозу. Клиничка сумња на хроничну бабезиозу није потврђена, што значи да *B. ovis* није дијагностикована у тим случајевима.

Групним прегледом животиња установљено је да се овце издвајају из стада, леже и не пасу. Ако су се налазиле у тору, примјетно је било држање главе ниско до земље и испољавање симптома респираторног дистреса (диспнеја са абдоминалним дисањем и дахтањем). Нека грла нису могла ујутро, пред испашу, да напусте тор. Акутна бабезиоза је започињала са клиничком сликом неспецифичног инфективног синдрома: општа депресија, анорексија и грозница. У даљем току болести били су примјетни специфичнији знаци болести: анемија на видљивим слузницама, иктерус и хемоглобинурија. У појединим случајевима није било могуће прегледати урин. Око ануса и перианалне регије оваца био је примјетан изражен иктерус. Евидентирани локомоторни проблеми (тешко устајање, нестабилност на екстремитетима) су највјероватније били посљедица опште исцрпљености (Табела 9).

Свим обољелим грлима је апликован имидокарб дипропионат у дози 1,2 mg/kg са антибиотиком (окситетрациклин и/или комбинација пеницилина и дихидрострептомицина) и метамизол - натријум. Неповољан клинички исход праћен угинућем утврђен је код 12,28% (7/57) случајева из шест стада. Грла су углавном угињавала након 24 часа од обављеног клиничког прегледа и примењене терапије.

**Табела 9. Клиничка презентација потврђених случајева бабезиозе оваца**

Клинички параметар	Фреквенција	
	број	%
Општа слабост - депресија	57	100
Респираторни дистрес - диспнеја	57	100
Анорексија	57	100
Фебра ( $\geq 42^{\circ}\text{C}$ )	21	36
Фебра (41-42 $^{\circ}\text{C}$ )	35	61
Фебра (40-41 $^{\circ}\text{C}$ )	1	2
Анемија	12	21
Иктерус	9	16
Хематохезија	8	14
Хемоглобинурија	4	7
Локомоторна дисфункција	3	5
Агалакција	2	3
Хиперхидроза	1	2

Сва евидентирана угинућа су била у епизоотиолошкој јединици Рудо и то у сезонама 2020-2021. године. Што се тиче старости и пола животиња, угинућа су евидентирана код два шиљежета (6 и 7 мјесеци старости), два приплодна овна старости 1-2 године, као и три овце (1-5 година старости). Један угинули ован је претходно купљен у другом селу и уведен у инфицирано стадо. Од укупно седам евидентираних угинућа, пет угинулих оваца је било пореклом са уже локације Пребидоли, гдје је евидентирано највише клиничких случајева у епизоотиолошкој јединици Рудо. Код једне угинуле овце је извршена обдукција при чему су евидентирани тешки и узнатредовали знаци бабезиозе: иктерус на свим видљим слузницама, мокраћна бешика испуњена урином опалесцирајуће зелене боје, сукрвичав ексудат у трбушној шупљини, тешка дуфузна крварења у цријевима (Слика 1), тачкаста крварења на видљим слузницама, хепатитис са некрозама и крварењима, гломерулонефритис и некротична жаришта са крварењима у слезини.



**Слика 1. Дифузни крвни подливи у цријевима и иктерус на мезентеријуму угинуле овце са PCR потврђеном врстом *Babesia ovis***

Компарацијом клиничких параметара, утврђено је да су овце позитивне на *Babesia/Theileria* на алтернативном PCR протоколу имале нижу тјелесну температуру, без присуства хемоглобинурије, у односу на овце које су биле PCR - *B. ovis* позитивне. Нису забиљежена угинућа након терапије, а болест је пролазила хроничним током (Табела 10).

Поређењем клиничких параметара код потврђених случајева бабезиозе између два испитивана географска региона, утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у погледу телесне температуре, хемоглобинурије и клиничког исхода код оваца у Горњем Подрињу, у односу на овце из Херцеговине код којих су били заступљенији анемија и иктерус. Леталитет код оваца у Подрињу је био 20% (7/35), а болест је пролазила брже, уз појаву мањег броја специфичних знакова (Табела 11).

**Табела 10. Компарација оваца PCR позитивних на *Babesia ovis* и PCR позитивних на друге пироплазме**

Параметар	PCR позитивност ( <i>Babesia/Theileria</i> ) N=18	PCR позитивност ( <i>Babesia ovis</i> ) N=57	Статистичка значајност
Средња вриједност тјелесне температуре	41,07*	41,64*	p<0,05*
Специфични знаци бабезиозе			
Анемија	5	12	p=0,412
Иктерус	2	9	
Хемоглобинурија	0	4	
Клинички исход			
Повољан	18	50	p=0,1858
Неповољан	0	7	
Присутан хронични ток болести	Да	Не	

\* на основу Студентовог т-теста

**Табела 11. Компарација основних параметара потврђених клиничких случајева између два испитивана географска региона**

Параметар	Потврђени клинички случајеви у Подрињу N=35	Потврђени клинички случајеви у Херцеговини N=22	Статистичка значајност
Средња вриједност тјелесне температуре	41,78	41,47	p<0,05*
Специфични знаци бабезиозе			
Анемија	3	9	p<0,05**
Иктерус	0	9	
Хемоглобинурија	4	0	
Клинички исход			
Повољан	28	22	p<0,05*
Неповољан	7	0	

\* на основу Студентовог т-теста; \*\* Фишеров тест - групе оваца са анемијом и иктерусом у односу на хемоглобинурију;



### 5.3. Резултати паразитолошког испитивања

#### 5.3.1. Резултати микроскопског прегледа крви клинички сумњивих оваца

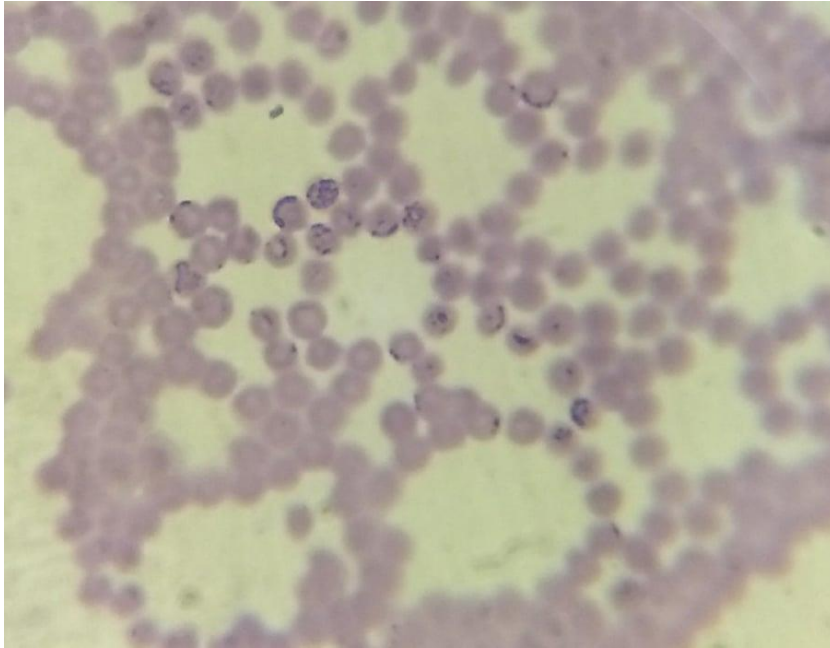
У оквиру паразитолошких испитивања извршен је микроскопски преглед танких размаза венске крви од 74 овце клинички сумњиве на бабезиозу. Морфолошким анализом присутних форми у еритроцитима крвних размаза, установљени су полиморфни развојни облици пироплазми различите величине, при чему није било могуће увијек поставити дијагнозу до нивоа врсте. Зато је позитиван налаз утврђен након микроскопског прегледа крвног размаза, евидентиран као налаз пироплазми (*Babesia/Theileria*).

Пироплазме (*Babesia/Theileria*) су установљене у 86,48% (64/74) узорака, док су крвни размази од 13,52% (10/74) оваца проглашени негативним. Микроскопским прегледом оваца сумњивих на хроничну бабезиозу, пироплазме су установљене у 60% (3/5) случајева. Код оваца сумњивих на акутну бабезиозу, пироплазме су дијагностиковане у 88,41% (61/69) узорака (Табела 12).

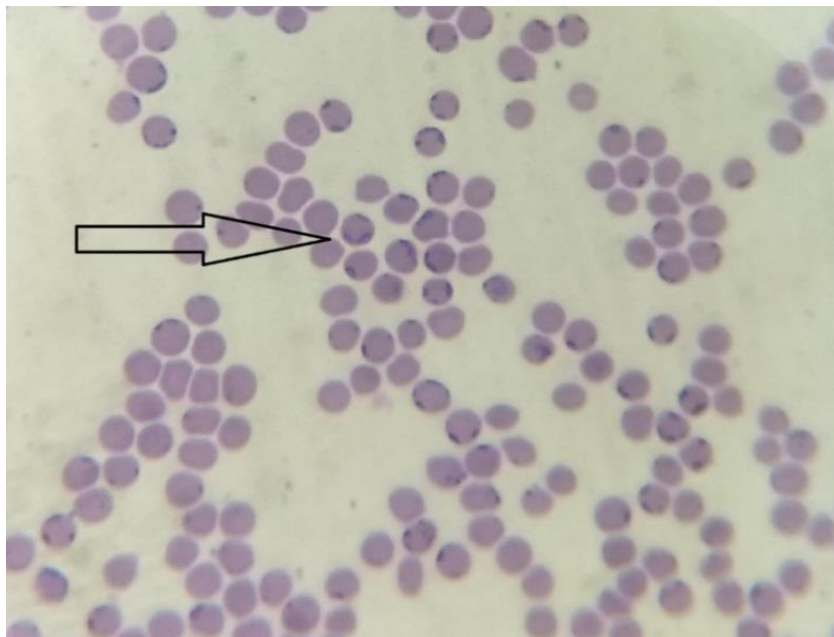
Табела 12. Резултати микроскопског прегледа код клинички сумњивих оваца

Клинички ток	Број оваца	Позитивно	Негативно	Статистичка значајност
Акутна бабезиоза	69	61	8	p= 0,1323
Хронична бабезиоза	5	3	2	
Укупно	74	64	10	

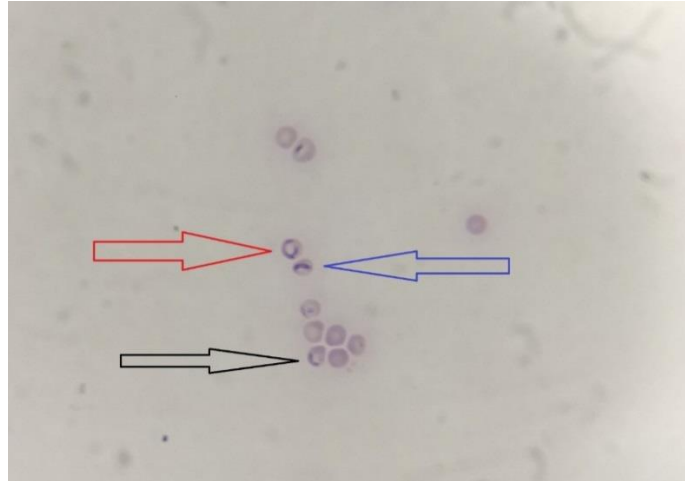
У еритроцитима су утврђени појединачни округли, прстенасти, „анаплазмодни“ и овални облици. Развојни облици пироплазми су установљени углавном на периферији еритроцита, а регистровани су и случајеви субсферичне локализације мерозоиота (Слика 2). На појединим размазима су утврђени изразито дуги мерозоити, у пару положени на периферији еритроцита. Ови облици су дијагностиковани заједно са појединачним облицима пироплазми. Запажени су и ситни мултипли облици у еритроциту (Слика 3). Установљени су и типични крушколики облици смјештени на периферији еритроцита, са тупим углом између два мерозоиота (Слике 4 и 5). Овакви налази су били карактеристични за врсту *B. ovis*, али као што је наведено, дијагнозу није било увијек могуће поставити до нивоа врсте.



**Слика 2. Микроскопски налаз различитих облика пироплазми у крвном размазу овце (бојење по Гимзи)**



**Слика 3. Дуги ситни мерозоити пироплазми на периферији еритроцита**

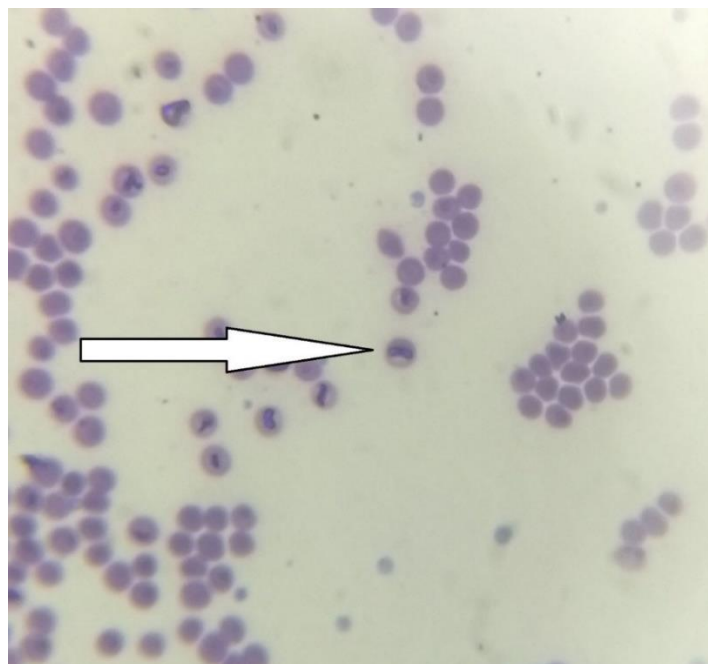


**Слика 4. Прстенасти облик врсте *Babesia ovis* (црвена стрелица), dupla круškoлика форма локализована субсферично (плава стрелица) и периферно (црна стрелица) у еритроциту**



**Слика 5. Типични круškoлики мерозоит врсте *Babesia ovis***

У два случаја клиничке сумње на бабезиозу у Рудом, установљени су крупни облици пироплазми које морфолошки одговарају роду *Babesia* (Слика 6). Дупли, круškoлики до сферични мерозоити су били постављени централно у еритроциту.



Слика 6. Крупни облик пироплазми рода *Babesia*

Резултати микроскопског прегледа по епизоотиолошким јединицама су приказани у Табели 13, а резултати микроскопског прегледа по стадима оваца у Табели 14.

Табела 13. Резултати микроскопског прегледа по епизоотиолошким јединицама

Епизоотиолошка јединица	Прегледане овце			Статистичка значајност
	Број	Позитивно	Негативно	
Рудо	44	40	4	p= 0,3821
Рогатица	2	1	1	
Гацко	18	15	3	
Билећа	3	2	1	
Требиње	7	6	1	
Укупно	74	64	10	

Табела 14. Резултати микроскопског прегледа по стадима оваца

Епизоотиолошка јединица	Прегледана стада оваца			Статистичка значајност
	Број	Позитивно	Негативно	
Рудо	25	23	2	p= 0,2132
Рогатица	1	1	0	
Гацко	5	5	0	
Билећа	2	2	0	
Требиње	3	2	1	
Укупно	36	33	3	

Без обзира на резултате микроскопског преглед крви, сви клинички случајеви укључени у ово испитивање су подвргнути молекуларном (PCR) испитивању, у циљу детекције секвенце гена врсте *B. ovis*. У случају негативног налаза на PCR испитивању, урађен је алтернативни PCR протокол у циљу детекције пироплазми (*Babesia/Theileria*).

### 5.3.2. Резултати морфолошке идентификације и детерминације крпеља

Од 109 адултних облика крпеља (Слика 7А), који су узорковани са оваца из одабраних епизоотиолошких јединица Рогатица (1 стадо), Рудо (10 стада) и Билећа (2 стада) утврђена је само врста *Rhipicephalus bursa*. Морфолошки су детерминисана 53 мужјака (Слика 7Б) и 56 женки (Слика 8). Од 13 стада у којима су сакупљени крпељи са оваца, клиничка сумња на бабезиозу је постављена у четири стада (30,76%). Најчешћа утврђена локализација крпеља на тијелу оваца је био реп (Слика 7А). Од 109 адулта крпеља, 55 крпеља је одвојено за молекуларну анализу.



Слика 7. А) Адулти крпеља на репу оваца; Б) Мужјак врсте *Rhipicephalus bursa*



Слика 8. Женка врсте *Rhipicephalus bursa*

Морфолошки специфичне карактеристике мужјака и женки крпеља врсте *R. bursa*, на основу којих је извршена детерминација до нивоа врсте су: величина

тијела (дужина женке је до 4,5 mm, а мужјака до 4,2 mm), кратак роstrум, смеђа до црвенкаста боја тијела, хексагонална база капитулума, присуство и распоред фестона, присуство конвексних очију, густа пунктација дорзалног штита, наставак на коксама првог пара екстремитета који је уочљив гледано са дорзалне стране, један пар широких аданалних штитића код мужјака, присуство аналне бразде иза аналног отвора, одсуство прстенова на екстремитетима, присуство густих сета око спиракула и латерални и постериорни жљебови који су видљиви са дорзалне стране.

Мужјаци су значајно ситнији од женки. На дорзалном штиту мужјака цервикална поља нису уочљива, док су очи конвексне, а конскутум је таман. Латерални угао базе капитулума је оштар. Палпе су кратке. Видљиви су вентрални штитићи, док се спиракуларне плоче налазе испод четвртог пара екстремитета. Акцесорни аданални штитићи су мали, слабо уочљиви, док су аданални штитићи широки и повијени. Фестони су развијени и боље уочљиви него код женки.

Типичне морфолошке карактеристике женки су: шестоугаона база капитулума са оштрим латералним углом, кратке палпе са неразвијеним чланцима, док су *area porosa* уска. Скутум је тамније боје и јасно маргинализован од остатка тијела. Скапуларни жљоб је плитак. Генитални отвор има типичан облик латиничног слова „V“. Код женки не постоје вентрални штитићи, као и код осталих иксодидних крпеља.

### **5.3.3. Поређење дистрибуције вектора са сезоном испитивања и метеоролошким подацима**

За епизоотиолошке јединице у којима је постојала клиничка сумња на акутну и хроничну бабезиозу оваца, извршена је анализа метеоролошких података у периоду од 2019. до 2021. године. Поред тога, анализирано је вријеме (мјесец) сакупљања вектора у подручју испитивања да би се могла направити повезница појаве крпеља са метеоролошким приликама.

