

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Марко Љ. Пајић

**Оксидативни стрес код товних пилића
инфицираних врстама паразита рода
Eimeria након примене кокцидиостатика**

Докторска дисертација

Београд, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Marko Lj. Pajić

**Oxidative stress in broiler chickens infected
with *Eimeria* species following the
administration of coccidiostatic drugs**

PhD Thesis

Belgrade, 2019

Ментори:

Др Невенка Алексић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Др Милена Радаковић, научни сарадник

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Чланови комисије:

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине

Универзитета у Београду

Др Душица Остојић Андрић, научни сарадник

Институт за сточарство Београд-Земун

Др Владимир Полачек, виши научни сарадник

Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“

Датум одбране: _____

Београд

Израду ове докторске дисертације финансирало је Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру научноистраживачких пројеката бр. ИИИ 46002 „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“, којим руководи професор др Зоран Станимировић и бр. ТР 31071 „Истраживање фармаколошких карактеристика антимикуробних агенаса, увођење нових технолошких решења и алтернативних метода профилаксе с циљем да се побољша контрола инфективних обољења домаћих животиња“, којим руководи др Дубравка Миланов, виши научни сарадник.

Овај рад посвећујем својој породици.

Оксидативни стрес код товних пилића инфицираних врстама паразита рода *Eimeria* након примене кокцидиостатика

Кратак садржај

Упркос великом напретку менаџмента, технологије, исхране и терапије, кокцидоза и даље представља једну од најзначајнијих болести у интензивном живинарству. Установљено је да код ове инфекције пилића долази до значајне промене параметара оксидативног стреса, који настаје услед дисбаланса између продукције слободних кисеоничних врста (reactive oxygen species, ROS) и антиоксиданата. Циљеви овог истраживања били су: 1) испитивање утицаја два различита типа антикокцидијских супстанци (робенидин и Хербакокс) на оксидативни стрес код товних пилића инфицираних врстама рода *Eimeria*, 2) детерминација врста *Eimeria* које паразитирају код бројлерских пилића применом молекуларногенетичких техника (PCR), 3) установити раширеност супклиничке инфекције на фармама бројлерских пилића, и 4) установити да ли постоји узрочно последична веза између примењених мера биосигурности на фармама и појаве супклиничких и клиничких инфекција кокцидијама.

Како би се испитао ефекат кокцидиостатика на оксидативни статус товних пилића, формиране је пет група: две нетретиране (неинфицирана и инфицирана) и три третиране антикокцидијским адитивима (инфициране *Eimeria* spp.). Једна од третираних група пилића је добијала синтетски кокцидиостатик робенидин (Ро), друга биљни - хербакокс (Херб), а трећа комбинцију робенидина и хербакокса (Ро+Херб). Све инфициране групе су у узрасту од 14 дана инфициране ооцистама кокцидија (мешана инфекција). Крв је узоркована 12, 21. и 40. дана и одређиване су активности каталазе (CAT), супероксид дисмутазе (SOD), глутатион-С-трансферазе (GST) и концентрације производа липидне пероксидације – малон-диалдехида (MDA). Мерен је и број ооциста у граму фецеса, телесна маса пилића и степен конверзије хране (FCR). Применом PCR технике детерминисане су врсте *Eimeria* које паразитирају код бројлерских пилића. Подаци о биосигурносним мерама су добијени

помоћу упитника који је попуњаван у време сакупљања узорака фецеса на фармама бројлера.

Активности CAT и GST, као и ниво MDA били су смањени, а активност SOD повећана код третираних група пилића у односу на нетретираних инфицираних, што показује да антикокцидијске супстанце могу да смање оксидативни стрес. Најизраженије промене параметара оксидативног стреса забележене су у Po+Херб групи. Код пилића третираних антикокцидијским супстанцама телесна маса је била значајно виша, а FCR и број ооциста у граму фецеса значајно мањи у односу на инфициране нетретираних пилиће. Број ооциста је био мањи код Po и Po+Херб групе у односу на Херб групу. Ово показује да су синтетски кокцидиостатик и комбинација оба дали бољи ефекат у превенцији кокцидиозе од биљног, али је доказано да се и овај може користити у спречавању појаве кокцидиозе. На 59% испитиваних фарми бројлерских пилића установљена је присуство ооциста кокцидија. Инфекција је била супклиничка на 51% прегледаних фарми, а клинички испољена на 8%. PCR методом детерминисане су четири врсте *Eimeria*: *E. acervulina* (37%), *E. maxima* (17%), *E. mitis* (25%) и *E. tenella* (48%). Спроведене мере дезинфекције, дезинсекције и дератизације, као и све наведене биосигурносне мере заједно могу значајно утицати на превенцију кокцидиозе.

Кључне речи: товни пилићи, оксидативни стрес, *Eimeria*, синтетски кокцидиостатик, биљни кокцидиостатик.

Научна област: Ветеринарска медицина.

Ужа научна област: Болести живине.

УДК број: 619:616.995.1:636.5

Oxidative stress in broiler chickens infected with *Eimeria* species following the administration of coccidiostatic drugs

Abstract

Despite remarkable advances in management, technology, diet and therapy, coccidiosis remains one of the major diseases in intensive poultry production. It has been detected that in chickens infected with coccidia significant changes in the parameters of oxidative stress develop, which is a consequence of a disbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants. The aims of this research were: 1) investigation into the influence of two different types of anticoccidials (robenidine and Herbakoks) on the oxidative stress in broiler chickens infected with *Eimeria*, 2) determination of *Eimeria* species which parasitize broiler chickens with molecular techniques (PCR), 3) assessment of the prevalence of sub-clinical infection on broiler farms, and 4) detection of possible association between biosecurity measures on chicken farms and the emergence of sub-clinical and clinical coccidial infections.

To assess the effect of anticoccidials on fattening chickens, five experimental groups were established: two untreated (uninfected and infected) and three treated with anticoccidials (all infected with *Eimeria* spp.). One of the treated groups was administered robenidine (Ro), the second the herbal anticoccidial Herbakoks (Herb), and the third one - the combination of robenidine and Herbakoks (Ro+Herb). All infected groups were inoculated orally with *Eimeria* oocysts (mixed infection) on day 14 after hatching. The blood was sampled on days 12, 21 and 40 and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST) and the concentration of the product of lipid peroxidation - malondialdehyde (MDA) - determined. The number of oocysts per gram of faeces, chicken body weight and feed conversion ratio (FCR) were also measured. *Eimeria* species detected in broiler chickens were determined using PCR assay. The data on biosecurity measures were obtained in a questionnaire which was filled in when the faeces samples were collected on broiler farms.

The activities of CAT and GST, as well as the level of MDA decreased, but the activity of SOD increased in treated groups of chickens in comparison with untreated infected, which suggests that the anticoccidials may decrease the oxidative stress. The most notable changes in the parameters of oxidative stress were detected in the Ro+Herb group. The body weight of chickens treated with anticoccidials was significantly higher, and their FCR and oocyst counts significantly lower in comparison with the uninfected untreated chickens. Oocyst counts were lower in Ro and Ro+Herb group in comparison with Herb group. These results suggest that synthetic anticoccidial drug and the combination of the two lead to better effect in coccidiosis prevention than the herbal one, but was proven that it can also be used in coccidiosis prevention. On 59% broiler farms *Eimeria* oocysts were detected. The infection was sub-clinical on 51% of farms monitored, and clinical on 8%. PCR technique detected four *Eimeria* species: *E. acervulina* (37%), *E. maxima* (17%), *E. mitis* (25%) and *E. tenella* (48%). The imposed measures of disinfection, disinsection and rodent control, as well as all biosecurity measures considered together may significantly influence the prevention of coccidiosis.

Key words: broiler chickens, oxidative stress, *Eimeria*, synthetic anticoccidial drug, herbal anticoccidial drug.

Field of science: Veterinary medicine.

Narrow field of science: Poultry diseases.

UDK number: 619:616.995.1:636.5

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
2.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1.	Преваленција кокцидиозе товних пилића у свету	3
2.2.	Животни циклус <i>Eimeria</i>	9
2.3.	Врсте <i>Eimeria</i> патогене за домаћу кокош	11
2.3.1.	<i>Eimeria acervulina</i>	13
2.3.2.	<i>Eimeria brunetti</i>	14
2.3.3.	<i>Eimeria maxima</i>	15
2.3.4.	<i>Eimeria mitis</i>	16
2.3.5.	<i>Eimeria necatrix</i>	16
2.3.6.	<i>Eimeria praecox</i>	17
2.3.7.	<i>Eimeria tenella</i>	17
2.4.	Методe дијагностике кокцидиозе	21
2.5.	Интеракција између домаћина и паразита	24
2.6.	Актуелни методи контроле и превенције кокцидиозе	24
2.6.1.	Кокцидиостатици	25
2.6.1.1.	Програм ротације	26
2.6.1.2.	„Shuttle“ програм	26
2.6.2.	Фитобиотици	27
2.6.3.	Вакцинација	27
2.7.	Оксидативни стрес и ROS	28
2.8.	Липидна пероксидација	30
2.9.	Ензими антиоксидативне заштите	32
3.	ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	34
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
4.1.	Материјал	35
4.1.1.	Кокцидиостатици	37
4.1.2.	Инфективни материјал	37
4.2.	Методe	38
4.2.1.	Бројање и изолација ооциста <i>Eimeria</i>	38
4.2.2.	Детекција методом ланчане реакције полимеразе (Standard PCR)	40
4.2.3.	Одређивање параметара оксидативног стреса	44
4.2.3.1.	Одређивање активности супероксид дисмутазе	44
4.2.3.2.	Одређивање активности каталазе	44
4.2.3.3.	Одређивање активности глутатион-С-трансферазе	45
4.2.3.4.	Одређивање концентрације малон-диалдехида	45
4.2.4.	Праћење производних перформанси	46

4.2.5.	Процена биосигурносних мера на фармама	46
4.2.6.	Статистичка анализа	46
5.	РЕЗУЛТАТИ	48
5.1.	Параметри оксидативног стреса	48
5.1.1.	Активност SOD	48
5.1.2.	Активност CAT	50
5.1.3.	Активност GST	52
5.1.4.	Концентрација MDA	54
5.2.	Степен конверзије хране (Feed conversion ratio)	56
5.3.	Број ооциста кокцидија	57
5.4.	Детерминација врста <i>Eimeria</i>	61
5.5.	Преваленција субклиничке кокцидиозе	64
5.6.	Веза између примењених биосигурносних мера на фармама и појаве субклиничких и клиничких инфекција кокцидијама	65
6.	ДИСКУСИЈА	68
6.1.	Ефекти кокцидиостатика на параметре оксидативног стреса	68
6.1.1.	Утицај на активност SOD	68
6.1.2.	Утицај на активност CAT	69
6.1.3.	Утицај на активност GST	70
6.1.4.	Утицај на концентрацију MDA	71
6.1.5.	Општа запажања о параметрима оксидативног стреса током трајања огледа	72
6.2.	Утицај кокцидиостатика на производне параметре	73
6.3.	Детерминација врста <i>Eimeria</i> и преваленција субклиничке кокцидиозе	74
6.4.	Биосигурносне мере на фармама и њихов утицај на појаву кокцидиозе	82
7.	ЗАКЉУЧЦИ	84
8.	ЛИТЕРАТУРА	86

1. УВОД

Живинарска производња се из године у годину веома брзо развија на светском нивоу. Према литературним подацима она се утростручила у протеклих двадесет година, а број домаће живине се процењује на више од 23 милијарде. Живинско месо и јаја заузимају важан удео у свакодневној исхрани људи широм света, поготово у руралним и сиромашним крајевима. Производња се процењује на око 1,1 билион јаја и на око 122,5 милиона тона пилећег меса сваке године. Предвиђа се да ће се експанзија наставити најмање наредних тридесет година, при чему највећи раст производње имају Африка и Азија. У савременој живинарској производњи неопходна је примена квалитетних биосигурносних мера на фармама, квалитетне контроле патогена, добре произвођачке праксе и хемопрофилактике.