#### **5.3.3.1. Метеоролошки подаци у 2019. години**

**Епизоотиолошка јединица Рудо.** Метеоролошки подаци у 2019. години су узети само за епизоотиолошку јединицу Рудо и за мјесец јул, када су описани први случајеви клиничке бабезиозе. Прикупљени су подаци за средњу дневну температуру, дневну количину падавина и релативну влажност ваздуха. Средња дневна температура за мјесец јул у Рудом је износила 21,13°C (макс. 25,8°C; мин. 14,2°C). Просјечна влажност ваздуха је била 69,6% (макс. 94%; мин. 56%). Падавине су регистроване током 11 дана у мјесецу јулу, а просјечна количина акумулираних дневних падавина је износила 4,54 l/m<sup>2</sup> (0,1 l/m<sup>2</sup>; 31 l/m<sup>2</sup>).

#### **5.3.3.2. Метеоролошки подаци у 2020. години**

**Епизоотиолошка јединица Рудо.** Средња дневна температура у Рудом за мај 2020. године је била 14,9°C (макс: 23,3°C; мин. 8,6°C). Регистрована дневна температура је била испод 10°C током једног дана мјесеца маја. Просјечна влажност ваздуха је била 66% (мин. 31% - макс. 94%). Просјечна количина дневних падавина за мјесец мај је износила 1,81 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>; макс. 8,6 l/m<sup>2</sup>) и регистроване су током 16 дана мјесеца маја.

Средња дневна температура за мјесец јун 2020. године је износила 18,6<sup>0</sup>С (макс. 24,6<sup>0</sup>С; мин. 12,7<sup>0</sup>С), док је просјечна влажност ваздуха била 73% (макс. 96%; мин. 49%). Количина акумулираних дневних падавина за јун је износила у просјеку 4,02 l/m<sup>2</sup> (мин: 0,1 l/m<sup>2</sup>; макс: 43,2 l/m<sup>2</sup>) и оне су детектоване током 19 дана мјесеца.

Средња температура ваздуха за мјесец јул 2020. године у Рудом је била 21,1<sup>0</sup>С (макс. 26,2<sup>0</sup>С; мин. 15,7<sup>0</sup>С), просјечна влажност ваздуха је износила 66,4% (макс. 85%; мин. 55%), а падавине су регистроване током осам дана овог мјесеца (просјек: 1,73 l/m<sup>2</sup>; макс. 13,5 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,1 l/m<sup>2</sup>).

**Епизоотиолошка јединица Рогатица.** Средња дневна температура за мај 2020. године у Рогатици је била 13,2<sup>0</sup>С (мин: 7,29<sup>0</sup>С; макс: 21,4<sup>0</sup>С), а температура испод 10<sup>0</sup>С је регистрована током четири дана овог месеца. Просјечна влажност ваздуха износила 71% (мин. 46,9%; макс. 88%), просјечна количина дневних акумулираних падавина 1,74 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,01 l/m<sup>2</sup>; макс. 11,17 l/m<sup>2</sup>), а падавине су регистроване током 19 дана овог мјесеца.

Средња дневна температура ваздуха за мјесец јун 2020. године је била 16,96<sup>0</sup>С (макс. 22,1<sup>0</sup>С; мин.10,3<sup>0</sup>С), просјечна влажност ваздуха 77% (мин. 60,5%; макс. 94,4%), а просјечна количина акумулираних падавина 4,07 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,17 l/m<sup>2</sup>; макс. 36,27 l/m<sup>2</sup>). Средња дневна температура ваздуха за мјесец јул 2021. године је била 18,77<sup>0</sup>С (мин. 14,2<sup>0</sup>С; макс. 24,03<sup>0</sup>С), док је влажност ваздуха у јулу 2020 године била 75% (мин: 64%; макс: 89%). Просјечна количина акумулираних дневних падавина је износила 2,31 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,39 l/m<sup>2</sup>; макс. 18,65 l/m<sup>2</sup>).

**Епизоотиолошка јединица Гацко.** Просјечна дневна температура ваздуха за мај у Гацком је била 12,31<sup>0</sup>С (мин. 5,8<sup>0</sup>С; макс. 18,9<sup>0</sup>С), са осам дана када је дневна температура била испод 10<sup>0</sup>С. Подаци о влажности ваздуха нису били доступни за ову епизоотиолошку јединицу. Просјечна количина дневних падавина је била 3,88 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>; макс. 12,4 l/m<sup>2</sup>), а падавине су забиљежене током 12 дана у мјесецу.

Просјечна дневна температура за јун 2020. године је у Гацком била 15,33<sup>0</sup>С (мин. 9,7<sup>0</sup>; макс. 21,1<sup>0</sup>С), а само једног дана је регистрована температура испод 10<sup>0</sup>С. Подаци о влажности ваздуха нису били доступни, просјечна количина акумулираних падавина је износила 7,03 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>; макс. 27,2 l/m<sup>2</sup>) и оне су детектоване током 15 дана у мјесецу.

Просјечна дневна температура ваздуха у мјесецу јулу 2020. године је била 18,8<sup>0</sup>С (мин. 13,2<sup>0</sup>С; макс. 23,5<sup>0</sup>С). Влажност ваздуха није била доступна, просјечна количина падавина је износила 2,62 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>; макс. 6,2 l/m<sup>2</sup>) и оне су утврђене током пет дана у мјесецу.

**Епизоотиолошка јединица Билећа.** Просјечна дневна температура за мјесец мај 2020. године у Билећи је износила 16,0<sup>0</sup>С (мин. 9<sup>0</sup>С; макс. 22,4<sup>0</sup>С), а температура испод 10<sup>0</sup>С је регистрована током једног дана. Просјечна влажност ваздуха је била 59% (мин. 39%; макс. 86%), средња количина акумулираних падавина 1,39 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>; макс. 15,2 l/m<sup>2</sup>) и оне су утврђене током осам дана у мјесецу.

Просјечна температура у јуну је била 19,03<sup>0</sup>С (мин: 14,2<sup>0</sup>С; макс: 25,5<sup>0</sup>С), док је влажност ваздуха износила 68% (мин. 51%; макс. 88%). Средња количина падавина је била 2,74 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,1 l/m<sup>2</sup>, макс. 25,3 l/m<sup>2</sup>) и оне су утврђене током 15 дана у мјесецу.

У току јула 2020. године, у Билећи је регистрована просјечна температура ваздуха 23,5<sup>0</sup>С (мин. 17,5<sup>0</sup>С; макс. 28,6<sup>0</sup>С), просјечна влажност ваздуха 54% (мин.

42%; макс. 77%), а просјечна количина акумулираних дневних падавина од 0,19 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,1 l/m<sup>2</sup>; макс: 4 l/m<sup>2</sup>). Падавине су детектоване током четири дана у мјесецу.

### **5.3.3.3. Метеоролошки подаци у 2021. години**

**Епизоотиолошка јединица Рудо.** Просјечна дневна температура ваздуха у мјесецу мају је била 16,03<sup>0</sup>С (макс. 22,9<sup>0</sup>С; мин. 10,5<sup>0</sup>С), средња вриједност релативне влажности ваздуха 61% (макс. 84%; мин. 43%), а просјечна количина дневних акумулираних падавина 1,32 l/m<sup>2</sup> (макс. 17,7 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,1 l/m<sup>2</sup>). Падавине су регистроване током 13 дана у мјесецу.

У јуну мјесецу забиљежена је средња температура ваздуха од 19,95<sup>0</sup>С (макс. 26,2<sup>0</sup>С; мин. 12,1<sup>0</sup>С) и релативна влажност ваздуха 63% (макс. 91%; мин. 38%). Просјек дневних количина падавина је износио 1,38 l/m<sup>2</sup> (макс. 12,8 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,01 l/m<sup>2</sup>), при чему су активности падавина утврђене током 11 дана јуна.

У јулу мјесецу је биљежена средња температура ваздуха од 22,5<sup>0</sup>С (макс. 26,7<sup>0</sup>С; мин: 17,8 <sup>0</sup>С), док је релативна влажност ваздуха била 62% (макс. 93%; мин. 44%). Просјечна количина акумулираних дневних падавина је била 2,62 l/m<sup>2</sup> (макс. 44,9 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,01 l/m<sup>2</sup>) и оне су утврђене током 15 дана јула.

**Епизоотиолошка јединица Гацко.** Током маја у Гацком је утврђена средња температура ваздуха од 12,7<sup>0</sup>С (макс. 19,7 <sup>0</sup>С; мин. 9,1<sup>0</sup>С), при чему је утврђена температура испод 10<sup>0</sup>С током пет дана. Релативна влажност ваздуха није била доступна за ову епизоотиолошку јединицу. Просјечна количина акумулираних дневних падавина је била 1,6 l/m<sup>2</sup> (макс. 20,6 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,1 l/m<sup>2</sup>) и оне су биле регистроване током девет дана у мају.

У јуну је била регистрована средња температура ваздуха од 18,4<sup>0</sup>С (макс. 25<sup>0</sup>С; мин. 9,9<sup>0</sup>С), док релативна влажност ваздуха није била доступна. Просјечна количина падавина је износила 0,8 l/m<sup>2</sup> (макс.: 15,8 l/m<sup>2</sup>; мин. 1,2 l/m<sup>2</sup>).

У јулу, средња температура ваздуха је износила 21,2<sup>0</sup>С (макс. 24,8<sup>0</sup>С; мин. 17,3<sup>0</sup>С). Подаци за релативну влажност нису били доступни, док је просјечна количина дневних падавина износила 0,5 l/m<sup>2</sup> (макс. 9,8 l/m<sup>2</sup>; мин. 0,2 l/m<sup>2</sup>). Падавине су установљене током шест дана јула.

**Епизоотиолошка јединица Требиње.** За вријеме мјесеца маја у Требињу је установљена средња дневна температура ваздуха од 17<sup>0</sup>С (макс. 23,6<sup>0</sup>С мин. 13,2 <sup>0</sup>С) са релативном влажношћу ваздуха од 64% (макс. 89%; мин. 47%). Просјечна количина акумулираних падавина у мају је износила 3,0 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,2 l/m<sup>2</sup> макс. 43,8 l/m<sup>2</sup>), а да су при томе утврђене падавине током девет дана у мају.

У јуну, у епизоотиолошкој јединици Требиње је забиљежена средња температура ваздуха од 23,5<sup>0</sup>С (мин. 16,9<sup>0</sup>С; макс. 29,8<sup>0</sup>С), док је релативна влажност ваздуха за овај мјесец била 55% (мин. 41% макс. 83%). Просјечна количина акумулираних падавина за мјесец је била 0,4 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,3 l/m<sup>2</sup>; макс: 6,4 l/m<sup>2</sup>), а падавине су регистроване током четири дана јуна.

У јулу мјесецу, забиљежена је просјечна температура ваздуха 26,5<sup>0</sup>С (мин. 22,0<sup>0</sup>С макс. 30,7 <sup>0</sup>С ) са релативном влажношћу ваздуха од 50% (мин. 36%; макс. 77%). Просјечна количина падавина је била 0,3 l/m<sup>2</sup> (мин. 0,6 l/m<sup>2</sup>; макс: 5,7 l/m<sup>2</sup> ), а да при томе су падавине детектоване током четири дана јула.

Сумирани подаци о метеоролошким подацима са испитијућих епизоотиолошких јединица гдје је установљена клиничка сумња на бабезиозу оваца су приказани у Табели 15.



**Табела 15. Сумирани подаци метеоролошких параметара из епизоотиолошких јединица у којим је постављена тренутна сумња на клиничку бабезиозу од 2019. до 2021. године**

Епизоотиолошка јединица/мјесец/година	Просјечна дневна температура ваздуха (°C)	Релативна влажност ваздуха (%)	Просјек акумулираних дневних падавина (l/m <sup>2</sup> )
Рудо/јул /2019.	21,13	69,6	4,54
Рудо/мај/2020.	14,9	66	1,81
Рудо/јун/2020.	18,6	73	4,02
Рудо/јул/2020.	21,1	66,4	1,73
Рогатица/мај/2020.	13,2	71	11,17
Рогатица/јун/2020	16,96	77	4,07
Рогатица/јул/2020.	18,77	75	2,62
Гацко/мај/2020.	12,31	-	3,88
Гацко/јун/2020.	15,33	-	7,03
Гацко/јул/2020.	18,8	-	2,62
Билећа/мај/2020.	16,0	59	1,39
Билећа/јун/2020.	19,03	68	2,74
Билећа/јул/2020.	23,5	54	0,19
Рудо/мај/2021.	16,03	61	1,32
Рудо/јун/2021.	19,95	63	1,38
Рудо/јул/2021.	22,5	62	2,62
Гацко/мај/2021.	12,7	-	1,6
Гацко/јун/2021.	18,4	-	0,8
Гацко/јул/2021	21,2	-	0,5
Требиње/мај/2021.	17,0	64	3,0
Требиње/јун/2021.	23,5	55	0,4
Требиње/јул/2021.	26,5	50	0,3

Укупан број сакупљених и морфолошки детерминисаних крпеља је износио 109 у периоду испитивања. У епизоотиолошкој јединици Рудо крпељи су детектовани и сакупљени у десет стада, у епизоотиолошкој јединици Билећа у два стада, док су у Рогатици сакупљени у једном стаду. Највећи број крпеља је сакупљен у јулу 2019. године, када је испитивање и започето (просјечна температура 21,3°C). Тада су крпељи узорковани из седам од десет испитиваних стада. Што се тиче сезоне, крпељи у Рудом су најраније детектовани у мају 2020. године у једном стаду (просјечна температура 14,93°C), у коме је постојала клиничка сумња на бабезиозу оваца. У Рогатици су крпељи сакупљени у јулу мјесецу 2020. године (просјечна температура 18,77°C), у стаду гдје је постојала клиничка сумња на акутну бабезиозу оваца. У подручју Херцеговине, крпељи су сакупљени само у епизоотиолошкој јединици Билећа и то у јулу мјесецу 2020. године (просјечна температура 23,5°C), у два стада у којима је постојала сумња на хроничну бабезиозу оваца.

## 5.4. Резултати молекуларних испитивања

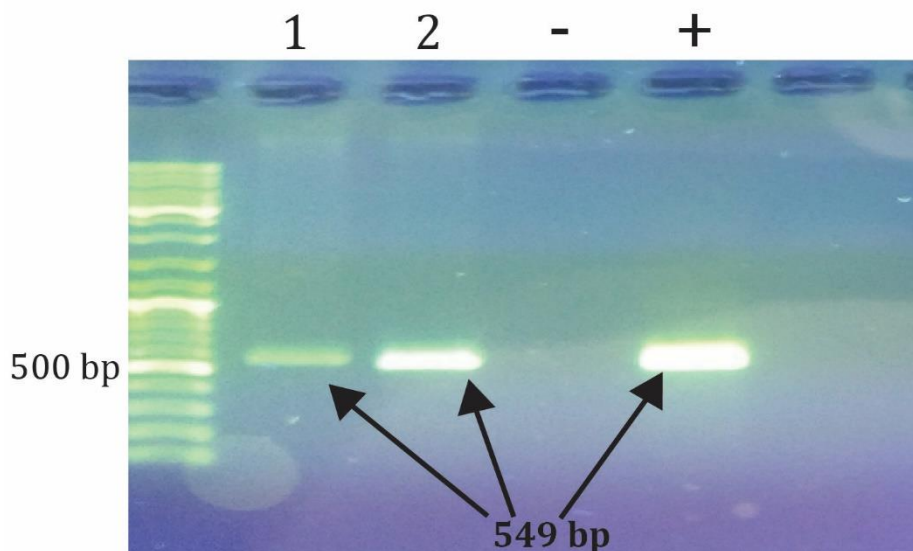
### 5.4.1. Резултати молекуларних испитивања код клинички сумњивих оваца

У спроведеној трогодишњој студији, узорци свих испитиваних оваца (192) су прегледани методом ланчане реакције полимеризације (PCR). Формиране су двије основне групе оваца: асимптоматске (116) и клинички сумњиве (76). Од укупно 192 прегледане овце, PCR методом присуство фрагмента ДНК врсте *B. ovis* установљено је код 36,46% (70/192) оваца (Табела 16; Слика 9).

**Табела 16. Приказ резултата молекуларног испитивања присуства врсте *Babesia ovis* код клинички сумњивих и асимптоматских оваца**

Група оваца	Укупно испитано	Позитивно (PCR- <i>Babesia ovis</i> )	Негативно (PCR - <i>Babesia ovis</i> )	Статистичка значајност
Клинички сумњиве овце	76	57	19	p<0,05
Асимптоматске овце	116	13	103	
Укупно	192	70	122	

Од укупно 76 узорака пуне крви клинички сумњивих оваца поријеклом из 37 стада, комбиновањем два PCR протокола (за детекцију врсте *B. ovis* или групе *Babesia/Theileria*) позитиван налаз пироплазмозе је установљен код 98,68% (75/76) клинички сумњивих оваца, док је ДНК врсте *B. ovis* установљена код 75% (57/76) оваца, које су биле пореклом из 24 стада епизоотиолошких јединица Рудо, Рогатица, Гацко и Требиње (Табела 17).



**Слика 9. Позитиван класични PCR тест на присуство секвенце ДНК врсте *Babesia ovis* (1,5 % агарозни гел); позитивни узорци - PCR продукт величине 549 парова база (1, 2); негативна контрола (-); позитивна контрола (+)**

**Табела 17. Резултати прегледаних оваца PCR методама (по епизоотиолошким јединицама)**

Епизоотиолошка јединица	Број прегледаних оваца	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> или <i>Babesia/Theileria</i> )	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>
Рудо	45	44	33
Рогатица	2	2	2
Гацко	19	19	19
Билећа	3	3	0
Требиње	7	7	3
Укупно	76	75	57

Сви негативни узорци оваца на присуство врсте *B. ovis*, су подвргнути алтернативном PCR протоколу који детектује специфичну секвенцу гена групе *Babesia/Theileria*. Од укупно 19 прегледаних узорака пуне крви клинички сумњивих оваца (које су биле негативне на PCR протоколу који детектује врсту *B. ovis*), 18 је било позитивно на алтернативном PCR протоколу. Узорак од једне овце која је дефинисана као клинички сумњива на хроничну бабезиозу, био је негативан на оба PCR протокола. Анализирано по испитиваним подручјима, у Подрињу је ДНК врсте *B. ovis* доказана код 74,47% (35/47), а у Херцеговини код 75,86% (22/29) оваца, без присуства статистичке значајности (Табела 18).

Поређењем добијених резултата код јединки различитог пола и расе, није установљена статистичка значајност. Присуство врсте *B. ovis* молекуларно је потврђено код 76,59% (36/47) оваца женског и 72,41% (21/29) оваца мушког пола (Табела 19), односно код 74,33% (55/74) оваца расе праменка и свих прегледаних јединки (2/2) мерино расе (Табела 20).

**Табела 18. Резултати молекуларног тестирања узорака поријеклом од клинички прегледаних оваца (по испитиваним подручјима)**

Епизоотиолошко подручје	Број прегледаних оваца	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Подриње	47	35	12	p = 1,0000
Херцеговина	29	22	7	
Укупно	76	57	19	

**Табела 19. Поређење резултата присуства врсте *Babesia ovis* по полу оваца**

Пол	Број прегледаних јединки	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> )	PCR негативно ( <i>Babesia ovis</i> )	Статистичка значајност
♀	47	36	11	p = 0,7868
♂	29	21	8	
Укупно	76	57	19	

**Табела 20. Поређење резултата присуства врсте *Babesia ovis* по раси оваца**

Раса	Број прегледаних јединки	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> )	PCR негативно ( <i>Babesia ovis</i> )	Статистичка значајност
Праменка	74	55	19	p=1,0000
Мерино раса	2	2	0	
Укупно	76	57	19	

Поређењем добијених резултата присуства врсте *B. ovis* код клинички обољелих оваца различите старости, утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) између групе оваца млађих од четири мјесеца у односу на групу старости 1-2 године (Табела 21).

**Табела 21. Поређење резултата присуства врсте *Babesia ovis* код клинички обољелих оваца према старости**

Старосна група	Број прегледаних јединки	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> )	PCR негативно ( <i>Babesia ovis</i> )	Статистичка значајност
≤ 4 мјесеца	6	2	4	p<0,05*
4-12 мјесеци	25	18	6	
1 – 2 године	26	22	5	
≥ 2 године	19	15	4	
Укупно	76	57	19	

\* група оваца ≤ 4 мјесеца у односу на старосну групу 1-2 године

Анализом потврђених клиничких случајева бабезиозе по мјесецима, највећи број је дијагностикован у јулу - 64,91% (37/57), а затим у јуну мјесецу - 29,82% (17/57) (Табела 22).

Анализом стада позитивних на присуство *B. ovis* PCR методама, налаз пироплазми (врста *B. ovis* или група *Babesia/Theileria*) је установљен код 97,29% (36/37) стада у епизоотиолошким јединицама Рудо, Рогатица, Гацко, Билећа и Требиње, док је ДНК врсте *B. ovis* установљена код 84,86% (24/37) стада, која су била пореклом из епизоотиолошких јединица Рудо, Рогатица, Гацко и Требиње (Табела 23).

**Табела 22. Дистрибуција клиничких случајева бабезиозе по мјесецима у периоду од 2019. до 2021. године**

Мјесец у периоду 2019-2021	Број потврђених клиничких случајева (%)
Мај	1 (1,75)
Јун	17 (29,82)
Јул	37 (64,91)
Август	2 (3,50)
Укупно	57

**Табела 23. Број стада позитивних на присуство *Babesia ovis* применом PCR метода по епизоотиолошким јединицама**

Епизоотиолошка јединица	Број прегледаних стада	PCR позитивнос ( <i>Babesia ovis</i> или <i>Babesia/Theileria</i> )	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>
Рудо	26	25	17
Рогатица	1	1	1
Гацко	5	5	5
Билећа	2	2	0
Требиње	3	3	1
Укупно	37	36	24

Анализом добијених резултата у зависности од постојећих фактора ризика, у стадима клинички обољелих оваца утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у погледу присуства врсте *B. ovis* код оваца на којима су детектовани крпељи у односу на овце које нису биле инфициране крпељима, као и између групе оваца планинске и медитеранске климе (Табела 24).

**Табела 24. Приказ резултата присуства *Babesia ovis* у стадима клинички обољелих оваца по факторима ризика**

Епизоотиолошки критеријум	Фактор ризика	Број прегледаних стада	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> )	PCR негативно ( <i>Babesia ovis</i> )	Статистичка значајност
Надморска висина	≤ 400	6	4	2	p=0,4179
	400-800	26	16	11	
	800-1200	4	4	0	
	≥ 1200	1	1	0	
Присуство крпеља	да	14	13	1	p<0,05*
	не	23	11	12	
Акарицидни третман	да	15	7	8	p=0,0829
	не	22	17	5	
Број оваца по стаду	1-50	29	18	11	p= 0,7385
	51-150	3	2	1	
	151-1000	5	4	1	
Клима	умјерено континентална	27	18	9	p<0,05*
	планинска	5	5	0	
	медитеранска	5	1	4	
Фармери упознати са бабезиозом оваца	Да	36	23	13	p= 1.0000
	Не	1	1	0	

\* статистичка значајност у односу на инфестацију крпељима и између групе оваца планинске и медитеранске климе

#### 5.4.2. Поређење резултата микроскопског прегледа са резултатима молекуларних метода

Поређењем резултата микроскопског прегледа са резултатима који су добијени применом молекуларних протокола, утврђено је следеће: од укупно 76 узорака пуне крви клинички сумњивих оваца поријеклом из 37 стада, микроскопски су прегледана 74 узорка, а пироплазме (*Babesia/Theileria*) су установљене у 86,48% (64/74) узорака. Комбиновањем два PCR протокола (за врсту *B. ovis* или групу *Babesia/Theileria*) позитиван налаз пироплазмоза је установљен код 98,68% (75/76) клинички сумњивих оваца (Табела 25).

Табела 25. Поређење резултата микроскопског прегледа са резултатима молекуларних испитивања

Епизоотиолошка јединица	Позитиван микроскопски преглед <sup>1</sup>	PCR позитивно ( <i>Babesia ovis</i> или <i>Babesia/Theileria</i> )
Рудо	40	44
Рогатица	1	2
Гацко	15	19
Билећа	2	3
Требиње	6	7
Укупно	64	75

<sup>1</sup> микроскопски су прегледана укупно 74 узорка од 76 узорака клиничких сумњивих оваца

Један случај хронично оболеле овце је био проглашен позитивним на основу микроскопског прегледа, иако узорак није био позитиван применом PCR метода (PCR *Babesia ovis*; PCR *Babesia/Theileria*). Ова овца из стада епизоотиолошке јединице Рудо је показивала знаке кахексије, анемије и жутице, а касније је угинула. Емпиријски је терапирана са имидокарб-дипропионатом у ранијој фебрилној фази.

#### 5.4.3. Резултати молекуларних испитивања у крпељима *Rhipicephalus bursa*

Од укупног броја детерминисаних крпеља, насумично изабраних 55 се користило за PCR испитивање са циљем утврђивања ДНК *B. ovis*. Крпељи су пуловани, тако да је једно стадо чинило један пул. Од укупно шест испитаних пулова крпеља из епизоотиолошких јединица Рудо и Билећа, ДНК врсте *B. ovis* је установљена у 83,33% (5/6) пулова. Сви крпељи су сакупљени у стадима оваца гдје је постављена клиничка сумња и/или потврђена *B. ovis*. Један пул крпеља из Билеће, пореклом из стада у којима није установљено присуство ове пироплазме код оваца, био је негативан на PCR испитивању.

#### 5.4.4. Резултати молекуларних испитивања код асимптоматских оваца

Од укупно 192 овце из 53 стада која су укључена у ово испитивање, 116 оваца није показало тренутну клиничку сумњу на бабезиозу оваца. Код ових асимптоматских оваца изршено је само PCR испитивање у циљу детекције ДНК врсте *B. ovis* и детерминисања субклиничке инфекције. У групи асимптоматских оваца установљено је 11,21% (13/116) PCR позитивних јединки на *B. ovis*. Утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) између група оваца из Рудог у

односу на Билећу, оваца из Рогатице у односу на Љубиње и оваца из Рогатице у односу на Билећу (Табела 26).

**Табела 26. Резултати присуства *Babesia ovis* код асимптоматских оваца по епизоотиолошким јединицама**

Епизоотиолошка јединица	Број прегледаних оваца	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Рудо	30	2	28	p<0,05*
Рогатица	13	0	13	
Чајниче	10	0	10	
Гацко	28	3	25	
Невесиње	8	0	8	
Љубиње	10	3	7	
Билећа	17	5	12	
Укупно	116	13	103	

\*статистичка значајност између група оваца из Рудог у односу на Билећу; група оваца из Рогатице у односу на Љубиње; група оваца из Рогатице у односу на Билећу

Молекуларном анализом групе асимптоматских оваца доказане су клицоноше у Рудом, Билећи и Љубињу. У Љубињу и Билећи нису потврђени клинички случајеви инфекције врстом *B. ovis*. Између епизоотиолошких подручја Подриња и Херцеговине утврђена је статистички значајна разлика између броја асимптоматских оваца позитивних на присуство ДНК врсте *B. ovis*, који је био већи у Херцеговини – 17,46% (11/63) (Табела 27). Поређењем резултата везаних за присуство врсте *B. ovis* код асимптоматских оваца у односу на пол (Табела 28) и расу (Табела 29), није утврђена статистички значајна разлика између ових категорија.

**Табела 27. Поређење прегледаних асимптоматских оваца у односу на епизоотиолошко подручје**

Епизоотиолошко подручје	Број прегледаних оваца	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Подриње	53	2	51	p<0,05
Херцеговина	63	11	52	
Укупно	116	13	103	

**Табела 28. Поређење резултата присуства врсте *B. ovis* код асимптоматских оваца по полу**

Пол	Број прегледаних јединки	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
♀	87	8	79	p=0,3063
♂	29	5	24	
Укупно	116	13	103	

**Табела 29. Поређење резултата присуства врсте *B. ovis* код асимптоматских оваца по раси**

Раса	Број прегледаних јединки	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Праменка	103	13	90	p= 0.3560
Мерино раса	13	0	13	
Укупно	116	13	103	

Што се тиче старости, значајно већи број PCR позитивних оваца је потврђен у групи оваца старости 4-12 мјесеци у односу на овце које су биле старије од двије године (Табела 30).

Највећи број стада са позитивним PCR налазом код асимптоматских оваца утврђен је у Билећи, при чему није установљена статистичка разлика између епизоотиолошких јединица у испитиваним подручјима (Табела 31).

**Табела 30. Поређење резултата присуства врсте *B. ovis* код асимптоматских оваца по старости**

Старосна група	Број прегледаних јединки	PCR - позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR - негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
≤ 4 мјесеца	12	0	12	p<0,05*
4-12 мјесеци	16	5	11	
1 - 2 године	37	5	32	
≥ 2 године	51	3	48	
Укупно	116	13	103	

\* група оваца од 4-12 мјесеци у односу на ≥ 2 године применом Фишеровог теста;



**Табела 31. Број PCR позитивних стада на присуство *B. ovis* код асимптоматских оваца по епизоотиолошким јединицама**

Епизоотиолошка јединица	Број прегледаних стада	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Рудо	12	2	10	p= 0,3778
Рогатица	3	0	3	
Чајнице	1	0	1	
Гацко	5	1	4	
Билећа	3	2	1	
Љубиње	1	1	1	
Невесиње	2	0	2	
<b>Укупно</b>	<b>27</b>	<b>6</b>	<b>21</b>	

Анализом раније детерминисаних епизоотиолошких критеријума доказано је да постоји статистички значајна разлика у присуству *B. ovis* код асимптоматских оваца из стада која се налазе у различитим климатским подручјима. Значајно већи број позитивних стада је утврђен у подручјима медитеранске климе, односно у Билећи и Љубињу (Табела 32). Ово се поклапа са ранијом подјелом, према којој је већи број позитивних стада установљен у Херцеговини, за чије подручје је медитеранска клима специфична (Табела 27).

**Табела 32. Приказ присуства *B. ovis* у стадима асимптоматских оваца по факторима ризика**

Епизоотиолошки критеријум	Фактор ризика	Број прегледаних стада	PCR позитивно <i>Babesia ovis</i>	PCR негативно <i>Babesia ovis</i>	Статистичка значајност
Надморска висина	≤ 400	0	0	0	p= 0,6959
	400-800	19	5	14	
	800-1200	7	1	6	
	≥ 1200	1	0	1	
Присуство крпеља	Да	11	4	7	p= 0,1874
	Не	16	2	14	
Акарицидни третман	Да	11	4	7	p= 0,5344
	Не	10	1	9	
	Непознато	6	1	5	
Број оваца по стаду	1-50	15	4	11	p=0,2137
	51-150	7	0	7	
	151-1000	5	2	3	
Клима	Умјерено континентална	18	2	16	p<0,05*
	Планинска	5	1	4	
	Медитеранска	4	3	1	
Фармери упознати са бабезиозом оваца	Да	23	5	18	p=1,00
	Не	4	1	3	

\*Фишеров тест - група оваца из подручја умјерено континенталне климе у односу на овце из медитеранских подручја

#### 5.4.5. Резултати секвенцирања циљног гена врсте *Babesia ovis*

Секвенцирањем одабраних PCR продуката фрагмента комплементарног 18S рРНК гена *B. ovis*, добијене су нуклеотидне секвенце приказане у Табели 33. Анализирани фрагмент гена величине ~510 bp лоциран је на позицијама нуклеотида од 746 до 1254 у оквиру 18S рРНК гена *B. ovis*.

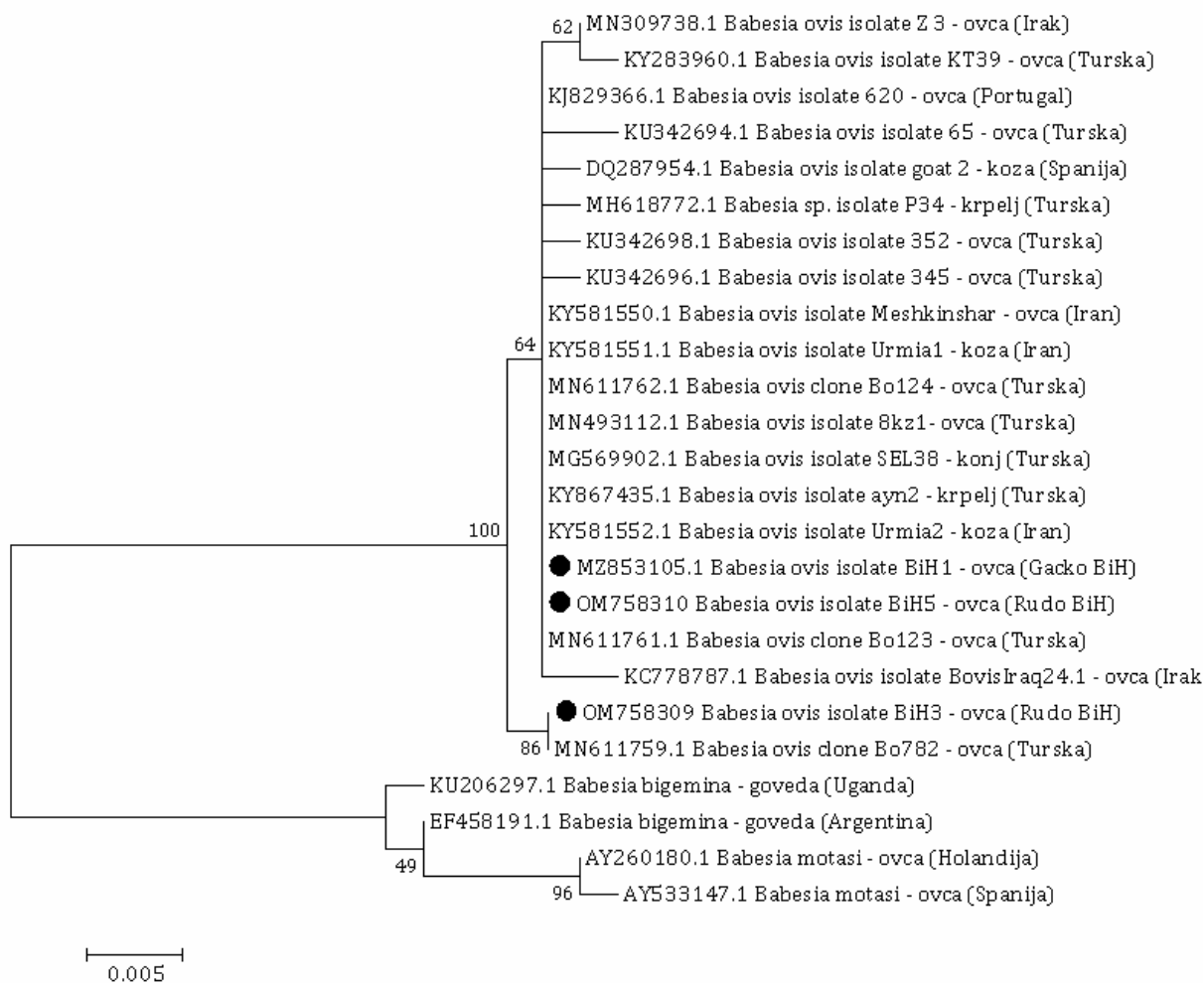
Нуклеотидна хомологија анализираних секвенци фрагмента комплементарног региону 18S рРНК гена *B. ovis* у поређењу са аналогним секвенцама депонованим у банци гена - пореклом из Турске, Ирака, Ирана, Португалије и Шпаније износила је од 99 до 100%. Поред тога, испитиване секвенце ViH1 (MZ853105), ViH3 (OM758309) и ViH5 (OM758310) су показале 100% међусобну хомологију. Наведене секвенце су добијене у овом истраживању.

Хомологија секвенци анализираних фрагмента гена *B. ovis* пореклом из Републике Српске (Босне и Херцеговине) са аналогним секвенцама *B. motasi* пореклом из Холандије (AY260180.1) и Шпаније (AY533147.1), као и *B. bigemina* пореклом из Уганде (KU206297.1) и Аргентине (EF458191.1) износила је од 95 до 96% (Слика 10).