Упркос великом напретку менаџмента, технологије, исхране и терапије, кокцидоза и даље представља једну од најзначајнијих болести у живинарској производњи. Проузрокована је протозоама из рода *Eimeria*, које паразитирају у дигестивном тракту пилића. То су интрацелуларни паразити, који доводе до оштећења слузнице дигестивног тракта, дијареје, отежане ресорпције хранљивих материја и смањења прираста. Отварају врата инфекције другим патогенима и изазивају висок морталитет. У живинарницима са лошим мерама биосигурности могућа је смртност и до 100%, ако се не предузму одговарајуће мере. Узрочник се преноси механички преко обуће радника, опреме, простирке и контаминиране хране и воде. Већина инфекција товних пилића имају субклинички карактер, али увек постоји могућност појаве болести са комплетном клиничком сликом. Да би се превенирала инфекција, бројлерима се у првих 35 дана тога дају кокцидиостатици у храни.

Истраживањима је установљено да код инфекције пилића ејмеријама долази до значајне промене параметара оксидативног стреса, који настаје услед дисбаланса између продукције слободних кисеоничних радикала (eng. reactive oxygen species, ROS) и антиоксиданата. ROS су веома нестабилни и спонтано реагују са различитим

органиским материјама. Главно место њиховог деловања јесу липиди мембрана, сулфхидрилне везе протеина и ДНК. Појачано стварање ROS могу изазвати негативни спољашњи чиниоци као што су метаболити различитих токсичних једињена и лекова, јонизујуће зрачење, повећана концентрација кисеоника и дејство различитих патогена. У случајевима када дође до неконтролисаног стварања ROS, њихова концентрација може превазићи одбрамбени капацитет ћелије, када настаје оксидативни стрес. Примарни систем заштите од ROS представља група реактивних антиоксидативних ензима у које спадају супероксид дисмутаза (SOD) и каталаза (CAT), који представљају прву линију одбране против ROS. Антиоксидативни заштитни систем развио се током еволуције код свих аеробних организама, како би се спречила, ограничила или поправила оштећења настала деловањем ROS.

Потреба за испитивањем оксидативног стреса код товних пилића појавила се када је установљено да код инфекције кокцидијама долази до прекомерног стварања и накупљања ROS у ћелији. Штетан утицај ROS на ћелију у виду оштећења протеина, липида и ДНК доводи до смањења енергетске ефикасности и смрти ћелије, оштећена ткива и органа. На тај начин се огледа и штетни ефекат у виду смањења броја ентероцита, а самим тим и смањења прираста и искористљивости хране код бројлерских пилића. Ово доводи до великих губитака у производњи, који нису видљиви уколико није дошло до појаве клиничке слике кокцидиозе.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Преваленција кокцидиозе товних пилића у свету

У савременој живинарској производњи један од главних здравствених и економских проблема јесте кокцидиоза. Она првенствено погађа јата бројлерских пилића, код којих се губици у свету на годишњем нивоу процењују на 2,3 милијарде евра (De Gussem, 2007), а према подацима из 2014. године чак и до 3 милијарде америчких долара (Dalloul и Lillehoj, 2006; Blake и Tomley, 2014). Кокцидиоза је обољење које се јавља и на одгојним фармама кока носиља са подним системом узгајања. С обзиром на значајност кокцидиозе и последице које изазива код живине, неопходно је у току производње превенирати појаву инфекције у јату. Према неким ауторима најбољи метод превенције је вакцинација (Price и сар., 2016; Blake и сар., 2017), али ради се само код родитељских јата пошто је врло скупа. Вакцинација је увек циљана, јер нема унакрсног имунитета између различитих врста *Eimeria*. Поред вакцинације у превентивне сврхе користе се и кокцидиостатици додати у храну (Charman и сар., 2010; Mohiti-Asli и Ghanaatparast-Rashti, 2015). Овај метод даје добре резултате само ако се ради редовна ротација, односно примена различитих кокцидиостатика (Charman, 2007), да не би дошло до појаве резистенције (Peek, 2010). Све су присутнија истраживања у правцу доказивања субклиничких инфекција, како би се она правовремено дијагностиковала и примениле одговарајуће мере (Razmi и Kalideri, 2000; Haug и сар., 2008; Sun и сар., 2009; Györke и сар., 2013; Cicek и сар., 2016).

Примена молекуларних техника у дијагностици кокцидиозе постаје све значајнија у последњој деценији (Kumar и сар., 2014; Khaier и сар., 2015; Peek и сар., 2017). Поред тога користе се и усавршавају и традиционалне методе дијагностике (Carvalho и сар., 2011).

У испитивањима која су спровели Sun и сарадници (2009), у Кини (покрајина Шандунг) на 76 бројлерских фарми, установили су велику раширеност субклиничке кокцидиозе (65,8%). Изабране су фарме са лошим биосигурносним мерама, за које се

знало да су имале честих проблема са кокцидиозом. На свим фармама као простирка користио се песак, а густина насељености је била 10-15 пилића по m². На овим фармама никада није вршена вакцинација. Методом PCR установљена је преваленција субклиничке кокцидиозе од 65,8%. *E. tenella* и *E. praecox* су најдоминантније врсте које су пронађене, а поред њих заступљене су биле *E. acervulina*, *E. maxima* и *E. mitis*. На већини фарми на којима је доказана субклиничка кокцидиоза у етиологији је учествовало више врста *Eimeria*, понекад и седам (Sun и сар., 2009).

У Турској су Güven и сарадници (2013) спровели истраживање у које је било укључено 1110 бројлерских јата, пореклом са 817 фарми (око 12% свих бројлерских фарми у Турској). Сва јата су добијала кокцидиостатик у храни у једном периоду това. Ооцисте кокцидија су доказане у 56,2% јата. На основу морфолошких и морфометријских анализа пронашли су ооцисте сличне *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* и *E. tenella* у сваком позитивном узорку. Коришћењем молекуларних техника пронашли су ооцисте *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox*, *E. tenella* (класичан PCR) и *E. mitis*, *E. brunetti* (nested PCR). Ооцисте *E. necatrix* нису пронађене молекуларним методама. Ово је било прво истраживање овог типа у Турској (Güven и сар., 2013).

У истраживању спроведеном на 45 фарми товних пилића у Индији и 139 фарми у Египту, Либији и Великој Британији, узорковали су фецес у већ припремљене епрувете са калијум дихроматом (2%). Узорковано је од 3 до 5 епрувета по објекту и водило се рачуна да се узорковање обави из свих делова објекта (кретање у објекту у облику слова „W“). Након узорковања, узорци су допремани у лабораторију на 4°C. Ооцисте су бројали у Мекмастер комори. За морфолошку идентификацију кокцидија користили су софтвер „COCCIMORPH“, за који су користили најмање 50 фотографија појединачних спорулисаних ооциста из сваког узорка, на увеличању 400x. За изолацију ДНК користили су узорке у којима су нашли минимум 500 ооциста по граму (Индија) и 200 ооциста по граму (Египат, Либија, Велика Британија). Користили су прајмере за седам најчешћих врста *Eimeria* и радили су nested PCR и две врсте multiplex PCR. Преваленција *Eimeria* је износила

71,9% на 139 фарми (Египат, Либија и Велика Британија), а 82,2% на 45 фарми (Индија) (Kumar и сар., 2014).

У Индији је спроведено истраживање на 375 узорака црева пилића, пореклом са шест подручја. Идентификација кокцидија вршена је на основу предилекционог места, тј. на основу дела црева у ком су пронађене, као и на основу морфологије и величине ооциста. Код 112 узорака (29,9%) утврђено је присуство ооциста. Подаци су показали да се кокцидиоза јавља најчешће у јесен, па затим у лето, пролеће и зиму (Ahad и сар., 2015). Према подацима других аутора (Sharma и сар., 2015) који су прегледали 720 узорака фецеса пореклом са фарми са екстензивним и интензивним начином узгоја, преваленција кокцидија је износила 39,58%. Морфолошком идентификацијом пронађено је 5 врста ејмерија, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. acervulina* и *E. mitis*. *E. tenella* је била најзаступљенија врста. Код екстензивног начина узгоја преваленција је износила 53,61%, а код интензивног 25,55% (Sharma и сар., 2015).

У Аустралији контрола кокцидиозе укључује превентивну хемотерапију користећи кокцидиостатике у храни, живе атенуиране вакцине или рекомбинантне вакцине (Godwin и Morgan, 2015). У истраживању које су спровели Godwin и Morgan (2015) покушали су да докажу које врсте кокцидија су присутне у комерцијалној производњи, а које у производњи са испустима („free range“). Укупно су прегледали 260 узорака фецеса из различитих делова Аустралије. Узорци су били пореклом са бројлерских фарми и фарми са испустом, пореклом од здравих пилића. Ооцисте су бројали у Мекмастер комори, а узорке за ДНК анализу су чували у 2% калијум дихромату. Кокцидије су доказане у 98% бројлерских фарми и 81% фарми са испустом. Код бројлерских фарми најдоминантније врсте биле су *E. acervulina* (67%), *E. maxima* (58%) и *E. mitis* (46%), а код фарми са испустом *E. mitis* (54%) и *E. acervulina* (28%) (Godwin и Morgan, 2015).

У Ирану је спроведено неколико истраживања о преваленцији ејмерија. Gharekhanі и сарадници (2014) су на 220 бројлерских фарми узорковали по 5 узорака фецеса и по 5 пилића. Узорци фецеса су узимани у близини хранилица и појилица. Узимани су и подаци о: старости пилића (<4, 4-6, >6 недеља), раси, појави

дизентерије, колибацилози, клостридиози, коришћењу кокцидиостатика, локацији фарме, власнику, адреси. Жртвовани пилићи су обдуковани, прављени су размази са слузнице црева како би се пронашли асексуални развојни облици кокцидија. За претрагу фецеса користили су модификовану Мекмастер методу, са флотацијским раствором који садржи шећер. Пронађене ооцисте су стављане у 2,5% калијум дихромат на собну температуру, како би спорулисале. Тај процес трајао је најдуже до 2 недеље. Врсте *Eimeria* су одређене на основу морфолошке анализе ооциста. Праћени су следећи параметри: облик, боја, микропиле и присуство или одсуство резидалног телашца. Преваленција кокцидија је била 31,8%, а доминирале су *E. acervulina* (75,7%), *E. tenella* (54,3%), *E. necatrix* (28,6%) и *E. maxima* (20,0%). Број ооциста кретао се од 110 до 1800. Мешане инфекције су уочене на свим позитивним фармама (Gharekhani и сар., 2014). Друга група аутора (Arabkhazaeli и сар., 2011) су спровели истраживање у које је било укључено 50 узорака (38 узорака црева пилића и 12 узорака простирке). Узето је по 5 пилића са сваке фарме, од којих су узоркована црева. Позитивно је било 15 од 50 узорака (30%). Шест позитивних узорака су били пореклом из простирке. Диференцијација врсте *Eimeria* је вршена мерењем величине ооциста и на основу њиховог облика, а пронађене су *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. tenella* и *E. necatrix* (Arabkhazaeli и сар., 2011). Nadipour и сарадници (2013) спровели су истраживање на 20 газдинстава, на којима је узорковано по 10 пилића случајним избором. Након општег клиничког прегледа издвојених пилића, они су жртвовани и отворен им је дигестивни тракт. Урађена је процена степена лезија на слузници црева, узиман је и скарификат са сваког дела црева како би се на основу места паразитирања идентификовала врста *Eimeria*. Извршена је и морфолошка диференцијација *Eimeria* на основу величине, облика и боје након спорулације. Коначна идентификација заснивала се на степену патолошких лезија, које су биле проузроковане ооцистама у том делу црева. Од укупно 200 узорака, њих 128 (64%) су били позитивни на кокцидиозу. Детектоване су *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix* и *E. maxima*. *E. tenella* је била најдоминантнија (24%), затим *E. acervulina* (18%), па *E. necatrix* (12%) и *E. maxima* (10%). Дошли су до

закључка да присуство субклиничке инфекције у јату највише зависи од мера биосигурности, а мање од броја једники у јату (Nadipour и сар., 2013).