**Табела 33. Секвенце нуклеотида анализираног циљног гена *B. ovis***

Назив секвенце, ознака у банци гена	Секвенце нуклеотида (510 bp)
<p><b>BiH1 (MZ853105)</b></p>	<p>GGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAG GTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGGACCACTGCGAAAGCATTTGCCAA GGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG ATACCGTCGTAGTCCTAACCTTAAACCATGCCGACTAGGGATTGGGGGTCTG TCATTCCGACTCCCTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTG GGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA CCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTCA CCAGGTCCAGACAGAGGAAGGATTGACAGATTGATTGCTCTTTCTTGATTC TTTGGGTAGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGT TAATTCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTATTTAGCCGGCGCTACGC GGA</p>
<p><b>BiH3 (OM758309)</b></p>	<p>GGTAATGGTTAATAGGGACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAG GTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGGACCACTGCGAAAGCATTTGCCAA GGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG ATACCGTCGTAGTCCTAACCTTAAACCATGCCGACTAGGGATTGGGGGTCTG TCATTCCGACTCCCTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTG GGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA CCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTCA CCAGGTCCAGACAGAGGAAGGATTGACAGATTGATTGCTCTTTCTTGATTC TTTGGGTAGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGT TAATTCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTATTTAGCCGGTGCTACGC GGA</p>
<p><b>BiH5 (OM758310)</b></p>	<p>GGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAG GTGAAATTCTTAGATTTGTTAAAGACGGACCACTGCGAAAGCATTTGCCAA GGACGTTTCCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAG ATACCGTCGTAGTCCTAACCTTAAACCATGCCGACTAGGGATTGGGGGTCTG TCATTCCGACTCCCTCAGCACCTTGAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTG GGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA CCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACCTCA CCAGGTCCAGACAGAGGAAGGATTGACAGATTGATTGCTCTTTCTTGATTC TTTGGGTAGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGT TAATTCGTTAACGAACGAGACCTTAACCTGCTATTTAGCCGGCGCTACGC GGA</p>



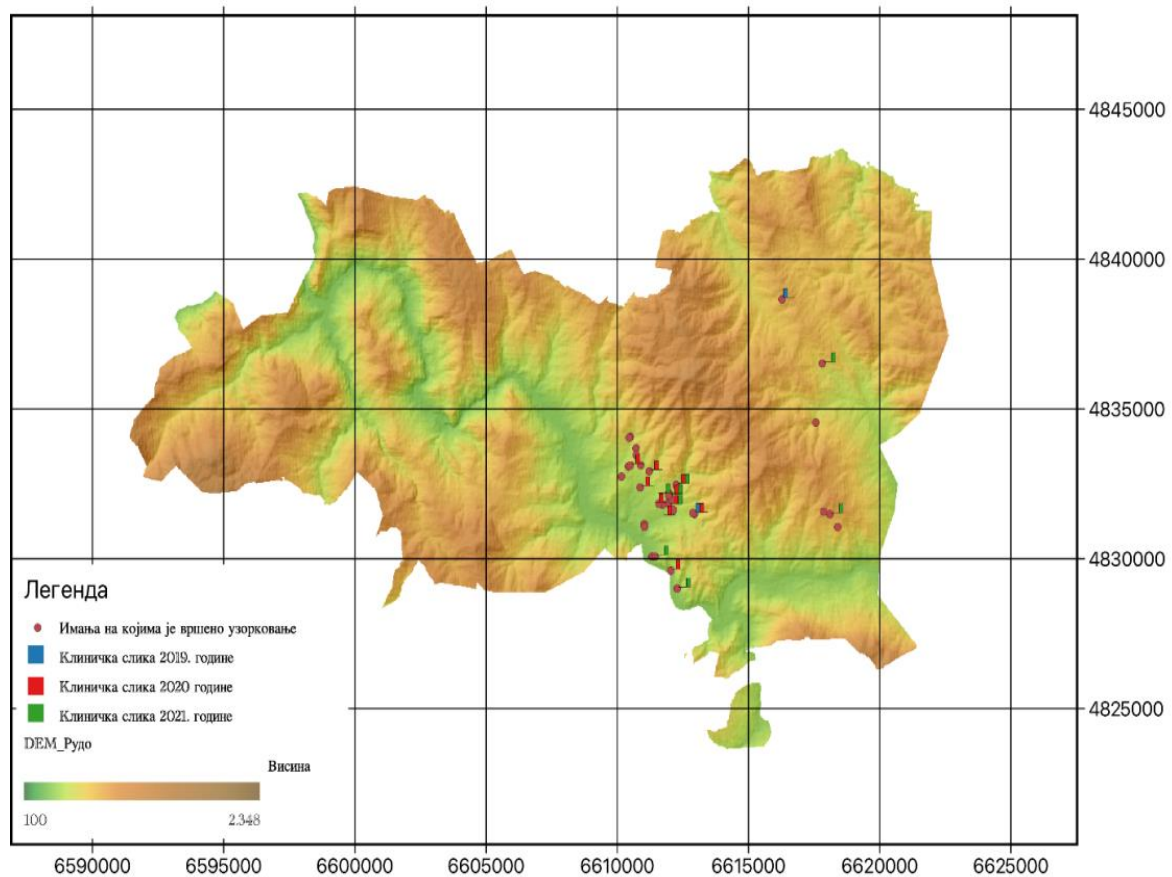


**Слика 11. Филогенетско стабло формирано на основу анализе секвенци фрагмента ДНК комплементарног гена 18S рРНК *B. ovis* из Босне и Херцеговине и аналогних секвенци *B. ovis*, преузетих из Банке гена (алгоритам: *Maximum Likelihood*; *bootstrap* вредност: 1000 пермутација). Секвенце нуклеотида *B. motasi* и *B. bigemina* су коришћене као спољашња група (енг. *outgroup*). Секвенце добијене у овом испитивању су обележене црним кругом**

## 5.5. Резултати геоинформатичке анализе

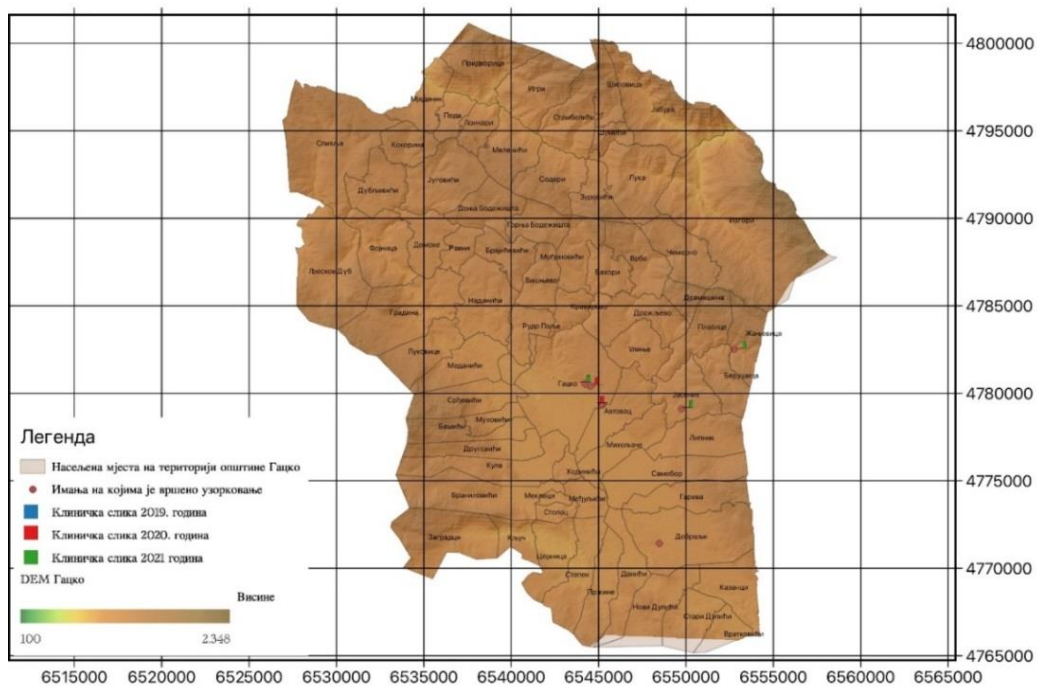
Иако су сва испитивана стада евидентирана у ГИС-у, за подробнију анализу су одабране епизоотиолошке јединице Рудо и Гацко. Природни фокуси болести су дефинисани по следећим критеријумима: 1) присуство узрочника болести; 2) пријемчиви домаћин; 3) присуство вектора; 4) присуство одговарајуће биљне нише; 5) одговарајући фактори спољашње средине који погодују појави, одржавању и ширењу узрочника. Свако жариште које је описано у епизоотиолошкој јединици, а које испуњава све горе наведене услове, може се сматрати природним фокусом болести. Од укупног броја прегледаних стада детектовано је 24,52% (13/53) природних фокуса болести. Свако стадо клинички сумњивих или асимптоматских оваца у коме је детектована *B. ovis*, при чему су на

овцама били евидентни крпељи, има одлике природног фокуса болести. У епизоотиолошкој јединици Рудо била је примјетна агрегација жаришта болести (Мапа 2).

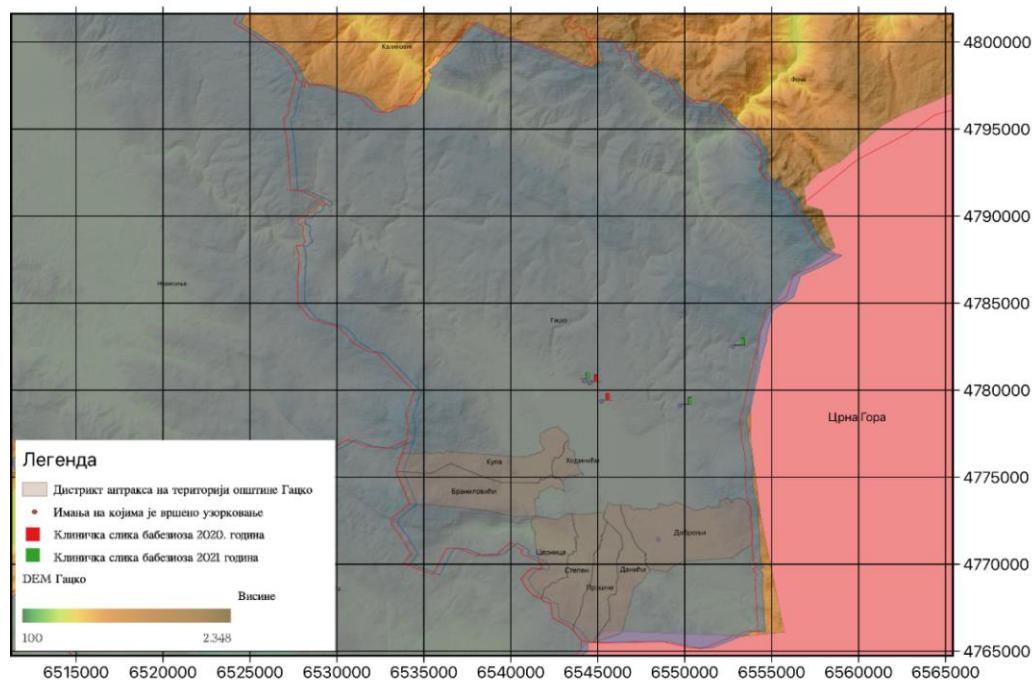


**Мапа 2. Агрегација жаришта бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* у епизоотиолошкој јединици Рудо**

На Мапи 2 се може уочити да је највећи број детектованих жаришта бабезиозе оваца (2019-2021) локализован у једном квадранту и показују груписање (агрегацију). Због мањег броја описаних жаришта, у епизоотиолошкој јединици Гацко није било могуће детектовати сличан образац дистрибуције (Мапа 3). Међутим, било је могуће примјетити да се локација жаришта бабезиозе оваца не поклапа са дистриктом антракса у овој јединици. Детектовани случајеви бабезиозе у епизоотиолошкој јединици Гацко су се налазили у источном дијелу општине у непосредној пограничној регији са Црном Гором (Мапа 4).



**Мапа 3. Локализација жаришта бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* у епизоотиолошкој јединици Гацко**



**Мапа 4. Локализација жаришта оваца узроковане врстом *Babesia ovis* у односу на дистрикте антракса у епизоотиолошкој јединици Гацко**



## 5.6. Резултати економетријске „cost-benefit“ анализе

За „cost-benefit“ анализу коришћен је примјер полуинтензивне фарме у подручју југоисточне Босне и Херцеговине са основним стадом праменке од 100 оваца и са циљем производње меса. Све цијене у економетријској евалуацији су прилагођене подручју испитивања. У пет година пројекције, добит модела А је износила 358.200 динара (Табела 34), док је модел Б имао укупну добит 948.000 динара (Табела 35). Установљена је нето садашња вриједност (НСВ) већа од нуле, што значи да оба модела имају позитиван резултат приликом економске евалуације. Значајно је виши однос добити и трошкова и добити у моделу Б (1,20), који економски оправдава спровођење превентивних мјера примјеном „pour on“ акарацидних средстава.

**Табела 34. Трошкови модела А - стадо оваца у ензоотском подручју бабезиозе оваца у коме се не примјењују оптималне превентивне мјере**

Трошкови	Године					Укупно (динара)
	1	2	3	4	5	
Исхрана	595.560	595.560	595.560	595.560	595.560	<b>2.977.800</b>
Документација за матичење	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	<b>24.000</b>
Терапија лијечења 20 оваца	18.000	18.000	18.000	18.000	18.000	<b>90.000</b>
Морталитет	45.000	45.000	45.000	45.000	45.000	<b>225.000</b>
Трошкови инјекционих акарицида	12.000	12.000	12.000	12.000	12.000	<b>60.000</b>
Техничка угинућа	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	<b>135.000</b>
Редовни ветеринарски трошкови	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	<b>150.000</b>
Остали трошкови:	60.000	60.000	60.000	60.000	60.000	<b>300.000</b>
Трошкови рада	216.000	216.000	216.000	216.000	216.000	<b>1.080.000</b>
<b>Укупно</b>	<b>1.008.360</b>	<b>1.008.360</b>	<b>1.008.360</b>	<b>1.008.360</b>	<b>1.008.360</b>	<b>5.041.800</b>

**Табела 35. Трошкови модела Б - стадо оваца у ензоотском подручју бабезиозе оваца у коме се примјењују оптималне превентивне мјере**

Трошкови	Године					Укупно (динара)
	1	2	3	4	5	
Исхрана	595.560	595.560	595.560	595.560	595.560	<b>2.977.800</b>
Документација за матичење	4.800	4.800	4.800	4.800	4.800	<b>24.000</b>
Оптимална превентива на стаду	6.480	6.480	6.480	6.480	6.480	<b>32.400</b>
Процењени морбидитет 5%	4.500	4.500	4.500	4.500	4.500	<b>22.500</b>
Техничка угинућа	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	<b>135.000</b>
Редовни ветеринарски трошкови	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	<b>150.000</b>
Остали трошкови	60.000	60.000	60.000	60.000	60.000	<b>300.000</b>
Трошкови рада	216.000	216.000	216.000	216.000	216.000	<b>1.080.000</b>
<b>Укупно</b>	<b>944.340</b>	<b>944.340</b>	<b>944.340</b>	<b>944.340</b>	<b>944.340</b>	<b>4.721.700</b>

У Табелама 34 и 35 приказани су сви трошкови два пројектована модела („А“ и „Б“) полуинтензивне фарме у југоисточној Босни и Херцеговини. Кључни фактор разлике ова два модела је цијена превентивних мјера, с обзиром на то да модел „Б“ користи „*pour on*“ формулацију делтаметрина који има репелентно дејство на векторе (оквирни период дјеловања 20 дана). Тада је претпостављено да ће број обољелих оваца у ензоотском фокусу да се смањи са 20% на 5% без детектованих угинућа. Овај податак је пројектован из искуства са терена и опсервационог периода од три године рада на докторској дисертацији. Међутим, ти резултати нису приказани, јер је се у малом броју стада користило препоручено средство, али постојала је информација да су угинућа стала, а број обољелих оваца се смањио након примјене ове превентивне мјере.

**Табела 36. Добити модела А - стадо оваца у ензоотском подручју бабезиозе оваца у коме се не примјењују оптималне превентивне мјере**

Добити	Године					Укупно (динара)
	1	2	3	4	5	
Премија	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	270.000
Излучене овце 20%	180.000	180.000	180.000	180.000	180.000	900.000
Продаја јагњади од 25 kg	846.000	846.000	846.000	846.000	846.000	4.230.000
<b>Укупно</b>	<b>1.080.000</b>	<b>1.080.000</b>	<b>1.080.000</b>	<b>1.080.000</b>	<b>1.080.000</b>	<b>5.400.000</b>

**Табела 37. Добити модела Б - стадо оваца у ензоотском подручју бабезиозе оваца у коме се примјењују оптималне превентивне мјере**

Добити	Године					Укупно (динара)
	1	2	3	4	5	
Премија	54.000	54.000	54.000	54.000	54.000	270.000
Излучене овце 20%	180.000	180.000	180.000	180.000	180.000	900.000
Продаја јагњади од 25 kg	900.000	900.000	900.000	900.000	900.000	4.500.000
<b>Укупно</b>	<b>1.134.000</b>	<b>1.134.000</b>	<b>1.134.000</b>	<b>1.134.000</b>	<b>1.134.000</b>	<b>5.670.000</b>

У табеларне приказе добити оба модела није уврштена добит производње млијечних производа, јер према добијеним епизоотиолошким подацима из анкете од стране узгајивача, овце у испитиваним стадима нису коришћене за производњу млијечних производа за јавну потрошњу. Разлог за овакав приступ је недостатак радне снаге (Табеле 36 и 37).

Анализом параметара нето добити, добити са дисконтним фактором и коефицијената економетријске прихватљивости, респективно, јасно се види да је добит у моделу „Б“ већа. Пошто се смањују трошкови лијечења, неправилног антипаразитског третмана и угинућа оваца (евидентниран морталитет од 12,28% у овој студији), овај модел је прихватљивији за држаоца животиња (Табеле 38, 39 и 40).

Табела 38. *Cost-benefit* - однос трошкова и добити два представљена модела

Године	Модел А		Модел Б	
	Трошкови	Добит	Трошкови	Добит
1	1.008.360	1.080.000	944.340	1.134.000
2	1.008.360	1.080.000	944.340	1.134.000
3	1.008.360	1.080.000	944.340	1.134.000
4	1.008.360	1.080.000	944.340	1.134.000
5	1.008.360	1.080.000	944.340	1.134.000
<b>Укупно</b>	<b>5.041.800.</b>	<b>5.400.000.</b>	<b>4.721.700.</b>	<b>5.670 000</b>

Табела 39. *Cost-benefit* - однос трошкова и добити два представљена модела са дисконтним фактором и каматном стопом од 3%

Године	Дисконтни фактор	Модел А		Модел Б	
		Трошкови	Добит	Трошкови	Добит
1	0,97	978.990,29	104.8543,69	916.834,95	11.000.970,87
2	0,94	950.476,01	101.8003,58	890.131,02	1.068.903,76
3	0,92	922.792,24	988.352,99	864.204,87	1.037.770,64
4	0,89	895.914,80	959.566,01	839.033,86	1.007.544,31
5	0,86	869.820,19	931.617,49	814.595,98	978.198,36
<b>Укупно</b>		<b>4.617.993,54</b>	<b>4.946.083,76</b>	<b>4.324.800,69</b>	<b>5.193.387,95</b>

Табела 40. Прихватљивости модела А и модела Б на основу: *NSV* - нето садашње вриједности; *CBR* - односа добити и трошкова и *ISP* - интерне стопе повраћаја

	Модел А	Модел Б
<i>NSV</i>	328.090,22	868.587,27
<i>CBR</i>	1,07	1,20
<i>ISP</i>	42,80	42,80

## 6. ДИСКУСИЈА

На основу важећег Програма узгоја оваца у Републици Српској за период 2018-2022. године („Службени гласник Републике Српске 17/18“), овчарство је једна од најзначајнијих грана сточарске производње за Републику Српску, али и цијелу Босну и Херцеговину (*Anonimus*, 2018). Према подацима из 2020. године, у Босни и Херцеговини се гаји 1.014.000 оваца (*Anonimus*, 2021a), при чему Република Српска броји 591.000 грла оваца, а број приплодних грла (основно стадо) је износио 377.000 (*Anonimus*, 2021b). На основу доступних статистичких података, није запажен већи тренд слабљења ове гране сточарства у Републици Српској (*Anonimus*, 2021a; *Anonimus*, 2021b). Ако се узму у обзир чињенице да пашњаци у Републици Српској обухватају површину од 324.787 хектара („Службени гласник Републике Српске 17/18“) и да је у Босни и Херцеговини најбројније муслиманско становништво које традиционално конзумира овчије месо (*Anonimus*, 2021a), онда претходно наведени подаци не изненађују.

За потребе истраживања није био доступан број оваца по општинама Републике Српске, али према подацима Агенције за аграрна плаћања Републике Српске, у систему подстицаја се 2020. године налазило 81.366 оваца<sup>1</sup>. Према члану 11. Правилника о условима и начину остваривања новчаних подстицаја за развој пољопривреде и села за 2022. годину („Службени гласник РС 4/22“), основни услов да би овчари ушли у систем подстицаја, био је да њихово основно стадо броји преко 100 грла оваца. Из истих података се примећује да су Гацко (5.945 оваца) и Билећа (6.237 оваца) биле међу првих пет јединица локалне самоуправе у Републици Српској са највећим бројем грла оваца у систему подстицаја (*Anonimus*, 2022). Представљени статистички подаци указују да је овчарство једна од најразвијених грана у Републици Српској, као и цијелој Босни и Херцеговини, али упоређивањем података статистичког завода и података Агенције за аграрна плаћања, може се закључити да највећи број оваца у Републици Српској чине мања стада која нису ни регистрована у ресорном Министарству. Да би се слиједио Програм узгоја оваца у Републици Српској за период 2018-2022., који је уједно и стратешки документ Републике Српске, потребно је даље радити на профилизацији узгоја и ојачати активни надзор здравственог статуса популације оваца. Зато спроведено истраживање поред научне оправданости, има и посебан национални и регионални значај. Пошто је испитивано погранично подручје са Републиком Србијом и Црном Гором, добијени резултати представљају базу података од шире епизоотиолошке важности.

Неминовно је нагласити да је ветеринарски надзор над популацијом оваца у Републици Српској и Босни и Херцеговини неоправдано запостављен, иако се зна колики значај има ова грана сточарства. Епизоотиолошка испитивања болести од приоритета, као што је бабезиоза оваца, су један од кључних корака у подржавању важећег Програма узгоја оваца и основни су услов за даље одржавање и развој овчарства. Непозната епизоотиолошка ситуација заразних и паразитских болести оваца је једна од кључних препрека за извоз живих јагњади, сировог овчјег меса и млијечних производа на страна тржишта.

---

<sup>1</sup> подаци добијени из Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Српске на захтјев аутора

Први добијени подаци о присуству хемопротозое *B. ovis* као узрочника малигне бабезиозе оваца у Републици Српској, односно Босни и Херцеговини датирају 70 и више година уназад. Доступни литературни подаци описују број потврђених жаришта на Балканском полуострву и у Европи. На Балканском полуострву, молекуларним методама је доказано присуство врсте *B. ovis* у Грчкој код асимптоматских оваца (*Theodoropoulos* и сар., 2006), а у Румунији и Хрватској у крпељима (*Anderson* и сар. 2017; *Jurković*, 2021). Ако узмемо у обзир спорадичну појаву клиничке бабезиозе оваца у Шпанији и Италији (*Savini* и сар., 1999; *Hurtado* и сар., 2015), присуство и сезонска појава клиничке бабезиозе у Подрињу и Херцеговини потврђују постојање ензоотског подручја бабезиозе узроковане врстом *B. ovis* у Босни и Херцеговини. Опште је прихваћено да је граница географске дистрибуције врсте *B. ovis* 45. сјеверна паралела (*Ahmed* и сар., 2006). Пошто 45. сјеверна паралела пресеца територију Босне и Херцеговине, описано жариште клиничке бабезиозе узроковане врстом *B. ovis* у Рогатици, вјероватно представља најсјевернију тачку до данас прихваћене и дефинисане дистрибуције ове врсте.

Прикупљени епизоотиолошки подаци од узгајивача и ветеринара у подручју Херцеговине, као и значајан број клиничких случајева и позитивних налаза код асимптоматских оваца, показатељ су да се бабезиоза оваца јавља под сличним околностима и у размјерама као у земљама Блиског истока (*Ceylan* и сар., 2021). У прилог овоме иде констатација да је овчарство у Херцеговини искључиво екстензивно, а овце се држе слободно у већим стадима и пуштају током љета у крашка поља и на планинске пашњаке. Слична традиција постоји у Турској гдје је ова болест ензоотског карактера (*Ceylan* и сар., 2021). Прикупљањем епизоотиолошких података од локалне ветеринарске службе у Херцеговини, установљено је да постоји тренд сезонског кретања оваца из јужних дијелова Херцеговине (Билећа и Љубиње) ка сјеверним планинским дијеловима који су богати пашњацима (Гацко, Невесиње). Овим процесом се мјешају овце, формирају се на пашњацима заједничка стада, што омогућава лакше преношење патогена у пријемчивој популацији и контаминацију пашњака векторима (*R. bursa*). Такође, ово је процес који не дозвољава формирање стабилног имунитета стада односно „ензоотске стабилности“, јер континуирано постоји циркулација патогена у популацији оваца различитог имунског статуса. Наведени феномен је примјећен прије више од 60 година на овом терену (*Cvjetanović*, 1963), а спроведено испитивање је потврдило да таква традиција овчарења постоји и данас, тако да се очекује већа појава болести када имунски наивна популација оваца без преимуниције по први пута дође у контакт са врстом *B. ovis*. Додатни проблем везан је за податак да углавном изостаје ветеринарска контрола здравственог статуса оваца у већим, номадским стадима.

Превентивне и терапијске мјере спроводе узгајивачи, који углавном не пријављују на вријеме појаву болесних грла и/или угинућа. Ово је посебно од значаја у епизоотиолошким јединицама Гацко и Билећа, где постоје дистрикти антракса. Актуелан проблем да сточари не пријављују болести животиња по прописима, постојао је и раније (*Petrović*, 1958), а може се рећи да је за ветеринаре један од основних проблема непознавање праве епизоотиолошке слике ове болести на терену. Постоји извјесна разлика у епизоотиологији бабезиозе оваца у Рудом (Подриње) и Херцеговини. У Рудом сточари држе мања стада оваца углавном за личне потребе, на мањим пашњацима, где није регистровано значајније кретање оваца и интензивнији је ветеринарски надзор. У појединим

селима у Рудом (Пребидоли, Ресићи, Гојава) је примјећен типичан образац груписања природног жаришта болести (*Zeman* и сар., 1990). Клинички случајеви болести су се појављивали у истим стадима током сезона 2019., 2020. и 2021. године, при чему су чешће обољевала старија грла, регистрована су угинућа старијих овнова и оваца, а доминантни крпељи сакупљени са оваца су припадали врсти *R. bursa*. Значајан број клиничких случајева болести са смртним исходом, који се понављају сезонски на истим локацијама у Рудом, указује на ензоотски фокус болести (*Yeruham* и сар., 1995). Није у потпуности разјашњено зашто се на овом подручју није успоставила ензоотска стабилност, али на основу трогодишњих испитивања, претпоставља се да су традиција држања оваца, неправилно спроведене превентивне мјере и доминантно присуство вектора врсте *R. bursa* на ужим локацијама спољашње средине, кључни фактори за одржавање природног фокуса болести.

Као и код других бабезиоза, млађе јединке се сматрају отпорним на инфекцију врстом *B. ovis*, а један од разлога је присуство матерналних антитијела до три мјесеца старости јагњади (*Yeruham* и сар., 1998а). Из епизоотиолошких података сазнајемо да се већина оваца из испитиваног подручја јагњи у зиму (јануар-фебруар), тако да јагњад од оваца које имају природно стечени имунитет посједују матернална антитијела (уз постојећи неспецифични имунитет) до априла или маја. Међутим, адулти крпеља врсте *R. bursa* на Балкану постају активни од маја (*Angelovski* и сар., 1963). Ово се поклапа са чињеницом да су први регистровани случајеви инфекције врстом *B. ovis* регистровани у мају са порастом броја случајева у јуну и јулу. Први крпељи у овој студији су утврђени и сакупљени у мају мјесецу, а највећи број клиничких случајева бабезиозе је регистрован у јулу. У Изрелу се бабезиоза оваца јавља од априла мјесеца, а највећи број случајева је регистрован у мјесецу мају (*Yeruham* и сар., 1998а), док у Турској, гдје је болест ензоотска, сезонални пик достиже у јулу мјесецу (*Sayin* и сар., 1997). У Херцеговини, сви регистровани клинички случајеви бабезиозе 2020. и 2021. године су били у јулу, а један од разлога је што се већина оваца овдје јагњи најинтензивније у фебруару и марту (највећи талас јагњења је нешто каснији у односу на подручје Руда). То значи да са порастом активности вектора опада степен заштите јагњади.

Клинички налаз са потврђеним присуством *B. ovis* код 57 оваца не одступа значајно од литературних података (*Angelovski* и сар., 1963; *Yeruham* и сар., 1998а; *Sevinc* и сар., 2013). Морбидитет варира од 14% до 20% (*Angelovski* и сар., 1963; *Sevinc* и сар., 2013). У овом истраживању није било могуће установити морбидитет, јер нису сва обољела грла у испитиваним стадима пријављена и анализирана. Појава хематохезије, о којој постоје ретки извештаји у литератури, утврђена је у 14% испитиваних случајева. О појави крвавог пролива код акутне пироплазмозе оваца извештава група аутора из Македоније (*Angelovski* и сар., 1963). Крварења у цријевима се подударају са тешким патоморфолошким налазом који је утврђен код једне обдуковане овце. Хематохезију прати и појава хемоглобинурије, али искуство са терена је показало да је тешко утврдити хемоглобинурију код свих сумњивих оваца, а од стране узгајивача углавном прође неопажено. Код оваца, хематохезија је чест клинички знак ентеротоксичних кластридијалних инфекција односно „синдрома жутог јагњета“ (*Songer* и *Meer*, 1996). Риједак налаз код бабезиозе је и агалакција оваца која је на терену повезана са дуготрајном хипертермијом. Евидентно је да је у Рудом клиничка слика болести била нешто драстичнија са већим бројем угинућа, при чему је и поред терапије утврђен висок

леталитет. Поменути леталитет је био нешто виши у односу на новије литературне податке (*Sevinc* и сар., 2013). Угинућа су праћена специфичним клиничким знацима и профузним крварењима (хемоглобинурија и хематохезија) код старијих грла. Код два угинула шиљежета нису установљени специфични знаци бабезиозе, већ само висока температура и неспецифични знаци општег инфективног синдрома.

Важно је напоменути, да је тежа клиничка слика евидентирана код оваца инфицираних врстом *B. ovis* у односу на групу оваца гдје није детектована циљна врста, али је алтернативни PCR протокол био позитиван на пироплазме (*Babesia/Theileria*). Ово је најбољи показатељ да *B. ovis* поседује значајно већи степен патогености од других врста пироплазми на испитујућем терену. Потврда патогености ове врсте бабезија код оваца се подудара и са прикупљеним епизоотиолошким подацима и добијеним резултатима клиничких испитивања. Укупно 20% узгајивача је пријавило ранија угинућа оваца са симптомима бабезиозе, при чему је у 75% случајева клиничке сумње потврђена *B. ovis*, а утврђени леталитет у испитиваној групи је био 12,28%, упркос апликованој терапији. Поред тога, у стадима је примјећена апсолутна доминација (100%) основног вектора - *R. bursa*.

Слични подаци су примјећени у Турској гдје је *B. ovis* установљена код 70,8% оваца са клиничким симптомима (*Sevinc* и сар., 2018). Клиничка манифестација код оваца у ензоотском фокусу је била праћена значајно већим леталитетом у односу на случајеве из Херцеговине. У Подрињу је регистрован леталитет оваца од 20%, што указује на значајно драстичнију клиничку слику болести. У складу са наведеним чињеницама термин „ензоотска стабилност“ код малигне бабезиозе оваца се не може увијек прихватити, као што је то случај код бабезиозе говеда (*Yeruhant* и сар., 1998а). Могући разлози за већи леталитет у Рудом су: 1) доминантна заступљеност вектора; 2) нижи степен имунитета популације оваца; 3) присуство мјешовитих инфекција; 4) патогенији сој врсте *B. ovis*.

Да је инфекција врстом *B. ovis* од изузетног значаја за ова два географска региона потврђује и присуство ДНК ове врсте код 11,21% асимптоматских оваца. На подручјима гдје је болест ензоотског карактера, молекуларна преваленција код насумично испитаних здравих оваца се креће од 0 до 21,42% (*Ceylan* и сар., 2021). Важан је и податак да постоји статистички значајна разлика у броју асимптоматских клицоноша врсте *B. ovis* између Подриња и Херцеговине. У Херцеговини је установљен значајно већи број субклиничких инфекција (21,1%) у односу на Подриње (3,77%) што указује на потенцијално виши степен преимуниције у пријемчивој популацији Херцеговине. Раније поменут податак о вишем леталитету код оваца у Подрињу у односу на Херцеговину, вјероватно је последица и разлика у имунском статусу испитиваних оваца из различитих региона.

Код хроничних случајева болести (пет оваца), није установљена ДНК врсте *B. ovis*, што наводи на претпоставку да се ови случајеви не могу категорисати као хронични, већ су највероватније случајеви непотпуног опоравка грла од акутне форме болести. Сва грла која су означена као „хронични случајеви“ су претходно имала симптоме акутне бабезиозе и свима је апликован имидокарб. Узрочник је након терапије вјероватно елиминисан из организма, а постоји и могућност да је у питању била хронична форма тајлериозе (потврђена позитивним алтернативним PCR протоколом). Тајлерије остају дуго времена присутне у крви домаћина без евидентних клиничких знакова (*Tavassoli* и сар., 2011). Због тога, у студијама

пресека често се доказује висока преваленција тајлериозе код асимптоматских оваца (Razmi и сар., 2013). Лимитација студије превалентности је темпорална зависност, јер резултати студије зависе од фреквенције појаве и дужине болести (Smith, 2019). С обзиром на акутни ток бабезиозе, насумичне студије пресека у асимптоматској пријемчивој популацији оваца неће дати адекватне податке о учесталости и дистрибуцији патогена у популацији. Из тог разлога, ово испитивање је спроведено као сезонска, клиничка студија која је трајала три године.

Ентомолошким испитивањем на поменутом подручју потврђено је доминантно присуство крпеља *R. bursa*. Интересантно је да радови који проучавају крпељску фауну на територији Босне и Херцеговине нису потврдили доминантну дистрибуцију ове врсте крпеља (Omeragić и сар., 2022). Очигледно је да резултати дистрибуције зависе од периода и подручја испитивања. *Rhipicephalus bursa* је доказани резервоар за многе значајне патогене, од којих су неки узрочници кримске-конго грознице, анаплазмозе, кју грознице и тајлериозе (Arnaudov и сар., 2014). Налаз врсте *B. ovis* у векторима је честа појава у епизоотиолошким студијама, те овај резултат потврђује активну циркулацију патогена на испитиваном подручју (Esmailnejad и сар., 2014б).

Закасњела појава клиничких случајева у Херцеговини (епизоотиолошка јединица Гацко) у односу на Рудо, повезана је са активношћу крпеља, а може се објаснити и различитим метеоролошким подацима. У Гацком је регистрована нижа просјечна температура ваздуха у односу на Рудо, али и у односу на друге епизоотиолошке јединице укључене у ово испитивање. У мају мјесецу 2020. и 2021. године просјечна дневна температура ваздуха у Гацком је износила око 12°C, што је за 3-4 степена ниже у односу на Рудо. За вријеме маја у Рудом су забиљежени први клинички случајеви бабезиозе оваца. Адулти *R. bursa* постају активни када дневне температуре пређу 18°C (Yeruham и сар., 1995). Због тога је појава клиничке бабезиозе у Гацком била одложена до јула, када су регистровани сви клинички случајеви у овом испитивању. Међутим, из овог произилази и чињеница да је просјечна температура у мају у Рудом, када су детектовани први случајеви болести и сакупљени крпељи (2020. и 2021.), била 14,9°C и 16,03°C. То значи да је активност крпеља *R. bursa* у Рудом била могућа и при нижој температури од 18°C.

Спроведено истраживање је специфично са два додатна аспекта. Прво, у испитиваном подручју су детектовани и потврђени случајеви бабезиозе оваца у три различита климатска подручја (медитеранска, планинска и умјерено континентална клима). Раније, појава бабезиозе оваца се углавном повезивала са јужним крајевима и медитеранском климом (Angelovski и сар., 1963; Cvjetanović, 1963; Yeruham и сар., 1995). Друго, присуство *B. ovis* је доказано на различитим надморским висинама. Yeruham и сар. (1995) сматра да су крпељи углавном присутни на 100-200 метара надморске висине, док је Nenadić (1964) налазио бабезиозу оваца у општини Пљевља на 700 метара надморске висине. На Блиском истоку постоје извјештаји да је *B. ovis* присутна на планинама (Ziapour и сар., 2016). Налаз бабезиозе оваца у номадском стаду на планини Лебршник код Гацка (село Жањевица) указује на потенцијалну адаптацију крпеља *R. bursa* на веће надморске висине и оштру планинску климу. Слична ситуација је описана код појединих врста крпеља који су вектори за бабезије говеда (Chávez-Larrea и сар., 2021).