Meireles и сарадници (2004) су у Бразилу спровели истраживање на фармама бројлерских пилића, прикупили су 156 узорака фецеса, који су чувани у 2,5% калијум дихромату и транспортовани у лабораторију. Користили су 10 g фецеса за центрифугирање како би се узорак пречистио и ооците припремиле за изолацију ДНК. Методом PCR су установили да је 70 узорака позитивно на *E. praecox* и 45 на *E. mitis* (Meireles и сар., 2004). Друга група аутора спровела је истраживање у ком су поредили традиционане методе дијагностике кокцидиозе и молекуларне методе. Узимали су узорке са бројлерских фарми, од сваког јата по један збирни узорак фецеса. Из сваког јата случајним избором узети су од 2 до 4 пилета, који су жртвовани, да би се урадила процена лезија на цревима. Узорци фецеса су филтрирани кроз сита, како би се пречистили и онда су остављани у 2,5% калијум дихромату, 7 дана, на собној температури, како би спорулисали. За морфолошку идентификацију користили су фотографије 100 ооцита усликаних из позитивних узорака, којима су уз помоћ софтвера Image-Pro Express 6,0 мерили дужину, ширину и облик. Радиле су и молекуларну дијагностику уз помоћ PCR методе. Применом комбинације ових метода установили су присуство *Eimeria praecox* и *Eimeria maxima* код 100% јата, а преваленција осталих врста је износила: *Eimeria mitis* и *Eimeria necatrix* (93,3%), *Eimeria tenella* (76,7%), *Eimeria acervulina* (56,7%) и *Eimeria brunetti* (16,7%). Користећи само методу оцене лезија (lesion scoring) установили су присуство *E. maxima* код 46,7% фарми, *E. acervulina* код 30%, *E. tenella* код 23,3% и *E. necatrix* код 10%, а *E. brunetti* и *E. praecox* нису идентификоване овом методом. У морфолошкој анализи ооциста установљено је присуство *E. brunetti* и *E. tenella* код 100% узорака, а *E. acervulina* код 63,3%. Дошли су до закључка да се применом молекуларних метода лакше може пратити кретање кокцидија у популацији живине на неком подручју, а и омогућавају бржу и сигурнију дијагностику субклиничких инфекција (Carvalho и сар., 2011).

Како би се доказало присуство кокцидија у јатима бројлерских пилића у истраживању спроведеном у Румунији, прикупљани су узорци са 12 бројлерских

фарми, које су одабране случајним избором. Подељене су у три категорије: мале, средње и велике. На свим фармама коришћени су кокцидиостатици у храни. Са једанаест фарми су узимали узорке од по два јата, а на дванаестој само од једног јата. Укупно је било 23 узорка, пореклом од 23 јата. Узраст пилића је био од 20 до 35 дана. Узорци фецеса су узимани у количини 250g, а узорковано је уз појилице и хранилице. Претрага фецеса је урађена методом флотације. Ооците су пречишћене из узорака и чуване у 2,5% калијум дихромату за молекуларну дијагностику. Кокцидије су пронађене у 91% узорака. Четири врсте *Eimeria* су идентификоване: *E. acervulina* (91%), *E. tenella* (61%), *E. maxima* (22%) и *E. praecox* (13%) (Györke и сар., 2013).

Група аутора из Етиопије је проучавала присуство различитих врста *Eimeria* код пилића који се држе у селима, у слободним испустима, и дошла је до закључка да се ооците налазе у 56% узорака. Сви пилићи од којих су узимани узорци фецеса били су клинички здрави, без икаквих симптома кокцидиозе. Дијагностику *Eimeria* радили су методом флотације и PCR (Luu и сар., 2013). Према подацима других аутора из 2015. године преваленција кокцидиозе је износила 20,1%. Од укупно прегледаних 384 узорка фецеса, 77 узорака је било позитивно (Negash и сар., 2015). У истраживању спроведеном од стране Adamu (2015) укупна преваленција кокцидиозе на 100 фарми у Етиопији је износила 60%. Појава субклиничке кокцидиозе је утврђена код 80% случајева. Идентификовано је шест врста ејмерија, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* и *E. tenella*. *E. tenella* је била доминантна са 28,3% (Adamu, 2015).

Према подацима Ola-Fadunsin (2017) у Нигерији је у десетогодишњем испитивању забележена укупна преваленција кокцидија од 41,3%. Највише је изолована код бројлерских јата (Ola-Fadunsin, 2017).

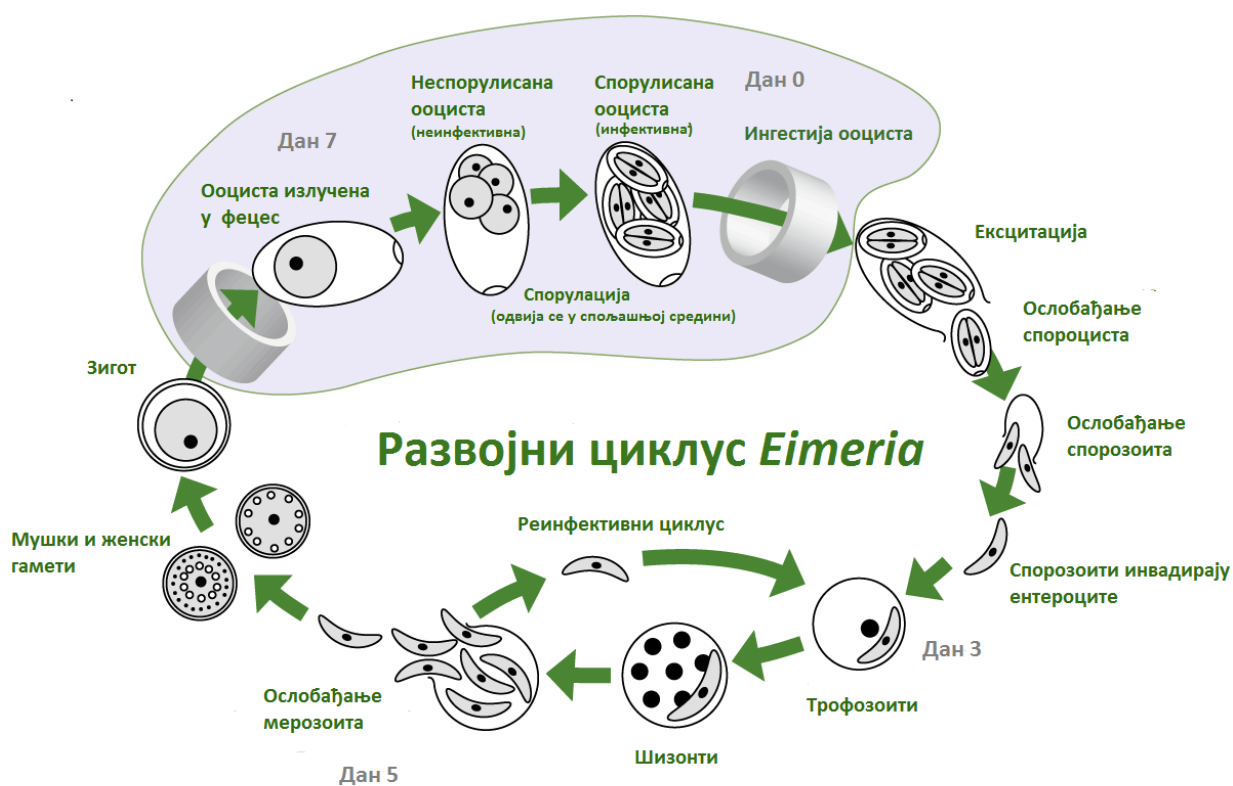
У истраживању спроведеном у Канади доказано је да се применом молекуларних техника може установити преваленција кокцидија. *E. tenella* је изолована код 2,5% узорака, *E. maxima* код 1,38% узорака, *E. acervulina* код 0,27%, *E. maxima* и *E. tenella* заједно код 1,38% (Ogedengbe и сар., 2011).

Посматрајући горе наведене податке може се закључити да је правовремена дијагностика субклиничке кокцидиозе у јату веома важна, јер нам може помоћи око избора и промене кокцидиостатика у храни, као и око индиректне провере мера биосигурности на фармама и фармског менаџмента. Традиционалне методе дијагностике (копролошке, морфолошке, степен процена лезија) нису увек довољне, већ се најчешће дијагноза мора потврдити и неком од молекуларних техника.

2.2. Животни циклус *Eimeria*

Протозое рода *Eimeria* имају сложен животни циклус који се састоји од развоја унутар организма домаћина и развоја у спољашњој средини (Слика 1). Циклус развоја је моноксеничан (одвија се у ћелијама једног домаћина) и може се поделити на асексуалну и сексуалну фазу. Развојни циклус почиње од неспорулисаних ооциста који се излучују у животну средину преко фецеса заражених животиња (Tewari и Maharana, 2011). Ооцисте имају дебелу структуру зида (Слика 2), прилагођене су преживљавању изван домаћина. Уколико постоје адекватни услови у спољашњој средини (топлота, кисеоник и влага), ооцисте спорулишу и постају инфективне (Allen и Fetterer, 2002; Williams, 1998). Спорулисане ооцисте могу остати инфективне и преживети у спољашњој средини релативно дуг период. Асексуална фаза (шизогонија) почиње након ингестије инфективних ооциста од стране новог домаћина, зид ооциста се под утицајем желудачне киселине и жучних соли оштећује и пуца. Ослобађају се спороцисте и спорозоити, који постају способни да инвадирају слузницу дигестивног тракта (McDougald, 1998). У цревном епителу се развијају шизонти, који пролазе кроз најмање две асексуалне деобе. Касније генерације шизоната, које се формирају у ламини проприи, доводе до већине оштећења цревног епитела, узрокујући различите степене дигестивних поремећаја, губитак течности и крви, губитак телесне тежине и повећану осетљивост на друге болести (Rose и сар., 1996; McDougald, 1998; Cornelissen и сар., 2009). Сазревањем шизоната настају мерозоити. Прскањем зрелих шизоната ослобађају се мерозоити, који инвадирају нове епителне ћелије. Сексуална фаза размножавања (спорогонија) започиње када се из мерозоиота развију гаметоците. Из микрогаметоцита у епителним ћелијама настаје

велики број микрогамета, а из макрогаметоцита настаје један макрогамет. Спајањем ових развојних облика настаје зигот. Сазревањем зигота настају ооцисте, које се касније излучују фецесом, након чега је следећи животни циклус спреман за почетак (Oladiran и сар., 2010). Развојни циклус различитих врста *Eimeria* патогених за живину је углавном сличан. Разлике су у дужини препатентног периода (време од ингестије инфективне ооцисте до тренутка када животиња домаћин почиње фецесом излучивати ооцисте у спољну средину), броју циклуса шизогоније, локализације унутар црева, броја ооциста и дужине њиховог излучивања (Табела 1) (Swinkels, 2008, 2009).