Евидентирани фактори ризика у истраживању били су: присуство крпеља, старост, надморска висина, клима, локација и клинички статус. У свим стадима гдје је потврђена клиничка бабезоза оваца, било је установљено и присуство крпеља ( $p < 0,05$ ). Овај фактор ризика је утврђен у испитивању у Грчкој и Турској, где су крпељи били присутни на позитивним асимптоматским овцама (*Theodoropoulos* и сар., 2006; *Aktas* и сар., 2007). Што се тиче надморске висине, на подручјима са планинском климом утврђен је већи број инфицираних стада са клиничким обликом болести у односу на подручја са медитеранском климом ( $p < 0,05$ ). Ово се може објаснити нижим степеном премуниције код планинских оваца, него код мањих стада у приморским крајевима. Болест се чешће јављала код групе оваца старости 1-2 године у односу на јагњад млађу од четири мјесеца, што се објашњава постојањем старосно зависног имунитета (*Habela* и сар., 1991). У другим истраживањима није утврђена статистички значајна разлика између старосних група оваца (*Aktas* и сар., 2007; *Razmi* и сар., 2013). У ситуацијама када не постоји значајна разлика између старосних група оваца које су инфициране врстом *B. ovis*, претпоставља се да је постигнута ензоотска стабилност инфекције (*Aktas* и сар., 2007; *Morel* и сар., 2019). *Friedhoff* (1997) наводи да од бабезиозе чешће обољевају млађе овце. У стадима медитеранског подручја се чешће јављала субклиничка инфекција у односу на стада са подручја умјерено континенталне климе. Најважнији фактор ризика је клинички статус. Утврђено је значајно веће присуство *B. ovis* у крви оваца са раније постављеном клиничком сумњом, у односу на асимптоматска грла ( $p < 0,05$ ). Према литературним подацима, стада преко 15 оваца су чешће инфицирана врстом *B. ovis* (*Iqbal* и сар., 2011), што у овој студији није регистровано. Исти аутори наводе да је присуство овчарских паса додатни фактор ризика за појаву инфекције врстом *B. ovis* (*Iqbal* и сар., 2011). Аутори су сматрали да пси могу да буду механички преносиоци крпеља за поједина стада оваца.

Дијагностика у овој студији је извршена микроскопским прегледом крви клинички сумњивих оваца и применом два PCR протокола за молекуларну идентификацију. Извесни аутори препоручују методу реверзне хибридизације, која може да детектује више патогена у једном узорку (*Iqbal* и сар., 2013). У овом истраживању наведена метода није изабрана из практичних разлога (виша цијена у односу на PCR, лабораторија надлежне установе која редовно изводи молекуларне студије нема валидирану и развијену методу, не располаже адекватном опремом и не поседује кадрове оспособљене за њено извођење) и због приоритета према значају и патогености. Поједини аутори наводе да PCR има већу осјетљивост у односи на тест реверзне хибридизације (*Bilgic* и сар., 2017). Код тешке клиничке слике и акутног тока болести са очекиваним угинућима, прво је потребно искључити врсту *B. ovis*, па тек онда даљим испитивањима закључити потенцијално присуство других хемопротозоа. Ова претпоставка је била тачна, јер је 75% клинички сумњивих оваца било позитивно на ДНК фрагмент врсте *B. ovis* указујући на доминантну заступљеност ове хемопротозое у Босни и Херцеговини. Укупно 95% клинички сумњивих оваца негативних на *B. ovis* је било позитивно на друге пироплазме. На овај начин смо доказали присуство и других пироплазми у популацији оваца југоисточне Босне и Херцеговине, које имају клинички значај. *Lempereur* и сар. (2017) препоручују употребу PCR протокола за групу *Babesia/Theileria* као основног у дијагностици пироплазмоза. Међутим, у овој студији он је послужио као алтернативна дијагностичка метода, како би се

смањили трошкови лабораторијских претрага. Комбинација два PCR протокола је значајно повећала прецизност дијагностике пироплазмозе у овој студији.

Клинички преглед и микроскопски преглед крви су указивали на доминатно присуство пироплазми које углавном одговарају врсти *B. ovis*, због чега је употреба PCR-а са прајмерима специфичним за врсту имала предност. Микроскопски налаз у овој студији је био од великог значаја за постављање сумње и правилно усмеравање даљег лабораторијског рада. Међутим, због морфолошких разлика развојних облика врсте *B. ovis* и ниже осјетљивости ове методе, није било довољно поуздано ослонити се само на њу у дијагностици (*Habela* и сар., 1990; *Aktas* и сар., 2005). Посебно је тешко тумачење микроскопског налаза на подручјима која нису дистрикти овог обољења, услед чега дијагностичари немају довољно искуства у препознавању развојних облика патогене врсте *B. ovis*. Налаз у Рудом, гдје је у два случаја констатовано присуство крупних развојних облика ове бабезије, у складу је са литературним подацима, који потврђују идентичан налаз на Блиском истоку (*Shayan* и сар., 2008). У оба случаја, PCR методом је амплификован фрагмент дужине 549 парова база специфичан за врсту *B. ovis* (*Aktas* и сар., 2005). Налаз и присуство ДНК фрагмента ове патогене бабезије код асимптоматских оваца потврђује да је претходно валидиран PCR протокол од *Aktas* и сар. (2005) довољно осјетљив да утврди овце са ниском паразитемијом на терену, а не само клиничке случајеве. Такође, у овом испитивању примјеђена је већа осјетљивост и специфичност одабраних PCR метода у односу на микроскопски преглед.

На основу доступне литературе и теренских запажања на испитиваном подручју је евидентно постојање мјешовитих инфекција *B. ovis* са другим хемопротозоама, што значајно утиче на епизоотиолошку ситуацију и клиничку манифестацију код обољелих оваца (*Bilgic* и сар., 2017). У првом реду овдје се наводи присуство крвних патогена из родова *Anaplasma*, *Mycoplasma* и *Theileria*. Доказано је да између врста *A. ovis* и *B. ovis* у домаћину постоји синергистичко дејство, док интеракција између врста *T. ovis* и *B. ovis* може бити антагонистична (*Sevinc* и сар., 2018). На испитиваном подручју истраживања потребно је посветити више пажње феномену коинфекције. У току истраживања обољелим овцама у Подрињу и Херцеговини препоручивана је парентерална апликација окситретрацилина (20 mg/kg) уз имидакарб дипропионат (1,2 mg/kg) због евентуалног присуства анаплазми или микоплазми у коинфекцији са врстом *B. ovis*. Иако други хемопаразити нису били предмет испитивања, оправдано је посумњати на њихово присуство и утицај.

Поред еколошких фактора, на дистрибуцију бабезиозе оваца утичу и антропогени фактори (*Smith*, 2019). Из епизоотиолошких података, закључено је да само 36% узгајивача спроводи редовни акарицидни третман у циљу смањења инфестације крпељима. Углавном се користи купање оваца диазиномом, јер је то најјефтинији облик превентивног третмана. Изузетак је ветеринарска служба у Рудом, која користи парентералну примјену ивермектина прије почетка сезоне крпеља. Значајан број утврђених сезонских случајева бабезиозе указује да ове превентивне мјере нису оптималне и довољно ефикасне, јер ивермектин нема репелентни ефекат. Бољи ефекат би се постигао једнократном или двократном апликацијом „*pour on*“ делтаметрина у сезони мај-август (*Mehlhorn* и сар., 2011). Експериментално је доказан заштитни ефекат делтаметрина против крпеља из рода *Rhipicephalus*, 21 дан након иницијалне апликације (*Mehlhorn* и сар., 2011). Када би се овај акарицид апликовао у сезони крпеља, вјероватно би се број

клиничких случајева смањено, али се болест не би могла до краја сузбити и ставити под контролу. У пракси, узгајивачи не дозвољавају дезинсекцију спољашње средине око имања, јер се плаше контаминације на уситњеним ратарским површинама. То је један од разлога што се развојни облици крпеља константно одржавају у ензоотским фокусима.

Филогенетском анализом одабраних позитивних PCR амплификата циљног гена врсте *B. ovis* је установљено да су се секвенце ViH1 (MZ853105) и ViH5 (OM758310) добијене у овом испитивању груписале са нуклеотидним секвенцама пореклом из Турске, Ирака, Ирана, Португалије и Шпаније. Анализирана секвенца ViH3 (OM758309) се засебно груписала са аналогном секвенцом пореклом из Турске (MN611759.1) што је последица постојања гуанина (G) уместо аденина (A) на позицији 762, односно тимина (T) уместо цитозина (C) на позицији 1245 комплетне нуклеотидне секвенце гена комплементарног секвенци рРНК мале субјединице рибозома *B. ovis*. Циљни 18S ген рибозомске РНК је високо конзервиран ген код пироплазми и није склон промјенама и из тога разлога није могуће на основу њега разликовати генотипове, сојеве или линије у оквиру врсте *B. ovis* (Benedicto и сар., 2020). У Турској је доказан висок степен генетичког диверзитета ове бабезије на основу фреквенције експресије микроалела, али није могуће повезати постојање различитих генских група са вируленцијом (Mira и сар., 2020).

Употреба геоинформатичког система у QGIS програму је значајно допринела познавању просторне дистрибуције бабезиозе оваца у Рудом и Гацком. У епизоотиолошкој јединици Рудо се јасно може примјетити груписање потврђених жаришта на ужој локацији што је типично за болести које се преносе крпељима (Zeman и сар., 1990). Зато је уже подручје ове епизоотиолошке јединице у значајно већем ризику од појаве бабезиозе оваца. На основу добијених података о агрегацији случајева по јединици површине може се потврдити присуство ензоотског фокуса (Yeruham и сар., 1995). Додатно, поједине уже локације у ензоотском фокусу се могу прогласити хиперензоотским фокусима за бабезиозу (Martinod и Gilot, 1991). Ови термини, према ветеринарској клиничкој епидемиологији до сада нису јасно дефинисани и користе се углавном без јасних критеријума (Smith, 2019).

У Гацком није установљено груписање клиничких случајева због мањег броја евидентираних жаришта, који су потврђени на источном дијелу епизоотиолошке јединице. На овом подручју доминирају типични планински пашњаци, који се налазе ван подручја регистрованих дистрикта антракса што је од практичног значаја за локалну ветеринарску службу. Профилактичка препорука у сузбијању бабезиозе је само промјена локације испаше оваца, односно избјегавање источног дијела општине за пуштање стада на пашу. Овакав приступ је изводљив у пракси с обзиром на значајне пашњачке површине које се налазе у Гацком. У Рудом, гдје је број оваца по стаду значајно мањи у односу на епизоотиолошку јединицу Гацко, ова мјера није била могућа због недостатка већих пашних површина.

У детектованом природном фокусу болести постоји равнотежа у еколошком систему спољашње средине, вектора и домаћина (Smith, 2019). Уколико би се неки фактор у овом систему промјенио, мјењала би се и природа појаве болести - сезонска инциденција. Када би се на овом подручју овце припуштале плански и када би се јагњиле током летњих мјесеци док су активни крпељи, значајно би се смањено број клиничких случајева болести, јер би јагњад у периоду активности

вектора била значајно отпорна на инфекцију врстом *B. ovis*. Према томе, интензивирање и модернизација у овчарству су један од основних разлога зашто је од осамдесетих година прошлог вијека у земљама Балкана дошло до смањења појаве бабезиозе оваца.

Налаз врсте *B. ovis* у Босни и Херцеговини је значајан прилог познавању постојећих испитивања врста рода *Babesia* које паразитирају код других животиња. *Babesia* spp. су детектоване код одстрелених лисица (Hodžić и сар., 2015) и асимптоматских коња (Davitkov и сар., 2016), док су клинички случајеви установљени код говеда (Stevanović и сар., 2020) и паса (Ćoralić и сар., 2020). Без обзира на досадашњи рад, постоји и даље непознаница у дистрибуцији пироплазми код животиња, јер мали број студија узима у обзир све теренске епизоотиолошке податке на ширем подручју испитивања. Постојеће студије су лимитиране општим студијама пресека (Hodžić и сар., 2015), малим бројем насумично испитаних узорака (Davitkov и сар., 2016), појединачним описима клиничких случајева (Stevanović и сар., 2020) и серијама клиничких случајева (Ćoralić и сар., 2020).

Ово испитивање потврђује став да је *B. ovis* један од узрочника такозваних „прољетних побола“ оваца у Херцеговини, али није узрочник „зајуживања“ (Cvjetanović, 1963). Може се рећи да је ова врста доминантан узрочник болести оваца током љета, када се налазе на пашњацима Гатачке висоравни, а посебно ако је позната чињеница да се овце (потенцијалне клицоноше) са југа Херцеговине активно крећу ка подручју планинских пашњака и висоравни током љета. Очигледно је да постоји динамика кретања и мјешања узрочника *B. ovis* у пријемчивој популацији оваца у Херцеговини. У Горњем Подрињу, током сезоне 2020. године примјеђено је ширење бабезиозе оваца из Рудог у Рогатицу (Жепа), при чему су преко оваца пренешени и крпељи који су идентификовани као *R. bursa*. Данас је епизоотиолошка јединица Рогатица, по изјавама ветеринара, подручје које није типично за појаву бабезиозе, али из изворних литературних података се увиђа да је ова болест представљала значајан проблем педесетих година прошлог вијека (Mandušić, 1953). Већи број клиничких случајева обољелих оваца у Рудом у односу на Херцеговину указује на постојање ензоотског фокуса болести, али и чињеница да је ово подручје изразито опасно за купопродају оваца и да може бити потенцијални извор болести за друга подручја у региону. Ензоотски фокус у Рудом има општи епизоотиолошки значај за Босну и Херцеговину из два основна разлога:

- 1) због ризика од извоза оваца и ширења узрочника и крпеља на нова подручја гдје се болест може стационарирати;
- 2) због ризика од увоза оваца у ензоотски фокус, јер постоји ризик да имунски наивна популација оваца оболи са већом клиничком инциденцијом.

Спознаја ове чињенице указује на потребу спровођења системских мјера на овом подручју, које је потребно иницирати са нивоа виших надлежних органа ветеринарске службе. Други проблем је интернационалног значаја. Појава болести и жаришта клиничких случајева бабезиозе оваца се десила на ужем пограничном подручју Босне и Херцеговине са Србијом, Хрватском и Црном Гором. С обзиром на потенцијално присуство илегалног уситњеног транспорта живих животиња између земаља, постоји висок ризик за преношење болести у сусједне државе.

Још један идентификован проблем је употреба имидокарб дипропионата код оваца. Овај препарат је једини регистрован антипротозоарни лијек за говеда и псе и без обзира на учинковитост (Sevinc и сар., 2007), није до краја дефинисана

каренца за месо и млијеко након употребе код оваца. У екстензивним условима држања оваца, сточари често кољу јагњад и овце за личне потребе. Ветеринари углавном препоручују каренцу за овце у складу са препоруком која је дефинисана за говеда. Чак и да је овакав приступ исправан, у условима гдје не постоји контрола клања животиња није могуће контролисати ризик од појаве резидуа имидокарба у месу и млијеку. Овом проблему у будућности треба свакако посветити већу пажњу.

Бабезиоза оваца се у Републици Српској не сузбија по закону - не постоји важећи Правилник, нити постоји обавеза да се ова болест пријављује ресорном Министарству. Ни у земљама Европске уније не постоји редован надзор ове протозоозе оваца, јер се она не налази на листи болести обавезних за пријаву Свјетске организације за здравље животиња (*World Organisation for Animal Health - WOAH*). Међутим, након првих службених доказа ове болести на терену Републике Српске, у новим Правилницима о условима и начину остваривања новчаних подстицаја за развој пољопривреде и села за 2020., 2021. и 2022. годину, PCR дијагностика у циљу потврде бабезиозе је суфинансирана из државног буџета („Службени гласник РС 8/21; 4/22“). Наведена мјера је проистекла из активности везаних за ову докторску дисертацију и нашла је упориште у националним прописима. Излазни резултати ове дисертације су надлежнима указали на значај ове болести и потенцијалне ризике које она носи са собом. У складу са постојећим критеријумима, који се односе на штете проузроковане врстом *B. ovis*, ова болест у Босни и Херцеговини треба да добије већи значај (*Humblet и сар., 2012*).

Малигна бабезиоза оваца је од изузетног националног и регионалног значаја и представља претњу рентабилном узгоју оваца у Босни и Херцеговини. Спроведена „*cost – benefit*“ анализа је указала на економичност и оправданост примјене превентивних мјера. С обзиром на доказану сезоналност клиничке појаве болести и значајно присуство патогена у домаћинима и векторима, потребно је дизајнирати национални систем надзора и контроле према званичним међународним препорукама (*WOAH, 2021a,б*). Опште препоруке дате за бабезиозу говеда, које су од значаја за интернационално ширење болести (*WOAH, 2021в*), могле би се уз одређене модификације користити и за бабезиозу оваца. Није познато зашто Свјетска организација за здравље животиња није укључила бабезиозу оваца на листу болести од значаја. Један од могућих разлога је генерални недостатак епизоотиолошких података и студија о процјени ризика. Зато је потребно спроводити епизоотиолошке студије у регионима који испуњавају услове природног фокуса болести, јер је у тим подручјима могуће одржавање бабезиозе оваца. Без обзира на високу инциденцију клиничке бабезиозе у ензоотским подручјима, непријављивање и непостојање система надзора и редовног регистровања нових случајева болести је главни разлог што се и данас не познају све епизоотиолошке одлике болести (*Ceylan и сар., 2021*). Неопходно је континуирано наставити епизоотиолошке студије и планирани мониторинг ове протозоозе, како би се јасније дефинисале њене размјере и преваленција у популацији оваца на подручју Босне и Херцеговине.

Резултати спроведене епизоотиолошке студије указују на значај сузбијања бабезиозе оваца узроковане врстом *B. ovis* у Републици Српској, што дефинишу и општи наводи Главе 1., Члана 2. и Става 2. Закона о ветеринарству у Републици Српској („Службени гласник Републике Српске 75/17“).

## 7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата добијених епизоотиолошким, клиничким и молекуларним испитивањем патогене хемопротозое *Babesia ovis* на одабраним географским подручјима југоисточне Босне и Херцеговине у периоду од 2019. - 2021. године, изведени су следећи закључци:

1. од осам испитиваних епизоотиолошких јединица на подручју Подриња и Херцеговине (Рудо, Гацко, Билећа, Рогатица, Требиње, Невесиње, Чајниче, Љубиње) клиничка сумња на бабезиозу је постављена код 30,76% стада у којима је утврђено присуство искључиво крпеља врсте *Rhipicephalus bursa* у којима је по први пут доказан налаз врсте *B. ovis*;
2. утврђена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у погледу присуства врсте *B. ovis* између групе оваца млађих од четири мјесеца у односу на групу старости 1-2 године, код оваца на којима су детектовани крпељи у односу на овце које нису биле инфициране крпељима, као и између групе оваца планинске и медитеранске климе, а неповољан клинички исход праћен угинућем утврђен је код 12,28% случајева;
3. микроскопским прегледом крвних размаза клинички сумњивих оваца на акутну бабезиозу пироплазме су установљене у 86,48% узорака, када је утврђен и морфолошки полиморфизам код врсте *B. ovis*, због чега је било неопходно рутински паразитолошки налаз потврдити специфичним PCR тестом;
4. комбиновањем два PCR протокола (*Babesia ovis* или *Babesia/Theileria*) позитиван налаз пироплазмозе је установљен код 98,68% клинички сумњивих оваца и први пут је молекуларно потврђено присуство врсте *B. ovis* код 75% симптоматских (клинички сумњивих) и 11,21% асимптоматски инфицираних оваца у Босни и Херцеговини;
5. молекуларно је потврђено присуство фрагмента ДНК врсте *B. ovis* код 36,46% оваца и 83,33% пулова крпеља из епизоотиолошких јединица Рудо и Билећа;
6. утврђен је значајно већи број асимптоматских оваца PCR позитивних на *B. ovis* у Херцеговини (17,46%) и у групи оваца старости 4-12 мјесеци, као и значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у погледу присуства ДНК *B. ovis* код асимптоматских оваца по епизоотиолошким јединицама (између Рудог у односу на Билећу и Рогатице у односу на Љубиње и Билећу);
7. секвенцирањем је потврђена валидност примјењеног PCR протокола у циљу потврде врсте *B. ovis* у Босни и Херцеговини, а анализом секвенци циљног гена 18S рРНК врсте *B. ovis* из Гацка и Рудог, установљено је груписање са пријављеним врстама овог паразита из Турске, Уганде, Туниса и других земаља Блиског истока;
8. примјеном GIS методологије установљен је образац агрегације жаришта малигне бабезиозе оваца и утврђен је ензоотски фокус ове протозоозе у епизоотиолошкој јединици Рудо, која је епизоотиолошки нестабилно подручје са високим ризиком од појаве клиничких жаришта болести праћених високим леталитетом;
9. малигна бабезиоза оваца представља пријетњу рентабилном узгоју оваца у Босни и Херцеговини и региону. Добијени резултати испитивања и *cost-benefit* анализа су доказали оправданост и

економичност контроле ове болести и примјене оптималних превентивних мјера.

## 8. СПИСАК ЛИТЕРАТУРЕ

1. Abo-Shehada MN, Muwalla MM, Tawfeek F. *Ovine Babesiosis in Jordanian Sheep Mistakenly Diagnosed as Plant Poisoning. Preventive Veterinary Medicine* 1988; 6: 235-238.
2. Ahmed JS, Luo J, Schnittger L, Seitzer U, Jongejan F, Yin H. *Phylogenetic position of small-ruminant infecting piroplasmies', Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1081: 498-504.
3. Aktas M, Altay K, Dumanli N. *Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats. Vet Parasitol.* 2005; 133: 277-81.
4. Aktas M, Altay K, Dumanli N. *Determination of prevalence and risk factors for infection with Babesia ovis in small ruminants from Turkey by polymerase chain reaction. Parasitol Res.* 2007;100: 797-802.
5. Aliu YO, Ødegaard S. *Pharmacokinetics of diminazene in sheep. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1985; 13: 173-184.
6. Andersson MO, Tolf C, Tamba P, Stefanache M, Radbea G, Rubel F, Waldenström J, Dobler G, Chițimia-Dobler L. *Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in ticks infesting animal hosts in Romania. Parasitol Res.* 2017;116: 2291-2297.
7. Angelovski T, Petrović Z, Tomčova D. *Piroplazmoza ovaca u SR Makedoniji. Veterinarski glasnik* 1963; 17: 861-867.
8. Anonimus. *Bosna i Hercegovina u brojevima-2021. 2021a; Agencija za statistiku Bosne i Hercegovine, Sarajevo*
9. Anonimus. *Statistički godišnjak Republike Srpske. 2021b; Republički zavod za statistiku, Banja Luka*
10. Anonimus. *Закон о ветеринарству у Републици Српској "Службени гласник Републике Српске 75/17"*
11. Anonimus. *Правилник о условима и начину остваривања новчаних подстицаја за развој пољопривреде и села „Службени гласник РС 4/22"*
12. Anonimus. *Правилник о обавезном пријављивању и сузбијању пироплазмозе у НР Србији „Службени гласник 25/1955"*.
13. Anonimus. *Правилник о мјерама за сузбијање и искорјењивање бедренице код животиња „Службени гласник Републике Српске 11/95"*
14. Anonimus. *Програм узгоја оваца у Републици Српској за период 2018-2022 „Службени гласник Републике Српске 17/18"*
15. Aouadi A, Leulmi H, Boucheikhchoukh M, Benakhla A, Raoult D, Parola P. *Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (Theileria ovis and Babesia ovis) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 50: 34-39.
16. Arnaudov D, Arnaudov A, Kirin D, Gospodinova S. *Ixodidae ticks of small ruminants in the region of Parvomai, Southern Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2014; 20: 590-594.
17. Azmi K, S Ereqat, A. Nasereddin, A. Al-Jawabreh, G. Baneth, Z. Abdeen. *Molecular detection of Theileria, Babesia, and Hepatozoon spp. in ixodid ticks from Palestine. Ticks Tick. Borne. Dis.* 2016; 7: 734-741.
18. Babeş V. *The etiology of an enzootic disease of sheep, called Cârceag, in Romania., C.R. Hebd. Acad. Sci.* 1892; 115: 359-361.
19. Belloli C, Lai OR, Ormas P, Zizzadoro C, Sasso G, Crescenzo G. *Pharmacokinetics and mammary elimination of imidocarb in sheep and goats. J Dairy Sci.* 2006; 89: 2465-2472.



20. Benedicto B, Ceylan O, Moumouni PFA, Lee SH, Tumwebaze MA, Li J, Galon EM, Liu M, Li Y, Ji S, Ringo A, Rizk M, Sevinc F, Xuan X. *Molecular Detection and Assessment of Risk Factors for Tick-Borne Diseases in Sheep and Goats from Turkey. Acta Parasitol. 2020; 65: 723-732.*
21. Bichev P. *Karchan (piroplasmose) of livestock from region of Varna. Veterinarna Sbirka 1908; 17: 1-3.*
22. Bilgic HB, Bakırcı S, Kose O, Unlu AH, Hacilarlioglu S, Eren H, Weir W, Karagenc T. *Prevalence of tick-borne haemoparasites in small ruminants in Turkey and diagnostic sensitivity of single-PCR and RLB. Parasit Vectors. 2017; 10:211.*
23. Bilgic HB, Hacilarlioglu S, Bakirci S, Kose O, Unlu AH, Aksulu A, Pekagirbas M, Ahmed J, Deschermeier C, Langley G, Karagenc T. *Comparison of protectiveness of recombinant Babesia ovis apical membrane antigen 1 and B. ovis-infected cell line as vaccines against ovine babesiosis. Ticks Tick Borne Dis. 2020; 11: 101280.*
24. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. *Babesiosis of cattle. Parasitology 2004; 129: S247-269.*
25. Bonome A. *Über parasitare Iktero-Haematurie der Schafe, Virchows Archiv fur Pathol. Anat.u Physiolog 1895; 1.*
26. Calder JA, Reddy GR, Chieves L, Courtney CH, Littell R, Livengood JR, Norval RA, Smith G, Dame JB. *Monitoring Babesia bovis infections in cattle by using PCR-based test. J Clin Microbiol 1996; 34: 2748-2755.*
27. Canestrini G, Fanzago F. *Intorno agli Acari Italiani. Antonelli, Venice 1887; 1-140.*
28. Cardamatis J.P. *Des Piroplasmiasis et leishmaniasis. Zbl. Bakt., Abt. I. Orig. 1911;60: 511-523.*
29. Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC. *Presence of potentially pathogenic Babesia sp. for human in Ixodes ricinus in Switzerland. Ann Agric Environ Med. 2006;13: 65-70.*
30. Ceylan O, Sevinc F. *Endemic instability of ovine babesiosis in Turkey: A country-wide sero-epidemiological study. Vet Parasitol. 2020; 278: 109034.*
31. Ceylan O, Xuan X, Sevinc F. *Primary Tick-Borne Protozoan and Rickettsial Infections of Animals in Turkey. Pathogens (Basel, Switzerland) 2021;10: 231.*
32. Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza C, Medina-Naranjo V, Yugcha-Díaz M, Ron-Román J, Martin-Solano S, Gómez-Mendoza G, Saegerman C, Reyna-Bello A. *Detection of Babesia spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions. Pathogens. 2021;10: 1593.*
33. Coleman PG, Perry BD, Woolhouse ME. *Endemic stability-a veterinary idea applied to human public health. Lancet. 2001; 357: 1284-6.*
34. Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Saraña A, Barba-Carretero J.C. *Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe: part I. Epizootiological aspects. Veterinary Parasitology 2003; 113: 189-201.*
35. Cvjetanović V. *Etiologija zajuživanja ovaca. Veterinarski glasnik 1963; 7:605-611.*
36. Ćoralić A, Gabrielli S, Zahirović A, Stojanović NM, Milardi GL, Jažić A, Zuko A, Čamo D, Otašević S. *First molecular detection of Babesia canis in dogs from Bosnia and Herzegovina. Ticks Tick Borne Dis. 2018; 9: 363-368.*
37. Daniel M., J. Kolář, P. Zeman. *GIS tools for tick and tick-borne disease occurrence. Parasitology 2004; 129: 329-352.*
38. Davey RB, Ahrens EH, George JE. *Ovicidal activity of topically applied acaricides against eggs of the southern cattle tick (Acari: Ixodidae). J Econ Entomol. 1989;82: 539-42.*
39. Davey RB, George JE. *Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) infested cattle using different pour-on application treatment regimes. J Med Entomol. 2002;39: 763-769.*

40. Davitkov D, Vucicevic M, Stevanovic J, Krstic V, Slijepcevic D, Glavinic U, Stanimirovic Z. Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitol.* 2016; 61: 337-42.
41. De Meneghi D, Stachurski F, Adakal H. Experiences in Tick Control by Acaricide in the Traditional Cattle Sector in Zambia and Burkina Faso: Possible Environmental and Public Health Implications. *Front Public Health.* 2016; 4 :239.
42. Dschunkovsky E, Urodschevich V. Theileriasis in goats, sheep and cattle with description of *Theileria hirci* n. sp. from Serbia. *Parasitology* 1924; 16:108-110.
43. Duzgun A, Wright IG, Waltisbuhl DJ, Gale KR, Goodger BV, Dargie JD, Alabay M, Cerci H. An ELISA for the diagnosis of *Babesia ovis* infection utilizing a synthetic, *Babesia bovis*-derived antigen. *Vet Parasitol.* 1991; 39: 225-31.
44. Ekici OD, Sevinc F, Isik N. Instability of ovine babesiosis in an endemic area in Turkey. *Vet Parasitol.* 2012; 188: 372-375.
45. Enayati AA, Asgarian F, Sharif M, Boujhmehrani H, Amouei A, Vahedi N, Boudaghi B, Piazak N, Hemingway J. Propetamphos resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2009; 162: 135-141.
46. Ergünay K, Polat C, Özkul A. Vector-borne viruses in Turkey: A systematic review and bibliography. *Antiviral Res.* 2020; 183: 104934.
47. Erster O, Roth A, Wolkomirsky R, Leibovich B, Savitzky I, Shkap V. Transmission of *Babesia ovis* by different *Rhipicephalus bursa* developmental stages and infected blood injection. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016a; 7: 13-19.
48. Erster O, Roth A, Wolkomirsky R, Leibovich B, Savitzky I, Zamir S, Molad T, Shkap V. Quantitative analysis of *Babesia ovis* infection in sheep and ticks. *Vet Parasitol.* 2016b; 221: 39-45.
49. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir-Naghadeh B, Malekinejad H, Jalilzadeh-Amin G, Arjmand J, Golabi M, Hajipour N. Evaluation of antioxidant status, oxidative stress and serum trace mineral levels associated with *Babesia ovis* parasitemia in sheep. *Vet Parasitol.* 2014a; 205: 38-45.
50. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir-Naghadeh B, Mardani K, Jalilzadeh-Amin G, Golabi M, Arjmand J. PCR-Based Detection of *Babesia ovis* in *Rhipicephalus bursa* and Small Ruminants. *J Parasitol Res.* 2014b; 2014:294704.
51. Esmaeilnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S. Investigation of hematological and biochemical parameters in small ruminants naturally infected with *Babesia ovis*. *Vet. Res. Forum* 2012; 3: 31-36.
52. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. 2004a; University of Zaragoza, Spain
53. Estrada-Peña A, Quíez J, Sánchez Acedo C. Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. *Med Vet Entomol.* 2004b; 18: 123-133.
54. Fakhar M, Hajihassani A, Maroufi S, Alizadeh H, Shirzad H, Piri F, Pagheh AS. An epidemiological survey on bovine and ovine babesiosis in Kurdistan Province, western Iran. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44: 319-22.
55. Feider Z, Rauchbach C, Mironescu I. The ticks of Romania. *Ceskosl. Parasit.* 1958; 5: 71 – 87.
56. Ferrer D, Castellà J, Gutiérrez JF. Seroprevalence of *Babesia ovis* in sheep in Catalonia, northeastern Spain. *Vet Parasitol.* 1998; 79: 275-81.
57. Figueroa JV, L'Hostis M, Camus E. Bovine babesiosis. 2010; In: Lefe`vre P-C, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G, eds. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock*

58. Friedhoff KT. Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. *Parassitologia* 1997; 39: 99–110.
59. Galon EM, Ybañez RH, Macalanda AM, Estabillo GR, Montano MTR, Veedor MD, Garvida A, Fabon RJ, Callanta MR, Labutong KJ, Tumwebaze MA, Byamukama B, Ji S, Zafar I, Ybañez A, Xuan X. First Molecular Identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* in Goats from the Philippines. *Pathogens* 2022; 11: 1109.
60. Habela M, Reina D, Nieto C, Navarrete I. Isolation and identification of *Babesia ovis* in Extremadura (Spain). *Veterinary Parasitology*, 1990; 35: 233-238.
61. Habela MA, Reina D, Navarrete I, Redondo E, Hernandez S. Histopathological changes in sheep experimentally infected with *Babesia ovis*. *Veterinary parasitology* 1991; 38: 1-12.
62. Habibi G, E. Sepahvand-Mohammadi, A. Afshari, S. Bozorgi. Molecular detection of *Theileria* spp. and *Babesia ovis* Infection in Sheep in Baneh, Iran. *Arch. Razi Inst.* 2020; 75: 289-296.
63. Hashemi-Fesharki R. Tick-borne diseases of sheep and goats and their related vectors in Iran. *Parassitologia* 1997; 39: 115-117.
64. Hashemi-Fesharki R, Uilenberg G. *Babesia crassa* n.sp. (Sporozoa, Babesiidae) of domestic sheep in Iran. *Vet Q.* 1981; 3: 1-8.
65. Herwaldt BL, Cacciò S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda SB, Piccaluga P, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Löschenberger K, Tura S, Pieniasek NJ. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 942-8.
66. Hodžić A, Alić A, Fuehrer HP, Harl J, Wille-Piazzai W, Duscher GG. A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit Vectors.* 2015; 8: 88.
67. Hornok S, Mester A, Takács N, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Farkas R. Re-emergence of bovine piroplasmiasis in Hungary: has the etiological role of *Babesia divergens* been taken over by *B. major* and *Theileria buffeli*? *Parasit Vectors.* 2014;7:434.
68. Horta S, Barreto MC, Pepe A, Campos J, Oliva A. Highly sensitive method for diagnosis of subclinical *B. ovis* infection., *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5: 902-906.
69. Humblet MF, Vandeputte S, Albert A, Gosset C, Kirschvink N, Haubruge E, Fecher-Bourgeois F, Pastoret PP, Saegerman C. Multidisciplinary and evidence-based method for prioritizing diseases of food-producing animals and zoonoses. *Emerg Infect Dis.* 2012;18: e1.
70. Hurtado A, Barandika JF, Oporto B, Minguijón E, Povedano I, García-Pérez AL. Risks of suffering tick-borne diseases in sheep translocated to a tick infested area: a laboratory approach for the investigation of an outbreak. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6: 31-37.
71. Hutcheon D. Malarial catarrhal fever of sheep. *Veterinary record* 1902; 14: 629-633.
72. Inchiostri H. Vorkomen and Formen "Piroplasmiasis ovis" in Dalmatien. *Osterreichische Wochenschrift fur Tierheilkunde und Revue fur Tierheilkunde und Tierzucht* 1912; 29: 289-292.
73. Ijaz M, Rehman A, Ali MM, Umair M, Khalid S, Mehmood K, Hanif A. Clinico-epidemiology and therapeutical trials on babesiosis in sheep and goats in Lahore, Pakistan. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 2013; 23: 666-669.
74. Iqbal F, M. Fatima, S. Shahnawaz, M. Naeem, R. Shaikh, M. Ali, A. Shaikh, M. Aktas, M. Ali. A study on the determination of risk factors associated with babesiosis and prevalence of *Babesia* sp., by PCR amplification, in small ruminants from Southern Punjab (Pakistan), *Parasite* 2011; 18: 229-234.