Слика 1. Развојни циклус *Eimeria*

(<https://www.impextraco.com/products/enhancing-animals/xtra-performance-xp-anticoccidials/coccidialsolution>)

Табела 1. Тракање препатентног периода и лезије настале после експерименталне инфекције пилића лаке линије различитим врстама *Eimeria* (Al-Gawad и сар., 2012)

Врста <i>Eimeria</i>	Препатентни период (h)	Клинички знаци (дан након инфекције)	Пост мортем лезије	Лезије
<i>E. mitis</i>	100	Смањење телесне масе од 5. дана	4. дан	Благи ентеристис у средишњем делу црева (+1)
<i>E. acervulina</i>	100	Смањење телесне масе од 5. дана	5. дан	На дуоденуму некротичне лезије беле боје (+1 до +3)
<i>E. maxima</i>	120	Смањење телесне масе од 5. дана	4. дан	Благи ентеристис у средишњем делу црева (+1)
<i>E. tenella</i>	120	Од 3. дана тешка депресија, опуштена крила, пролив бео до крвав, без угинућа	4. дан	Лезије од 4. дана, запаљење цекума у распону од благог до крвавог (+2 до +4)
<i>E. necatrix</i>	168	Од 4. дана тешка анемија, опуштена крила, крвава дијареја	4. дан	Крвави ентеристис у средишњем делу црева, лезије (+2 до +3)

2.3. Врсте *Eimeria* патогене за домаћу кокош

Кокцидиоза је болест домаће кокоши (*Gallus gallus domesticus*), која је одговорна за највеће економске губитке у узгоју (Peek и Landman, 2011). Узочник је протозоални паразит из филума (кола) *Apicomplexa*, класе *Coccidia*, реда *Eucoccidia*, фамилије *Eimeriidae*, рода *Eimeria*. Седам врста кокцидија су патогене за домаћу кокош (*Gallus gallus domesticus*): *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. mitis* и *E. praecox* (Long и сар., 1976; Saif и сар., 2008; Prakashbabu и сар., 2017). *E. brunetti*, *E. necatrix* и *E. tenella* су повезани са хеморагичном кокцидиозом и могу бити високо патогени (Табела 2), са високим морбидитетом и морталитетом (Long и сар., 1976).

Табела 2. Патогеност *Eimeria* spp. које паразитирају код пилића (Hafez, 2008)

Врсте <i>Eimeria</i>	Место паразитирања	Патогеност
<i>E. acervulina</i>	Дуоденум, јејунум	++
<i>E. brunetti</i>	Илеум, ректум	+++
<i>E. maxima</i>	Дуоденум, јејунум, илеум	++
<i>E. mitis</i>	Дуоденум, јејунум	+
<i>E. necatrix</i>	Јејунум, цекум	+++
<i>E. praecox</i>	Дуоденум, јејунум	+
<i>E. tenella</i>	Цекум	+++

* – апатогена; + слабо патогена; ++ умерено патогена; +++ веома патогена

Најчешћи начин преношења кокцидија је механички, од стране радника који се крећу између објеката и по дворишту фарме. Кокцидијалне инфекције углавном зависе од броја ооциста које су ингестиране и од имунолошког статуса пилића (Saif и сар., 2008). Ооцисте у простирци или фецесу бројлерских пилића су најприсутније од 3 до 5 недеље старости, након чега њихов број опада. Мали број ооциста је уочен након пражњења фарме, јер их убија амонијак или температура компостирања простирке и измета. Свеобухватна природа кокцидија искључује могућност елиминације или спречавања појаве кокцидиозе карантинном, дезинфекцијом или санитацијом (Saif и сар., 2008). Шематски приказ грађе ооцисте *Eimeria* је приказан на Слици 2.



Слика 2. Шематски приказ грађе ооцисте *Eimeria* (Eckert и сар., 1995)

2.3.1. *Eimeria acervulina* Tyzzer, 1929

Домаћин кокцидије врсте *Eimeria acervulina* је *Gallus gallus domesticus* (домаћа кокош). Ооцисте су овалног облика и при крајевима су уже. Просечна величина ооциста је 18,3 x 14,6 μm , а могу бити 17,7–20,2 x 13,7–16,3 μm (Табела 3) (Saif и сар., 2008). Спорулација се завршава за 24 сата на собној температури (Pellerdy, 1974).

Ендогена фаза развоја је локализована у епителним ћелијама предњих партија танких црева, али код масовне инфекције могуће је да се локализују и у задњим сегментима црева (Шема 1). Спорозоити продиру кроз врхове цревних ресица и пролазе до једра споменутих ћелија или до ламине проприје (Pellerdy, 1974).

Промене су најизраженије у дуоденалној петљи и могу се проширити на сегменте црева иза њега. Tyzzer (1929) их је чак уочио у ректуму и цекумима. Мерозоити који се ослобађају током шизогоније не мигрирају далеко, већ више нападају оближње ћелије, што доводи до грубо видљивих сиво-белих поља на цревној слузокожи. Касније се поља попут тачака спајају у облике дугих попречних

лествичастих лезија које садрже многе сексуалне стадијуме и развијају ооцисте. Лезије сличне лествици углавном се виде ако је инфекција средње тешка. Садржај црева је пастозан и катаралан, а понекад постоји обимна вазодилатација и црвенило слузокоже. Десквамација епитела је ретка (Pellerdy, 1974).

2.3.2. *Eimeria brunetti* Levine, 1942

Ооцисте *E. brunetti* су просечне величине 24,6 x 18,8 μm и лако се могу помешати са ооцистама *E. tenella*. Ова врста кокцидија првенствено паразитира у доњем делу танког црева, обично у близини споја цекума (Шема 1). У тешким случајевима, лезије се могу проширити од желуца до клоаке и проширити се на цекуме (Saif и сар., 2008). Након завршетка фазе развоја унутар домаћина и изbacивања ооциста фецесом, спорулација у спољашњој средини се завршава за 24-48 сати на 30°C (Pellerdy, 1974).

E. brunetti може довести до умереног морталитета, губитка телесне масе, лоше конверзије хране и других компликација. Блаже инфекције са *E. brunetti* могу изазвати смањење телесне масе и лошу конверзију хране, иако лезије на цревима нису јасно видљиве. Инокулација са $1-2 \times 10^5$ ооциста често узрокује морталитет од 10% до 30% (Saif и сар., 2008). У раним стадијумима инфекције, слузокожа задњег дела танких црева може бити покривена ситним петехијалним крварењима и задебљана, са присутним воденастим садржајем. Код тешких инфекција, слузница је оштећена, појављује се некроза слузнице 5-7 дана након инфекције и казеозне ерозије на површини целе слузнице. Коагулисана крв и делови слузнице су присутни у фецесу. Шести дан након инфекције је изражено задебљање и едем слузокоже. Асексуални стадијуми шизогоније прве и друге генерације се јављају у горњим партијама танких црева. Мерозоити нападају епителиум и развијају се у сексуалне стадијуме у задњем делу танког црева и цекума. У тешким случајевима, ресице могу бити потпуно уништене (Saif и сар., 2008).

2.3.3. *Eimeria maxima* Tyzzer, 1929

Средњи део танког црева често је место паразитирања *E. maxima*, од доње дуоденалне петље до средњег дела (Шема 1), али код тешких инфекција, лезије могу да се протежу целом дужином танких црева. *E. maxima* је лако препознатљива врста коју карактеришу велике ооците 30,5 x 20,7 μm , које обично имају препознатљиву жућкасту боју (Табела 3). Често је присутно обиље жућкасто-наранцасте слузи и течности у средњем делу танких црева (Saif и сар., 2008).

E. maxima је умерено до високо патогена. Инфекција са 50-200 x 10³ ооциста узрокују слабији прираст, повећан морбидитет, дијареју, а понекад и угинућа. Од симптома уочавају се још накомтрешено перје и анорексија. Један од неповољних ефеката субклиничке инфекције са *E. maxima* је утицај на апсорпцију ксантофила и каротеноидних пигмената у танком цреву, што може довести до промене у боји коже пилића (Saif и сар., 2008).

Минимално оштећење ткива се јавља у прва два асексуална циклуса, који се одвијају у површним епителним ћелијама слузокоже. Када се обави сексуална фаза развоја у дубљим слојевима слузокоже, 5-8 дана после инфекције, лезије се развијају због конгестије и едема, ћелијске инфилтрације и задебљања слузнице. Инфициране ћелије домаћина постају увећане, померене до субепитијалне зоне. Микроскопске хеморагије се јављају у близини врхова цревних ресица, а жаришта инфекције се могу видети на серози. Црева могу бити истањена и испуњена течношћу, а лумен често садржи жуту или наранцасту слуз и крв. Ово стање је описано као „балонирање" или „балонирајући ефекат“. Патолошке промене на микроскопском нивоу карактерише едем и ћелијска инфилтрација, шизонти се развијају до 4. дана, а макрогамети и микрогамети се развијају у дубљим слојевима слузокоже 5-8 дана. Код тешких инфекција долази до озбиљнијих промена на слузокожи (Saif и сар., 2008).

2.3.4. *Eimeria mitis* Tyzzer, 1929

Задње партије танког црева су место паразитирања ове врсте ејмерија, од дивертикулума жуманчане вреће до цекума (Шема 1). Лезије нису карактеристичне, али утицај на смањење телесног прираста и морбидитет је описан. Ооците су димензија 16,2 x 16,0 μm , имају сверичан изглед (Табела 3) (Saif и сар., 2008).

Инфекција са $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ ооцита ће узроковати смањење телесне тежине, повећан морбидитет и губитак пигментације коже код товних пилића. Код кока носиља ова врста може утицати на производњу јаја и може индуковати митарење. Танка црева изгледају бледо и истањено, а микроскопским прегледом скарификата са слузнице уочавају се бројне ооците (Saif и сар., 2008).

2.3.5. *Eimeria necatrix* Johnson, 1930

Због стварања препознатљивих лезија у танком цреву, ова врста је била једна од најпознатијих од стране првих узгајивача живине. Локализација лезија у танком цреву је слична као код *E. maxima* (Шема 1). Вероватно због ниске репродуктивне способности *E. necatrix* није у могућности да парира другим кокцидијама и дијагностикује се углавном код старијих пилића као што су одгој родитеља тешке линије и одогој кока носиља од 9. до 14. недеље. Црева су често дилатирана за два пута више од своје природне величине („балонирање“), а лумен је најчешће испуњен крвљу и течним садржајем у коме су крпице ткива слузнице, мерозонти, шизонти. Ооците су овоидног облика, 20,4 x 17,2 μm , што је приближно величини ооциста *E. tenella* (Табела 3). Интересантно је да се ооците налазе само у цекумима, а у танким цревима се налазе лезије. Гаметоцити се развијају у цекумима, и најчешће су расуте по слузници. *E. necatrix* ствара мали број ооциста (Saif и сар., 2008). На цревној слузници жаришта инфекције могу се видети као мале беле плоче или црвене петехије. Код угинулих пилића ове лезије изгледају беле и црне, што изгледом подсећа на “со и бибер”. На размазима направљеним 4-5 дана после инфекције под микроскопом се уочавају шизонти. Шизонти продиру дубоко у слузокожу, могу у субмукози оштетити слојеве глатких мишића и крвне судове. Код оваквих случајева,

жаришта су довољно велика да се јасно уочавају са серозне површине. Лезије се могу проширити од желуца до споја илеума и цекума код тешких инфекција (Saif и сар., 2008).

E. necatrix и *E. tenella* су највише патогене од свих кокцидија живине. Инфекција са 10^4 - 10^5 ооциста довољна је да узрокује озбиљан губитак телесне тежине, повећан морбидитет и морталитет. Пилићи који преболе заостају, подложни су секундарним инфекцијама и могу изгубити пигментацију. Измет заражених пилића најчешће садржи крв, течност и слуз. Природне инфекције проузрокују смртност чак и више од 25% у комерцијалним јатима (Saif и сар., 2008).