75. Iqbal F, Khattak R, Ozubek S, Khattak M, Rasul A, Aktas M. Application of the Reverse Line Blot Assay for the Molecular Detection of Theileria and Babesia sp. in Sheep and Goat Blood Samples from Pakistan. *Iran J Parasitol.* 2013; 8: 289-95.
76. Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK, Morton JM, Stear MJ. Is endemic stability of tick-borne disease in cattle a useful concept?. *Trends in parasitology*, 2012; 28: 85-89.
77. Jurković D. Genska tipizacija krpelja i patogena prenosivih krpeljima na području Republike Hrvatske. 2021; Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Univerziteta u Zagrebu
78. Kage S, Mamatha GS, Lakkundi JN, Shivashankar BP, D'Souza PE. Detection of incidence of Babesia spp. in sheep and goats by parasitological diagnostic techniques. *J Parasit Dis.* 2019; 43: 452-457.
79. Koch U. Einige Klinische Befunde zur Babesia ovis-Infektion des Schafes. 1968; Inaugural Dissertation. Hannover, Tierärztliche Hochschule.
80. Laing G, Aragrande M, Canali M, Savic S, De Meneghi D. Control of Cattle Ticks and Tick-Borne Diseases by Acaricide in Southern Province of Zambia: A Retrospective Evaluation of Animal Health Measures According to Current One Health Concepts. *Front Public Health.* 2018; 6:45.
81. Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Veterinary laboratory medicine.* 2003; 4th. Edn., London, Blackwell Publishing
82. Laveran, Nicolle. Haematozoairen endoglobulaires du mouton, *Comp. rend. de la Soc. de Biologie*, 1899; p. 800.
83. Lempereur L, Beck R, Fonseca I, Marques C, Duarte A, Santos M, Zúquete S, Gomes J, Walder G, Domingos A, Antunes S, Baneth G, Silaghi C, Holman P, Zintl A. Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17: 51-65.
84. Lewis D. Ticks and tick-borne diseases. Part 3: cattle and sheep in Europe. *Livest. Int.*, 1980; 38: 10-11.
85. Mahoney DF, Ross DR. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 1972; 48: 292-298.
86. Mandušić D. Piroplazmoza u srezu Rogatičkom. *Veterinaria* 1953; 2: 401-402.
87. Markoff W.N. Piroplasmose und andere blut parasitare Krankheiten der Haustiere am Balkan *Arh. Schiffs Trop. Hyg* 1916; 14: 313-335.
88. Martinod S., Gilot BJ. Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Experimental & Applied Acarology* 1991; 11: 215-222.
89. Mehlhorn H, Schumacher B, Jatzlau A, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Klimpel S, Pohle H. Efficacy of deltamethrin (Butox® 7.5 pour on) against nymphs and adults of ticks (*Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus*) in treated hair of cattle and sheep. *Parasitol Res.* 2011; 108: 963-71.
90. Mekuli E. Prilog poznavanju piroplazmoza domaćih životinja na Kosovu i Metohiji, Doktorski rad, 1959; Fakultet veterinarska medicine Univerzitet u Beogradu
91. Miaoulis MV. Co-existence du charbon bacteridien et de la babesiellose ovine. *Rec. Med. Vet.* 1931; 107: 463-464.
92. Mihalca AD, Cozma V, Suteu E, Marinculic A, Boireau P. The quest for piroplasms: from Babes and Smith to molecules, *Sci Parasitol* 2010; 11: 14 -19.
93. Mikačić D. Piroplasmose in Yugoslavia. *Bulletin de Off. International des Epizooties* 1952; 38: 570-592.
94. Milić D. Ein Beitrag der Kenntnis der Veränderungen in Blut und den Geweben bei den an der Pyroplasmose erkrankten schafen. *Acta Vet. Beograd* 1964; 14: 227-238.

95. Mira A, Unlu AH, Bilgic HB, Bakirci S, Hacilarlioglu S, Karagenc T, Carletti T, Weir W, Shiels B, Shkap V, Aktas M, Florin-Christensen M, Schnittger L. High genetic diversity and differentiation of the *Babesia ovis* population in Turkey. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 67 Suppl. 2: 26-35.
96. Mlinac F. Deset godina veterinarskog, epizootiološkog i higijenskog rada u Južnoj Srbiji. *Jugoslovenski veterinarski glasnik.* 1937; 10: 399 - 402.
97. Morel N, Mastropaolo M, de Echaide ST, Signorini ML, Mangold AJ. Risks of cattle babesiosis (*Babesia bovis*) outbreaks in a semi-arid region of Argentina. *Prev Vet Med.* 2019; 170: 104747.
98. Motas S.C. Sur le rôle des tiques dans le développement de la piroplasmose ovine (Cârceag). [On the role of ticks in the development of ovine piroplasmosis] [in French]. *C.R. Soc. Biol.* 1903; 15: 501-503.
99. Nagore D, García-Sanmartín J, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 1059-1067.
100. Nenadić M. Akaprin u profilaksi piroplazmoze ovaca. *Veterinaria* 1964; 13: 129-130.
101. Omeragić J, Šerić-Haračić S, Klarić Soldo D, Kapo N, Fejzić N, Škapur V, Medlock J. Distribution of ticks in Bosnia and Herzegovina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2022; 13:101870.
102. Ozkuc U. Studies in the serological diagnosis of *Babesia ovis* infection in sheep by the fluorescent antibody technique. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Enst. Derg.* 1979; 11: 70-83.
103. Ozubek S, Aktas M. Molecular and parasitological survey of ovine piroplasmosis, including the first report of *Theileria annulata* (Apicomplexa: Theileridae) in sheep and goats from Turkey. *J. Med. Entomol.* 2017; 54: 212-220.
104. Papadopoulos B, Perié NM, Uilenberg G. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece. 1. Serological cross-reactions. *Vet Parasitol.* 1996; 63:41-56.
105. Passos LM, Bell-Sakyi L, Brown CG. Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Vet Parasitol.* 1998; 76: 239-49.
106. Peregrine AS, Mamman M. Pharmacology of diminazene: a review. *Acta tropica* 1993; 54: 185-203.
107. Petrović K. Prilog poznavanju piroplazmoze u N.R Srbiji. *Veterinarski glasnik* 1958; 7: 502-507.
108. Purnell RE. Babesiosis in various host. In: M. Ristic and J.P. Kreier (Editors), *Babesiosis.* Academic Press, New York 1981; 25-63.
109. Rahbari S, Nabian S, Khaki Z, Alidadi N, Ashrafi HJ. Clinical, haematologic and pathologic aspects of experimental ovine babesiosis in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2008; 9: 59-64.
110. Ranjbar-Bahadori S, Eckert B, Omidian Z, Shirazi NS, Shayan P. . *Babesia ovis* as the main causative agent of sheep babesiosis in Iran. *Parasitology Research* 2011; 110: 1531-1536.
111. Rashid A, Khan JA, Khan MS, Rasheed K, Maqbool A, Iqbal J. Prevalence and chemotherapy of babesiosis among Lohi sheep in the Livestock Experiment Station, Qadirabad, Pakistan, and environs. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases,* 2010; 16: 587-591.
112. Ray HN, Raghavachari K. Observations on *Babesia foliata* n.sp. from a sheep. *Ind J Vet Sci* 1941; 11: 239-242.

113. Razmi G, Pourhosseini M, Yaghfour S, Rashidi A, Seidabadi M. Molecular detection of *Theileria* spp. and *Babesia* spp. in sheep and ixodid ticks from the northeast of Iran. *J Parasitol.* 2013; 99: 77-81.
114. Renneker S, Abdo J, Bakheit MA, Kullmann B, Beyer D, Ahmed J, Seitzer U. Coinfection of sheep with *Anaplasma*, *Theileria* and *Babesia* species in the Kurdistan Region, Iraq. *Transbound. Emerg. Dis.* 2013; 60: 113-118.
115. Rjeibi MR, Darghouth MA, Gharbi M. Prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in Tunisian sheep. *Onderstepoort J Vet Res.* 2016; 83: a1040.
116. Ros-García A, Barandika JF, García-Pérez AL, Juste RA, Hurtado A. Assessment of exposure to piroplasms in sheep grazing in communal mountain pastures by using a multiplex DNA bead-based suspension array. *Parasites & vectors* 2013; 6: 277.
117. Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Nakamura I, Sugimoto C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. *Parasitol Res.* 2010; 106: 493-8.
118. Sarwar SM. A hitherto undescribed piroplasm of goats (*Piroplasma taylori*). *Indian J. Vet. Sci.*, 1935; 5: 171-175.
119. Savini G, Conte A, Semproni G, Scaramozzino P. Tick-borne diseases in ruminants of Central and Southern Italy: epidemiology and case reports. *Parassitologia.* 1999; Supl 41: 1-95.
120. Sayin F, Dincer S, Karaer Z, Cakmak A, Yukari BA, Eren H, Deger S, Nalbantoglu S. Status of the tick-borne diseases in sheep and goats in Turkey. *Parassitologia* 1997; 39: 153-156.
121. Schnittger L, Yin H, Qi B, Gubbels MJ, Beyer D, Niemann S, Jongejan F, Ahmed JS. Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting. *Parasitol Res.* 2004; 92: 189-196.
122. Sevinc F, Sevinc M, Koc Y, Alkan F, Derinbay O, Yildiz, Aydogdu U. The effect of 12 successive blood passages on the virulence of *Babesia ovis* in splenectomized lambs: A preliminary study. *Small Ruminant Research* 2014; 116: 66-70.
123. Sevinc F, Sevinc M, Ekici OD, Yildiz R, Isik N, Aydogdu U. *Babesia ovis* infections: Detailed clinical and laboratory observations in the pre- and post-treatment periods of 97 field cases. *Vet. Parasitol.* 2013;191: 35-43.
124. Sevinc F, Turgut K, Sevinc M, Ekici OD, Coskun A, Koc Y, Erol M, Ica A. Therapeutic and prophylactic efficacy of imidocarb dipropionate on experimental *Babesia ovis* infection of lambs. *Vet Parasitol.* 2007; 149: 65-71.
125. Sevinc F, Zhou M, Cao S, Ceylan O, Aydin MF, Sevinc M, Xuan X. Haemoparasitic agents associated with ovine babesiosis: A possible negative interaction between *Babesia ovis* and *Theileria ovis*. *Vet. Parasitol.* 2018; 252: 143-147.
126. Shayan P, Hooshmand E, Nabian S, Rahbari S. Biometrical and genetical characterization of large *Babesia ovis* in Iran. *Parasitol Res* 2008; 103: 217-221.
127. Smith RD. Epidemiology of babesiosis. In *Malaria and Babesiosis. Research Findings and Control Measures.* M. Ristic, P. Ambroise-Thomas & J.P. Kreier. 1984; 207-232.
128. Smith RD. *Veterinary Clinical Epidemiology: From Patient to Population.* 2019; p.272;
129. Songer JG, Meer RR. Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals, *Anaerobe* 1996; 2: 197-203.
130. Soulsby E JL. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*, 7th edn. London, 1982; 706-728.

131. Starcovici C. *Bemerkungen uber den durch Babes entdeckten Blutparasitet und die durch denselben hervorgebrachten Kraknkenheiten, die seuchenhafte Haemoglobinurie des Rindes (Babes) und Carceag der Schafe (Babes)*. Zbl. Bakt.I.Abt. 1893; 14: 1-8.
132. Stevanović O, Jurković D, Polkinghorne A, Čeleš A, Ilić T, Dimitrijević S, Nedić D, Beck R. *Molecular detection of Babesia divergens and Mycoplasma wenyonii infection in cattle from Bosnia And Herzegovina*. Parasitol Res. 2020; 119: 1423-1427.
133. Stuen S. *Haemoparasites in small ruminants in European countries: Challenges and clinical relevance*. Small Ruminant Research 2016; 142: 22-27.
134. Sudarić F., Matuka S. *Patoanatomski nalaz kod tzv. zajuživanja ovaca i koza*. Veterinaria 1975; 24: 397-401.
135. Suleimanov SA. *Development and morphology of Babesia ovis (Babes, 1892) in the blood of the invertebrate host*. Estest. Nauki 1976; 2: 84-86.
136. Šterk V. *Izveštaj o radu veterinarog odeljenja higijenskog zavoda u Skoplju za 1938 godinu*. Jugoslavski veterinarski glasnik 1938; 11: 259-264.
137. Tavassoli M, Tabatabaei M, Nejad B, Tabatabaei M, Najafabadi A, Pourseyed S. *Detection of Theileria annulata by the PCR-RFLP in ticks (Acari, Ixodidae) collected from cattle in West and North-West Iran*. Acta Parasitologica 2011; 56: 8-13.
138. Theodoropoulos G, Gazouli M, Ikonomopoulos JA, Kantzoura V, Kominakis A. *Determination of prevalence and risk factors of infection with Babesia in small ruminants from Greece by polymerase chain reaction amplification.*, Vet. Parasitol. 2006; 135: 99-104.
139. Tomašević T. *Prilog poznavanju piroplazmoza domaćih životinja i faune krpelja Crne Gore*. Doktorski rad, 1961; Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu
140. Traynor IM, Thompson CS, Armstrong L, Fodey T, Danaher M, Jordan K, Kennedy DG, Crooks SR. *Determination of imidocarb residues in bovine and ovine liver and milk by immunobiosensor*. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2013; 30: 1108-1114.
141. Tumwebaze MA, Byamukama B, Tayebwa D S, Byaruhanga J, Angwe MK, Galon E M, Liu M, Lee SH, Ringo AE, Adjou Moumouni P F, Li J, Li Y, Ji S, Vudriko P, Xuan X. *First Molecular Detection of Babesia ovis, Theileria spp., Anaplasma spp., and Ehrlichia ruminantium in Goats from Western Uganda*. Pathogens (Basel, Switzerland) 2020; 9: 895.
142. Turgut K. *Veterinary Clinic Laboratory Diagnosis*. 2000; 2nd ed. Bahcivanlar, Konya
143. Uilenberg G. *Babesia - a historical overview*. Vet. Parasitol.2006; 138: 3-10.
144. Wall DT. *Global importance of piroplasmiasis*. The Journal of Protozoology Research 2000; 10: 106-127.
145. Wang G, Villafuerte P, Zhuge J, Visintainer P, Wormser GP. *Comparison of a quantitative PCR assay with peripheral blood smear examination for detection and quantitation of Babesia microti infection in humans*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 82: 109-13.
146. Wenyon CM. *Protozoology*. 1926; Bailliere, Tindall and Cox, London
147. WOAHA Manual. *Bovine babesiosis*. Chapter 11.2; 2022e;
148. WOAHA Manual. *Criteria for the inclusion of diseases, infections and infestations in the OIE list*, Chapter 1.2; 2022a;
149. WOAHA Manual. *Surveillance for arthropod vectors of animal diseases*. Chapter 1.5; 2022f;
150. Yeruham I, Hadani A, Galker, F. *Some epizootiological and clinical aspects of ovine babesiosis caused by Babesia ovis—a review*. Veterinary parasitology 1998a; 74: 153-163.

151. Yeruham I, Hadani A, Gafker F, Rosen SH, Schlien J. A field study of haemoparasites in two flocks of sheep in Israel. *Isr. J. Vet. Med.* 1992; 47: 107-111.
152. Yeruham I, Hadani A, Galker F, Avidar Y, Bogin E. Clinical, clinico-pathological and serological studies of *Babesia ovis* in experimentally infected sheep. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 1998b; 45: 385-394.
153. Yeruham I, Hadani A, Galker F, Rosen S. A study of an enzootic focus of sheep babesiosis (*Babesia ovis*, Babes, 1892). *Vet Parasitol.* 1995; 60: 349-354.
154. Yin H, Leonhard S, Luo J, Seitzer U, Ahmed JS. Ovine theileriosis in China: a new look at an old story. *Parasitol Res.* 2007; 101: 191-195.
155. Zeman P, Vítková V, Markvart K. Společný výskyt klístové encefalitidy a lymeské borreliózy na území Stredočeského kraje [Simultaneous occurrence of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in the Central Bohemian Region]. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 1990; 39: 95-100.
156. Ziapour SP, Kheiri S, Fazeli-Dinan M, Sahraei-Rostami F, Mohammadpour RA, Aarabi M, Asgarian F, Sarafrazi M, Nikookar SH, Enayati A. Susceptibility status of field populations of *Rhipicephalus bursa* (Acari: Ixodidae) to pyrethroid insecticides. *Trop Biomed.* 2016; 33: 446-461.
157. Župančič I, Cvetnić S, Madić J. Slučajevi hronični piroplazmoze (babezioze) ovaca. *Praxis veterinaria* 1981; 29: 407- 410.



## БИОГРАФИЈА АУТОРА

Оливер (Ненад) Стевановић је рођен 13.07.1989. године у Теслићу, Република Српска, Босна и Херцеговина. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписао је 2008/2009. године, а дипломирао је школске 2012/2013. године са просечном оценом 9.42. За вријеме основних студија је неколико пута награђиван од стране Факултета као један од најбољих студената. Докторске академске студије уписао је 2014. године на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Прекинуо је докторске студије 2017. године, па поново наставио 2020. године. Од 2014-2018. године био је запослен као Стручни сарадник Лабораторије за клиничку бактериологију, микологију и паразитологију ЈУ Ветеринарског института Републике Српске „Др Васо Бутозан” Бања Лука. Од 2018-2020. ради као Ветеринар у Ветеринарској амбуланти „БЛ вет” Бања Лука, а од 2020. је руководилац Лабораторије за заразне болести и епизоотиолог ЈУ Ветеринарског института Републике Српске „Др Васо Бутозан”, Бања Лука. Добитник је Захвалнице за развој епизоотиолошке службе, испитивање и контролу болести плавог језика од ЈУ Ветеринарског института „Др Васо Бутозан” Бања Лука 2017. године и добитник Плакете за развој ветеринарске службе Републике Српске 2020. године. На захтјев Министарства, Републичке и општинске ветеринарске инспекције, као и надлежних ветеринарских организација од 2014. године је активно спроводио епизоотиолошке увиђаје због појаве заразних и паразитских болести у Републици Српској. Вршио је едукације ветеринара испред Ветеринарске коморе Републике Српске из области клиничке паразитологије и епизоотиологије. Активно је едуковао сточаре на територији Републике Српске о заразним и паразитским болестима. Објавио је 44 научна рада у националним и међународним часописима. У међународним часописима је објавио 24 рада. На платформи *GoogleScholar* је цитиран 189 пута (датум увида 17.12.2022 године). Ожењен је, отац једног дјетета. Са породицом живи у Бијељини, Република Српска (Босна и Херцеговина).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Оливер Стевановић

број уписа 2020/5010

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**„Епизоотиолошко, клиничко и молекуларно испитивање бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* (Babes, 1892) у југоисточном региону Босне и Херцеговине“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 22.12.2022.

Оливер Стевановић



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Оливер Стевановић

Број уписа: 2020/5010

Студијски програм: Ветеринарска медицина

Наслов рада: Епизоотиолошко, клиничко и молекуларно испитивање бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* (Babes, 1892) у југоисточном региону Босне и Херцеговине

Ментор

1. Проф др Тамара Илић;
2. Проф др Драго Недић

Потписани

Оливер Стевановић

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 22.12.2022.

Потпис докторанда



### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

**Епизоотиолошко, клиничко и молекуларно испитивање бабезиозе оваца узроковане врстом *Babesia ovis* (Babes, 1892) у југоисточном региону Босне и Херцеговине**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 22.12.2022.

Потпис докторанда



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