2.3.6. *Eimeria praecox* Johnson, 1930

Ова врста је због кратког препатентног периода (око 83 сата) названа „превремени“ или „рани“ паразит. Ооцисте се препознају лако јер су углавном веће од других врста пронађених у дуоденуму. Оне су димензија 21,3 x 17,1 μm (Pellerdy, 1974) и веће су од *E. acervulina*, *E. mivati* и *E. mitis*, а мање од *E. maxima*. Тешке инфекције проузрокују смањење телесне тежине, губитак пигментације, дехидратацију и лошу конверзију хране. У цревима је присутан воденаст садржај, а понекад и слуз са крпицама ткива. Већина инфекција су ограничене на дуоденалну петљу (Шема 1). Ситна тачкаста крварења могу се видети на површини слузнице 4-5 дана након инфекције. Епителне ћелије на цревним ресицама су најчешће захваћене инфекцијом. У свакој ћелији може бити неколико паразита. Три до четири асексуалне генерације су нормалне у фази развоја, а затим фаза гаметогоније. Инфекције са овом врстом ејмерија узрокују слабу реакцију ткива (Saif и сар., 2008).

2.3.7. *Eimeria tenella* (Railliet and Lucet, 1891)

E. tenella је најпознатија кокцидија код живине, због лако препознатљивих лезија и великих губитака које узрокује у савременом тову пилића и одгоју кока носиља. Ова врста паразитира у цекумима, узрокује тешку болест коју карактерише крварење, висок морбидитет и морталитет, губитак телесне масе, изнуреност, губитак пигментације коже и друге знаке (Шема 1). Ооцисте су овалне, у просеку 22,0 x 19,0









µm (Табела 3) (Saif и сар., 2008). Експериментална инокулација са 10^4 или више спорулираних ооциста може изазвати морбидитет, морталитет и значајно смањење телесне тежине. Инокулација 10^3 ооциста је довољна да изазове крваву дијареју и други знаке инфекције. Најпатогенија је друга генерација шизоната, која сазрева 4 дана након инфекције. Слично као код *E. necatrix*, ова врста производи шизонте који могу садржавати стотине мерозоиота. Шизонти се развијају дубоко у ламини проприји, тако да су слузокожа и крвни судови иницирани и захваћени. Настанак морталитета у јату је брз. Већина угинућа се јавља између 5. и 6. дана после инфекције. Максималан утицај на смањење прираста види се 7 дана после инфекције (Saif и сар., 2008).

Шизонти прве генерације сазревају 2-3 дана након инфекције. Током њиховог сазревања виде се мала поља оштећене слузнице. Четири дана након инфекције развија се друга генерација шизоната у ламини проприи. Њихово сазревање праћено је великим оштећењем ткива, крварењем, поремећајем илеоцекалних тонзила и оштећењем слузнице и мишићног слоја. Мала жаришта, крварења и некрозе се појављују у близини крвних судова унутрашњег мишићног слоја зида цекума. Цекуми се могу знатно увећати и проширити лумен, у којем се налази садржај крви и делови ткива слузнице. Инфекција се обично може видети као тамне петехије и жаришта на серози цекума. Зид цекума је често у великој мери задебљао због едема и инфилтрације. Зреле ооцисте се ослобађају у лумен у великом броју 6. и 7. дана након инфекције. Код лакших инфекција регенерација епитела слузокоже и илеоцекалних тонзила може бити потпуна 10. дана након инфекције, а код тежих инфекција епител слузнице се никад не може у потпуности опоравити (Saif и сар., 2008).

Табела 3. Место паразитирања и морфолошке карактеристике појединих врста *Eimeria* (Al-Gawad и сар., 2012)

Вста <i>Eimeria</i>	Место лезије	Постмортем лезије	Облик	Величина ооциста (µm)	Време спорулације
<i>E. acervulina</i>	Duodenum	Попречне беличасте траке на дуоденуму	Овалан	18,2-14,1	17 сати
<i>E. maxima</i>	Peum	Задебљање зида црева, петехије	Овалан	29,9-23,8	30 сати
<i>E. mitis</i>	Peum	Слуз, ентеритис	Овалан	17,8-14,1	18 сати
<i>E. necatrix</i>	Peum	Испуњеност црева гасовима, слузав и крвав ексудат	Дугуљаст, овалан	20,1-16,9	18 сати
<i>E. tenella</i>	Caecum	Крварења и згрушана крв у цекумима	Овалан	21,3-17,9	18 сати

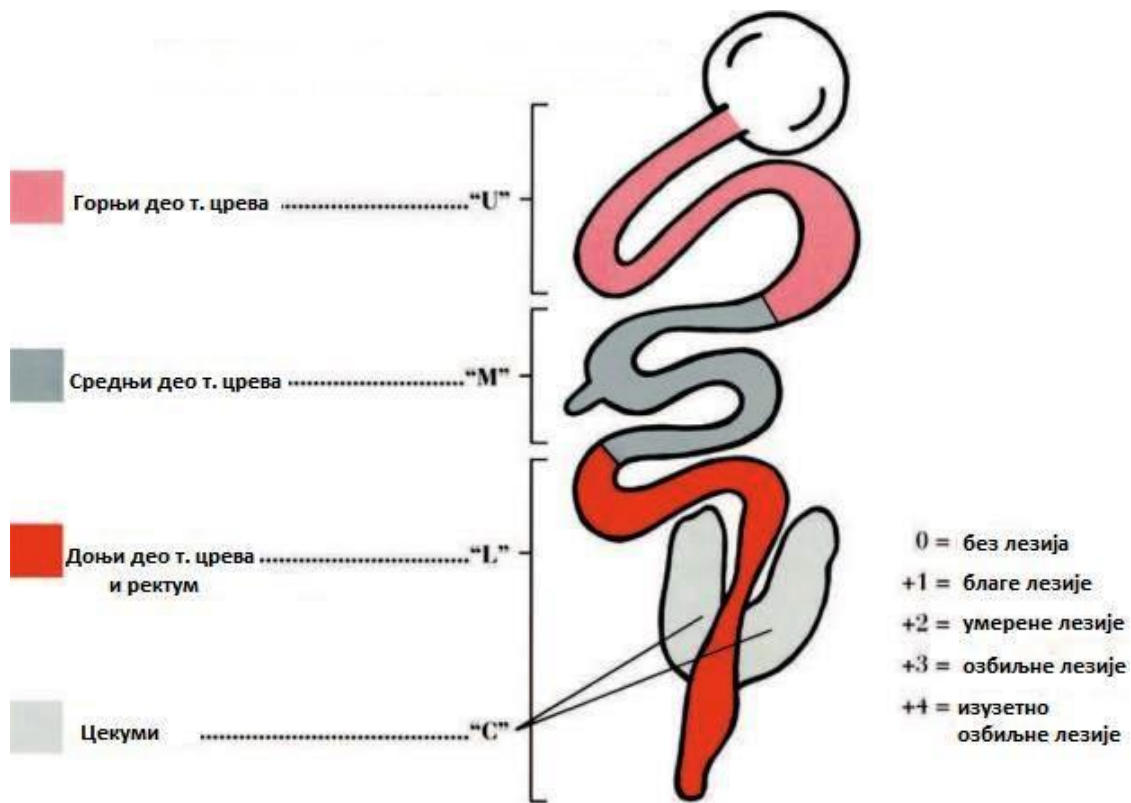
Шема 1. Место паразитирања појединих врста *Eimeria* и промене на слузници које изазивају (Conway и McKenzie, 2007)

<p><i>E. acervulina</i></p> 	<p><i>E. brunetti</i></p> 	<p><i>E. maxima</i></p> 	<p><i>E. mivati</i></p> 
<p>Беличасте округле лезије пругасто поређане, задебљање зида црева</p>	<p>Коагулациона некроза слузнице, крвави ентеритис у доњем делу танких црева</p>	<p>Задебљање зида црева, слуз, крвави ексудат, петехије</p>	<p>Задебљање зида црева, груписане ооцисте</p>
<p><i>E. mitis</i></p> 	<p><i>E. necatrix</i></p> 	<p><i>E. praecox</i></p> 	<p><i>E. tenella</i></p> 
<p>Без дискретних лезија, слузав ексудат у цревима</p>	<p>Балонирајући ефекат, беличасте мрље, петехије, слуз, крвав ексудат</p>	<p>Без лезија, слузави ексудат</p>	<p>Крварења у лумену црева, задебљање зида, беличаста слузница, накупине згрушане крви</p>

2.4. Методе дијагностике кокцидиозе

Због великог броја излучених ооциста, једна од најчешће коришћених метода дијагностике кокцидиозе је утврђивање присуства ооциста у фецесу живине. Степен (озбиљност) инфекције се процењује израчунавањем оптималног броја ооциста излучених у фецесу (Charman и Rayavaguru, 2007). Једна од најчешће коришћених метода у ову сврху је метода по Мекмастеру (Haug и сар., 2006; You, 2014). Врсте *Eimeria* могу се разликовати на основу величине и облика ооциста, али се ова метода сматра непоузданом јер њихова величина варира и могу се преклапати код инфекција узрокованих са више врста кокцидија (Long и Joiner, 1984). Поред ових метода, могу се користити и савремене молекуларне методе детекције, као на пример метода ланчане реакције полимеразе (PCR). Ова метода се примењује у дијагностици многих обољења животиња (Blake и сар., 2008; Davitkov и сар., 2016). Помоћу PCR-а могуће је идентификовати изоловане ооцисте *Eimeria* уз помоћ њиховог генетског кода (Kumar и сар., 2014). Један од недостатака PCR методе је тај да је неопходно претходно пречистити ооцисте изоловане из фецеса (Swinkels, 2008).

Различите врсте *Eimeria* паразитирају у различитим деловима црева, па карактеристичне лезије које се појављују на месту инфекције омогућавају индиректну детерминацију врста *Eimeria* и процену степена инфекције (Слика 3, Табела 4) (Johnson и Reid, 1970; Sivaseelan и сар., 2013; Shojaei, 2014). Разликовање врсте *Eimeria* помоћу процене присуства лезија на цревима је прихватљива метода. Израчунавање „тежине“ инфекције помоћу ове методе је мање прецизно, јер постоји недостатак у директној корелацији између микроскопских и макроскопских лезија и присуства паразита у слузници црева (Swinkels, 2008).



Слика 3. Подручја на цревима за оцену лезија (Conway и McKenzie, 2007).

Табела 4. Место развоја, степен патогености и врсте лезија појединих врста *Eimeria* (Quiroz-Castañeda и Dantán-González, 2015)

Врста	Место развоја	Патогеност	Лезије
<i>E. praecox</i>	Дуоденум, јејунум	Најмање патогена	Течан цревни садржај, слуз на мукози
<i>E. acervulina</i>	Дуоденум, илеум	Мање патогена	Губитак течности, малапсорпција
<i>E. mitis</i>	Илеум	Мање патогена	Губитак течности, малапсорпција
<i>E. maxima</i>	Јејунум, илеум	Умерено до веома патогена	Запаљење цревног зида са тачкастим крварењима, епител који се лако скида
<i>E. brunetti</i>	Цекуми и ректум	Веома патогена	Запаљење цревног зида са тачкастим крварењима, епител који се лако скида
<i>E. tenella</i>	Цекуми	Веома патогена	Задебљање зида цекума и препуњеност крвавим садржајем, цревне ресице су оштећење, настаје велико крварење и смрт
<i>E. necatrix</i>	Јејунум, илеум, цекуми	Веома патогена	Црева могу бити испуњена гасовима, слузница задебљала и лумен испуњен течношћу, крви и деловима ткива. Лезије код уинулих птица се могу уочити као црно-беле наслаге (изгледају као со и бибер)

2.5. Интеракција између домаћина и паразита

Одговор домаћина на инфекцију кокцидијама је сложен (Shivaramaiah и сар., 2014). Након инфекције пилићи могу развити заштитни имунитет на реинфекцију истим сојем *Eimeria*. Седам врста *Eimeria* су способне да инфицирају пилиће и свака од њих има своје специфично подручје (нишу) у цревима у ком паразитира (Табела 4). Ово има за последицу разлике у развоју имунитета домаћина на поновну инфекцију кокцидијама (Stiff и Bafundo, 1993). Заштитни имунитет на поновну инфекцију кокцидијама је специфичан за врсту (Dalloul и сар., 2007; Shivaramaiah и сар., 2014). *Eimeria* у домаћину има неколико интрацелуларних фаза развоја (Слика 1). Све ове фазе карактеришу специфични антигени који помажу у развоју одговарајућег заштитног имунолошког одговора (Tomley, 1994). Количина унетих ооциста у организам домаћина такође је важна за квалитет имунолошког одговора (Blake и сар., 2005). Генетски потенцијал пилића је значајан за развој имунитета на инфекцију кокцидијама (Li и сар., 2002). Lillehoј и сарадници (1986) су показали да различити линијски хибриди пилића показују различиту осетљивост на инфекцију истом врстом *Eimeria*, што се може видети кроз различити број излучених ооциста, лезије на слузници црева и клиничке симптоме.

2.6. Актуелни методи контроле и превенције кокцидиозе

Кокцидиоза је паразитска болест која се може превенирати и контролисати добрим хигијенским мерама на фарми, побољшањем биосигурносних мера и добрим менаџментом фарме. Поред доброг менаџмента, једна од најчешће примењиваних метода превенције и контроле је примена антикокцидијских супстанци. Овај начин превенције има два велика недостатка. Пре свега, то је развој резистенције *Eimeria* према кокцидиостатицима (Peek, 2010; Peek и Landman, 2011). На другом месту је чињеница да постоји све већи оправдани страх од потенцијалних штетних ефеката резидуа кокцидиостатика у живинарским производима (Peek и Landman, 2003). Данас су у употреби нови производи за превенцију и контролу *Eimeria* као што су природни препарати (фитобиотици) (Pourali и сар., 2014; Bozkurt и сар., 2016; Abudabos и сар.,

2017; Wang и сар., 2018), пребиотици и пробиотици (Peek и Landman, 2011; Abdelrahman и сар., 2014; Erdoğan и сар., 2019), .

Алтернатива примени кокцидиостатика је вакцинација (Shivaramaiah и сар., 2014). Инфекције са паразитима рода *Eimeria* изазивају комплексан заштитни имунитет који се развија брзо и даје добру заштиту. Тренутно су доступне различите врсте вакцина: живе вакцине, живе атенуиране вакцине, неинфективни деривати паразита, генетски модификоване субјединичне вакцине, рекомбинантне вакцине. Најефикаснијим се сматрају живе вакцине (Badran и Lukesova, 2006; Price и Barta, 2010; Peek и Landman, 2011; Blake и сар., 2017).

2.6.1. Кокцидиостатици

Превенција и контрола кокцидиозе је заснована на употреби кокцидиостатика у храни или вакцинацији уз добре хигијенске мере и добар менаџмент фарме (Hafez, 2008). Употреба кокцидиостатика датира из прве половине прошлога века, када су 1947. године Delaplane и сарадници установили да се применом ниских концентрација сулфаквиноксалина у храни ефикасно може контролисати болест. Најчешће коришћени кокцидиостатици су јонофорони антибиотици (ласалоксид, мадурамицин, семдурамицин, монензин, наразин и салиномицин), који ометају пролазак јона кроз ћелијску мембрану и тиме узрокују смрт паразита. Хемијски кокцидиостатици инхибирају различите биохемијске процесе у ћелији паразита, као на пример ампролијум, који инхибира унос тиамина (Witcombe и Smith, 2014). Робенидин инхибише оксидативну фосфорилацију, примарно делује кокцидиостатски, а против друге генерације шизоната делује и кокцидиоцидно. Хинолонски кокцидиостатици, као што је декоквинат и метилбензекват, утичу на функцију митохондрија (инхибишу транспорт електрона а тиме и респирацију) и данас се ређе користе због релативно брзог развоја резистенције (Chapman, 1997; Kant и сар., 2013; Witcombe и Smith, 2014). Уколико дође до појаве кокцидиозе, лечење кокцидиоцидима кроз воду за пиће треба што пре започети. Најчешће се користе сулфонамиди, ампролиум и толтразурил (Hafez, 2008).

2.6.1.1. Програм ротације

Због све чешће појаве резистенције према кокцидиостатцима, у примени су различити програми превенције кокцидиозе. Основна претпоставка ових програма је да ако кокцидије развију отпорност на једну кокцидиостатску супстанцу, она ће бити елиминисана применом друге кокцидиостатске супстанце (Peek, 2010). Програм ротације је један од таквих програма и он подразумева примену једног кокцидиостатског адитива у храни током једног производног циклуса това. Циљ овог програма је да се ротирањем кокцидиостатика (са различитим механизмима деловања) из једног циклуса това у други, избегне могућност настанка резистенције (Charman, 2007). Избор кокцидиостатика за употребу у програму ротације може бити тежак, јер резистентни сојеви *Eimeria* могу бити присутни на фарми. Ако је неки кокцидиостатик често коришћен раније, требало би га избећи, јер је већа вероватноћа да се појави резистенција. Ротација се врши најчешће на четири до шест месеци за товне пилиће, или након сваког другог циклуса производње (Charman, 2007; Peek, 2010).

2.6.1.2. „Shuttle“ програм

„Shuttle“ програм подразумева коришћење различитих кокцидиостатика током истог производног циклуса. Најчешће се два или више кокцидиостатика користе у различитим хранивима код истог јата. Овај програм обично укључује употребу синтетског кокцидиостатика у стартер смеше, а затим јонофорни антибиотик у гровер и финишер смеше (Charman, 2007). Ови кокцидиостатици се морају укинути из финишер смеша неколико дана пре клања, због периода каренце (Hafez 2008). Предност коју „Shuttle“ програм има у односу на друге програме је да се свака резистенција која се развије према једном кокцидиостатику може елиминисати применом другог, код истог јата. Сматра се да „Shuttle“ програми не спречавају стварање резистенције, али успоравају њен развој. Веома је важно да се кокцидиостатици који се користе у „Shuttle“ програму разликују према механизму деловања (Charman, 2007; Peek, 2010).

2.6.2. Фитобиотици

Фитобиотици представљају биљне производе и екстракте који се користе у превенцији кокцидиозе (Peek и Landman, 2011). Поред кокцидиозе, у литератури је описана употреба биљних производа и екстраката код превенције различитих болести животиња (Stanimirović и сар., 2017; Delić и сар., 2018; Drasković и сар., 2018). Примењују се умешани у храну. Quiroz-Castañeda и Dantán-González (2015) указују на позитивне ефекете биљних екстраката примењених код пилића са крвавом дијарејом и оштећењима слузнице, насталим услед кокцидиозе. Такође, применом фитобиотика смањује се морталитет у јату, број излучених ооциста по граму фецеса и побољшавају се производне перформансе пилића (Quiroz-Castañeda и Dantán-González, 2015). Фитобиотици могу заменити кокцидиостатике и тако смањити могућност настанка резистенције. Они најчешће представљају мешавину биљних екстраката и етарских уља (карвакрол, тимол), углавном пореклом из *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Coriandrum sativum*, *Artemisia asiatica* и *Sophora flavescens* (Arczewska-Wlosek и Swiatkiewicz, 2012; Masood и сар., 2013; Quiroz-Castañeda и Dantán-González, 2015; Drasković и сар., 2018).

2.6.3. Вакцинација

Вакцинација представља алтернативу примени антикокцидијских супстанци у превенцији кокцидиозе (Shivaramaiah и сар., 2014). Иако је дужи низ година било познато да изложеност домаћина малом броју ооциста омогућава развијање заштитног имунитета, живе вакцине против кокцидија се нису користиле до 1960-их (Hafez, 2008). Инфекције са паразитима рода *Eimeria* изазивају комплексан заштитни имунитет који се развија брзо и даје добру заштиту (Allen и Fetterer, 2002; Swinkels, 2008). Тренутно су доступне различите врсте вакцина: живе вакцине, живе атенуиране вакцине, неинфективни деривати паразита, генетски модификоване субјединичне вакцине, рекомбинантне вакцине. Најефикаснијим се сматрају живе вакцине. Оне се састоје од од ослабљених сојева *Eimeria*, који могу изазвати развој

заштитног имунитета (Badran и Lukesova, 2006; Price и Barta, 2010; Peek и Landman, 2011; Blake и сар., 2017).

2.7. Оксидативни стрес и ROS

Оксидативни стрес се дефинише као присуство слободних радикала у повећаној концентрацији у односу на расположиви антиоксидативни капацитет организма. Многи радикали и производи метаболизма описани су као потенцијално токсични и дефинисани као реактивне кисеоничне, азотне или хлорне врсте. Ове супстанце су веома реактивне и могу довести до оштећења ћелијских макромолекула, као што су протеини, липиди и нуклеинске киселине (Surai, 2016). Оксидативни стрес доприноси развоју разних метаболичких поремећаја, укључујући и апоптозу. Он може изменити равнотежу ћелијских редокс парова (редукованог глутатиона, глутатион-дисулфида и редукованог и оксидисаног тиоредоксина), чиме доводи до измењене експресије кључних гена одговорних за детоксикацију, антиоксидативну одбрану, ћелијску транзицију и инфламаторне одговоре. Ћелије су у току оксидативног стреса изложене великим количинама слободних кисеоничних врста (reactive oxygen species, ROS). ROS су веома нестабилни и спонтано реагују са различитим органским материјама (Kehrer и Klotz, 2015).

Ћелије имају комплексни систем одбране за контролу производње ROS. Ово се односи на неензимска једињења ниске молекулске масе (витамин Ц, глутатион и мокраћну киселину) и ензимска једињења високе-молекулске масе (нпр. супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и арил естараза). Они ограничавају брзину и прогресију оксидације и тиме штите ћелије од оксидативног стреса и оксидативних оштећења. На крају, након оштећења, активирају се механизми поправке (Halliwell и Whiteman, 2004; Del Vesco и Gasparino, 2013). Митохондрије су посебно осетљиве на оксидативни стрес јер су њихове мембране богате вишеструко незасићеним масним киселинама и протеинима. Повећана производња енергије у митохондријама повезана је са повећањем концентрације ROS (Green и сар., 2004).

Активност и регулација сигналних путева у ћелији и транскрипциони фактори могу бити захваћени штетним утицајем оксидативног стреса. Сматра се да овај низ догађаја представља почетак ћелијског и ткивног оштећења, који проузрокује значајне промене у физиологији и понашању живине, што доводи до смањења продуктивности живине и настанка економских губитака (Akbarian и сар., 2016).

Слободни радикали су атоми, молекули или јони који садрже један или више неспарених електрона (Kehrer и Klotz, 2015). Молекул кисеоника у основном, најстабилнијем стању има два неспарена електрона. Неспарени електрони у орбиталама могу променити смер својих спинова и потпуно раскинути или ослабити O=O везе. На тај начин од атмосферског кисеоника настају изразито реактивни молекули, кисеоникови слободни радикали. Примањем једног електрона у молекулску орбиталу настаје први производ редукције кисеониковог молекула, **супероксид-анион-радикал** ($O_2^{\cdot-}$) (Surai, 2016). Други производ редукције, пероксидни јон (O_2^{2-}), настаје примањем два електрона у исту молекулску орбиталу кисеоника у основном стању. Он у присуству H^+ јона гради **водоник-пероксид** (H_2O_2). Пероксидни јон није радикал и нема неспарене електроне. Трећи производ редукције има три електрона, лако се разграђује, па тако даје $O^{\cdot-}$, који је коњугована база **хидроксил радикалу** (OH^{\cdot}). Од кисеоникових радикала, токсичне особине имају $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OH^{\cdot} (Birben и сар., 2012; Aprioku, 2013; Mihaljev, 2013;).

ROS већином настају у митохондријама, као и у ћелијским мембранама, пероксизомима, микрозомима и фагоцитима ћелија нападнутих патогенима (Dhawan, 2014). Описана су три механизма како они оштећују ћелије: 1. интеракција ROS са биолошким структурама, када настају ковалентне модификације макромолекула, првенствено протеина и нуклеинских киселина, 2. разарање мембранских липида у процесу липидне пероксидације, и 3. формирање нерадикалских продуката који специфично делују на различите циљеве у ћелији (Estévez, 2015; Kehrer и Klotz, 2015). У нормалним условима, у ћелијама постоји равнотежа између продукције слободних радикала и њихове елиминације. Међутим, повећање продукције слободних радикала или смањење антиоксидативне заштите ћелије изазива оксидативни стрес који може бити индукован различитим факторима, као што су

тешки метали, УВ зрачење, повишена температура, микроорганизми, различита патолошка стања, алергије, малнутриција, стрес, недостатак витамина, хипервитаминоза, микотиксини, повећана концентрација кисеоника, метаболити различитих токсичних једињења и лекова (Birben и сар., 2012; Surai, 2016). Ћелије које су нарочито осетљиве на оксидативни стрес су еритроцити. Стварање хидроксил радикала и пероксидација мембранских липида коју они изазивају, ремете пропустљивост мембране еритроцита и пренос кисеоника до ткива.

Супероксид радикал ($O_2^{\cdot-}$) се сматра токсичним јер реагује са протеинима и деполимеризује угљене хидрате. Ослобођени $O_2^{\cdot-}$ најчешће остаје у интраћелијском или пролази у екстраћелијски простор кроз ћелијску мембрану. У међућелијском простору постаје супстрат за ензим супероксид дисмутаза (SOD). $O_2^{\cdot-}$ се сматра токсичним јер гради OH^{\cdot} и H_2O_2 , а оштећења ћелија изазива ретко (Mihaljev, 2013; Arrioku, 2013; Surai, 2016).

Хидроксил радикал (OH^{\cdot}) је најреактивнији радикал кисеоника и одговоран је за оштећење ћелије и измену молекула (Kehrer и Klotz, 2015). Реагује са већином молекула организма: угљеним хидратима, аминокиселинама, нуклеотидима, фосфолипидима и органским киселинама. OH^{\cdot} може проузроковати низ штетних реакција: инактивацију ензима, липидну пероксидацију и деградацију нуклеинских киселина. $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 се сматрају слабијим редукционим средствима (Arrioku, 2013; Mihaljev, 2013).

Водоник-пероксид (H_2O_2) настаје од супероксид анјона под дејством ензима SOD. Дифундује веома лако кроз плазма мембране, а може настати и под дејством ксантин оксидазе, NAD(P)H оксидазе и у пероксизомима потрошњом молекуларног кисеоника у метаболичким реакцијама (Birben и сар., 2012).

2.8. Липидна пероксидација

Оксидација липида је процес који настаје када слободни радикали, реагујући са липидима, изазову оксидативну деструкцију незасићених масних киселина (Birben и сар., 2012; Kehrer и Klotz, 2015). Овај процес на ћелијском нивоу проузрокује оштећење ћелијских мембрана, што доводи до слабљења мембранске функције,

смањења флуидности, смањене активности мембранских ензима и пораста пропустљивости мембране за јоне, као што је на пример калцијум. Ослобађањем калцијума из митохондрија и ендоплазминог ретикулума повећава се интрацелуларни калцијум и активирају се ензими (протеазе, ендонуклеазе, фосфолипазе, АТР-азе), који испољавају штетне ефекте (Pamplona и Costantini, 2011; Görlach и сар., 2015; Radaković и сар., 2016). Слободни радикали се производе у ћелијама у току нормалног метаболизма и врше пероксидацију вишеструко незасићених масних киселина. Незасићене масне киселине, учествују у структури ћелијске мембране и мембрана ћелијских органела, као састојци фосфолипида. Скраћивањем ланца масне киселине нарушава се интегритет ћелијских мембрана. Долази до пероксидног оштећења масти у ћелијама и међућелијским просторима и мења се пропустљивост ћелијских мембрана (Mihaljev, 2013). Нагомилани липидни пероксиди могу да остану у циркулацији, где се разграђују и стварају секундарне продукте (алкохоле, ниже масне киселине, алдехиде и кетоне), који такође штетно делују на организам. Наведена оштећења узрокована оксидативним стресом доводе до низа промена које остављају трајне последице на здравље пилића, или чак проузрокују угинућа, и тиме повећавају економске губитке (Koinarski и сар., 2005; El-Maksoud и сар., 2014).

Малон-диалдехид (MDA) је реактивни алдехид и један од многих реактивних електрофилних врста које изазивају оштећење ћелија. Настаје као резултат реакције деловања ROS на вишеструко незасићене липиде. Један је од највише испитиваних завршних производа ензимских и неензимских реакција липидне пероксидације. Концентрација MDA користи се као биомаркер за мерење нивоа оксидативног стреса, јер је његова концентрација у крви и ткиву директно пропорционална ћелијском оштећењу изазваном слободним радикалима (Georgieva и сар., 2006). Због своје изузетне реактивности, у узорцима се налази најчешће ковалентно везан за разне биолошке молекуле (протеине, нуклеинске киселине и фосфолипиде). Код пилића инфицираних кокцидијама концентрација MDA се повећава, што указује и на повећање липидне пероксидације (Georgieva и сар., 2006; Pourali и сар., 2014; Liu и сар., 2016).

2.9. Ензими антиоксидативне заштите

У условима неконтролисаног стварања слободних радикала, њихова количина може превазићи капацитет ћелије и тада настаје оксидативни стрес. Главни систем заштите од ROS чини група антиоксидативних ензима у које спадају SOD и каталаза (CAT). Они представљају прву линију одбране у елиминацији примарних производа редукције молекуског кисеоника (Birben и сар., 2012). Антиоксидативни заштитни систем настао је током еволуције код свих аеробних организама, како би се спречила, ограничила или поправила оштећења настала деловањем ROS. Оксидативни стрес се манифестује првенствено као промена активности антиоксидативних ензима и смањење неких неензимских антиоксиданата (нпр. витамини А, Ц и Е) услед превелике продукције ROS. SOD је део антиоксидативног система у првој линији одбране од ROS. CAT је важан за прилагођавање ћелија на оксидативни стрес и њихово очување јер разграђује реактивни H_2O_2 . Литературни подаци указују на настанак оксидативног стреса услед паразитских обољења (Koinarski и сар., 2005; Georgieva и сар., 2006; Radakovic и сар., 2016; Bozkurt и сар., 2016). Повећање концентрације MDA у плазми и смањење активности SOD у крви код птица инфицираних кокцидијама указује на појаву оксидативног стреса. Истовремено долази до повећања активности CAT, што је компензаторни механизам организма инфицираних животиња (Georgieva и сар., 2006; El-Maksoud и сар., 2014).

Супероксид дисмутаза (SOD) заузима најзначајније место у заштити ћелије од слободних радикала. Заступљена је у свим аеробним организмима и катализује реакцију дисмутације супероксидног ањона до H_2O_2 и O_2 (Aprioku, 2013; Mihaljev, 2013). Супероксид дисмутазе су металоензими који садрже Fe, Mn, Zn или Cu, а као антиоксиданти имају важну улогу у имунолошкој заштити код цревних инфекција пилића различитим патогенима (*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Eimeria* spp.) (Surai, 2016). Доказано је смањење активности SOD након инфекције пилића кокцидијама (Koinarski и сар., 2005; Georgieva и сар., 2006; Bozkurt и сар., 2016; Liu и сар., 2016).

Каталаза (CAT) разлаже H_2O_2 на O_2 и воду (Aprioku, 2013). Најаткивнија је у јетри, еритроцитима и бубрезима, али се може доказати у свим животињским

ћелијама и органима. САТ се налази чврсто везана у пероксизомима и митохондријама, а у растворљивом облику се једино налази у еритроцитима. САТ игра веома битну улогу у очувању интегритета ћелије тако што разлаже реактивни H_2O_2 , који може да доведе до настанка веома реактивног хидрокси радикала (Pamplona и Costantini, 2011; Mihaljev, 2013). OH^* је веома нестабилан, може изазвати ћелијско оштећење оксидацијом липида, нуклеинских киселина и протеина (Aprioku, 2013). Активност САТ се код оксидативног стреса повећава, што се сматра компензаторним механизмом јединки инфицираних кокцидијама (Georgieva и сар., 2006).

Глутатион-С-трансфераза (GST) је ензим с вишеструком функцијом којим се еукариоти могу бранити од штетног деловања слободних радикала. Постоји у облику димера и тримера. Улога GST је да катализује реакције редукције органских хидро-пероксида. У процесу детоксикације GST катализује реакцију коњугације глутатиона са електрофилним, хидрофобним, хемијски хетерогеним једињењима егзогеног и ендогеног порекла (Ђukić, 2008). GST учествује у заштити ћелије од штетног дејства ROS, за које се везује директно ковалентно и чини их мање реактивним (Chikezie, 2015). Овај ензим је показао повећану активност код пилића инфицираних различитим патогенима и изложених различитим врстама стреса (Ismail и сар., 2013; Chikezie, 2015).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

За циљеве и задатке овог истраживања постављено је следеће:

- Испитати параметре оксидативног стреса у крви пилића инфицираних врстама протозоа рода *Eimeria* након примене антикокцидијских супстанци хемијског (робенидин) и биљног порекла (Хербакокс). Ово ће се постићи мерењем активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT и GST) и концентрације производа липидне пероксидације (MDA).
- Детерминација врста *Eimeria* које паразитирају код бројлерских пилића помоћу молекуларногенетичких техника (PCR).
- Установити у ком степену су присутне субклиничке инфекције на фармама бројлерских пилића.
- Установити да ли постоји узрочно последична веза између примењених мера биосигурности на фарми и појаве субклиничких и клиничких инфекција кокцидијама.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

У истраживању су коришћени су товни пилићи хибрида „ROSS 308“ и „COBB 500“, са фарми малог (<5000 пилића), средњег (5000-10000 пилића) и великог капацитета (>10000 пилића). Истраживање је спроведено у периоду од 2015. до 2017. године на територији АП Војводине. Узорци фецеса су прикупљани са укупно 100 фарми товних пилића. Осим тога, спроведена је и анкета у циљу прикупљања података о власнику, старости и величини јата, хибриду пилића, мерама биосигурности и кокцидиостатицима који се примењују, врсти простирке, као и појави кокцидиозе и секундарних инфекција у претходним циклусима производње. Под фармом се подразумевало свако јато товних пилића исте старосне доби, истог здравственог и имуног статуса, које се држи унутар истог објекта и представља једну епизоотиолошку целину. На свакој фарми узоркован је по један збирни узорак фецеса пилића старих 3 до 6 недеља. Ови узорци су коришћени за даљу микроскопску и молекуларну дијагностику врста *Eimeria* на Одељењу за клиничку бактериологију, микологију и паразитологију, Научног института за ветеринарство "Нови Сад", у Новом Саду. Сви узорци су били пореклом од клинички здравих пилића, узгајаних на подном начину држања. Фецес је узиман директно са простирке, са 20 до 50 места унутар објекта, највише у пределу појилица и хранилица. У току узорковања, путања кретања у објекту била је у облику слова „W“, описаној од стране Kumar и сарадника (2014). Узорци су узимани стерилним рукавицама у једнократне пластичне кесе и транспортовани на температури 4°C у лабораторију.

Други део истраживања састајао се у испитивању ефеката кокцидиостатика на оксидативни статус товних пилића који су инфицирани врстама рода *Eimeria*. Оглед је постављен у току 2017. године, на огледној фарми Института за сточарство у Земуну (Слика 4). Оксидативни статус је испитиван мерењем активности антиоксидативних ензима (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион с-трансфераза) и концентрације производа липидне пероксидације (малон-диалдехид). У огледним

просторијама пилићи су насумично распоређени у 5 огледних група, од којих су 3 групе третиране кокцидиостатицима, а 2 контролне. Свака група састојала се од 50 пилића. Негативна контрола К- обухватала је неинфициране пилиће који нису третирани кокцидиостатицима, а позитивну контролу К+ пилиће инфициране ејмеријама (перорална апликација 5×10^5 инфективних ооциста) и нетретиране кокцидиостатицима. Третиране групе су храњене стандардним смешама за тов пилића у које су додати кокцидиостатици и инфициране су (перорална апликација 5×10^5 инфективних ооциста) у узрасту од 14 дана према упутству Vozkurt и сарадника (2016). Група Р₀ добијала је синтетски кокцидиостатик робенидин од првог дана до 5. дана пре завршетка това. Група Р₀+Херб добијала је робенидин у прве две недеље това, а природни (биљни) кокцидиостатик до завршетка това. Херб група добијала је биљни кокцидиостатик све време трајања това. Робенидин је даван у концентрацији 500 g/тони хране, а Хербакокс у концентрацији 750 g/тони. Крв је узоркована 12, 21. и 40. дана старости пилића.



Слика 4. Огледне групе пилића у току експеримента

4.1.1. Кокцидиостатици

Синтетски кокцидиостатик робенидин примењен је у облику препарата Robenz® 66G (Zoetis Ltd), који садржи 66 g робенидин-хидрохлорида у 1 kg препарата. Робенидин се примењује умешан у храни, у концентрацији 450-550 g/t, од првог дана живота до пет дана пред клање пилића.

Комерцијално доступан фитогени додатак за сточну храну хербакокс (Хербакокс, Есентико д.о.о, Кула, Србија) је мешавина етарског уља (углавном *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* и *Coriandrum sativum*), соли органских киселина, декстрозе, натријум-хлорида и носача. Његов рецепт је власништво произвођача. Препарат се примењује умешан у храни, у концентрацији 500-1000 g/тони хране. Користи се све време това.

4.1.2. Инфективни материјал

Ооците кокцидија су добијене од природно инфицираних пилића са фарми за тов. Изоловане су методом флотације и чуване у 2,5% раствору калијум-дихромата на температури фрижидера (4°C). Инокулум је претходно испран неколико пута дестилованом водом да би се уклонио калијум-дихромат, затим је 1,5 mL суспензије 5×10^5 спорулисаних ооциста апликован орално помоћу пластичног шприца.

Крв је узоркована шприцевима и иглама за једнократну употребу (NIPRO Corporation, Осака, Јапан) венепункцијом *v. subcutanea ulnaris* или *v. brachialis*. Узорци су узимани и чувани у складу са препорукама за руковање биолошким материјалом; транспортовани су и складиштени на леду. Крв је узоркована минимално инвазивном методом са што је могуће мањим изазивањем стреса и без транспорта животиња, а у складу са препоруком за експерименталне процедуре коју прописују Европске Комисије (Directive 2010/63 ЕЕС) као и Закона о добробити и заштити животиња у Србији.

4.2. Методе

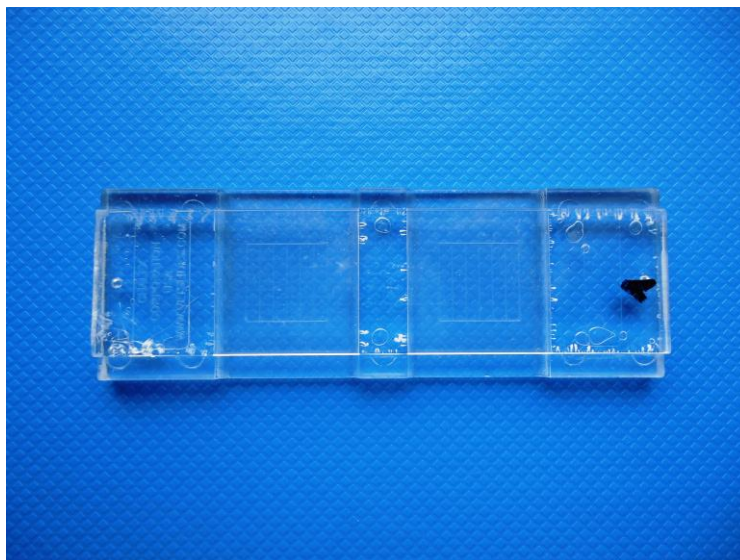
4.2.1. Бројање и изолација ооциста *Eimeria*

Након сакупљања, узорци фецеса су у путном фрижидеру (WAECO TCX-35, Аустралија) допремани у лабораторију. Паразитолошки преглед фецеса је обављен модификованом методом флотације по Мекмастеру како би се утврдио број ооциста кокцидија у јединици мере узорка. Сваки узорак је најпре хомогенизован, када је 4 g фецеса је издвојено у пластичну бочицу запремине 75 mL (Дунавпласт, Инђија), у коју је додато и 56 mL флотационог раствора (NaCl, глукоза-монохидрат). Након мешања у трајању од 5 минута, 10 mL раствора је процеђено кроз цедиљку у пластичну епрувету (Спектар, Чачак) запремине 10 mL. После 2 минута са површине епрувете пастеровом пипетом (Воесо, Немачка) пренесен је део раствора у Мекмастерову комору (Слика 6) (Chalex Corporations, САД), 2-5 минута касније садржај коморица је прегледан на увећању 20x и 40x (микроскоп Olympus BX40F, Токио, Јапан) (Слика 5). Ооцисте су бројане унутар сваког поља коморе. Број ооциста добијен пребројавањем обе површине коморе помножен је са 50, како би се добио укупан број ооциста у граму измета.



Слика 5. Материјал потребан за бројање ооциста *Eimeria*

Ооцисте за молекуларну идентификацију су такође издвајане модификованом методом флотације по Мекмастеру. Након пребацивања узорка из бочице у епрувету, где остаје 2 минута, пастеровом пипетом пренето је 2-3 mL раствора са горње површине у пластичну епрувету запремине 50 mL (ProMedia, Кикинда). Након тога, у епрувету се дода дестилована вода до запремине од 50 mL. Садржај се центрифугира на 750 x g и одбаци се супернатант. Затим се талог са ооцистама пребаци у тубу од 2 mL где се употребом стакленог штапића, механички мрви садржај, како би се оштетио зид ооциста и ослободила дезоксирибонуклеинска киселина (ДНК).



Слика 6. Мекмастерова комора

4.2.2. Детекција методом ланчане реакције полимеразе (Standard PCR)

1. Екстракција ДНК

Екстракција ДНК је урађена од унапред припремљених изолата ооциста комерцијалним сетом за екстракцију ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Немачка).

2. Припрема реакционе смеше

За прављење реакционе смеше (Слика 7) коришћен је комерцијални сет (Qiagen, Хилден, Немачка) који садржи 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP и 2,5 U HotStart Taq DNA полимеразу спремну за 1 x PCR пуфер. У пластичну микротубу запремине 2 mL (Eppendorf, Хамбург, Немачка), помешане су компоненте у следећим запреминама по узорку: 12,5 μL HotStart Taq Master Mix-a, 0,25 μL „forward“ прајмера, 0,25 μL „reverse“ прајмера (Табела 5) и 7 μL ddH₂O. Овако направљена реакциона смеша расуспендована је у микротубе, запремине 0,5 mL (Eppendorf, Хамбург, Немачка), у које је након тога додато по 5 μL екстраховане ДНК по узорку. У свакој PCR реакцији коришћена је једна позитивна и једна негативна контрола.



Слика 7. Припрема реакционе смеше у PCR комори

Након кратког центрифугирања на микроспин центрифуги (Bioscan, Литванија) (Слика 8), узорци су процесуирани у апарату Thermal cycler TECHE (Bibby Scientific LTD, Велика Британија) по следећем протоколу (Науг и сар. 2007): почетна денатурација у трајању од 5 минута, на 95°C-, затим 35 циклуса, денатурација 95°C - 30 секунди, амплификација у зависности од врсте *Eimeria* (Табела 5) и елонгација 1 минут, 72°C, завршна екстензија 72°C - 3 минута (Слика 9).



Слика 8. Центрифугирање припремљених узорака у микроспин центрифуги



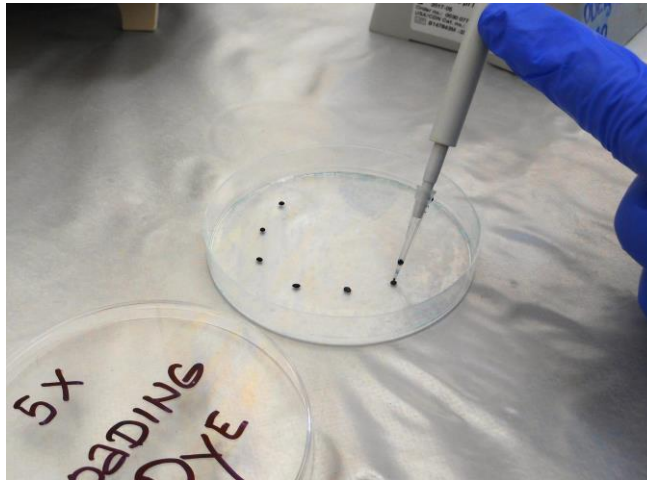
Слика 9. Амплификација ДНК у PCR апарату

Табела 5. Списак прајмера и температуре хибридизације (Haug и сар. 2007)

Врсте <i>Eimeria</i>	Прајмер	Секвенце прајмера	Величина фрагмента	Темп. амплификације (°C)
<i>E. acervulina</i>	EAF2 EAR3	5'-GGGCTTGGATGATGTTTGCTG-3' 5'-GCAATGATGCTTGCACAGTCAGG-3'	145	65
<i>E. brunetti</i>	EBF5 EBR3	5'-CTGGGGCTGCAGCGACAGGG-3' 5'-ATCGATGGCCCCATCCCGCAT-3'	183	58
<i>E. maxima</i>	EmaF EmaR	5'-GTGGGACTGTGGTGATGGGG-3' 5'-ACCAGCATGCGCTCACAACCC-3'	205	65
<i>E. mitis</i>	EmiF2 EmiR3	5'-GTTTATTTCTGTCGTCGTCTCGC-3' 5'-GTATGCAAGAGAGAATCGGGATTCC-3'	330	65
<i>E. necatrix</i>	ENF4 ENR3	5'-AGTATGGGCGTGAGCATGGAG-3' 5'-GATCAGTCTCATCATAATTCTCGCG-3'	160	58
<i>E. praecox</i>	EPF2 EPR3	5'-CATCGGAATGGCTTTTTGAAAGCG-3' 5'-GCATGCGCTAACAACTCCCCTT-3'	215	65
<i>E. tenella</i>	ETF2 ETR	5'-AATTTAGTCCATCGCAACCCTTG-3' 5'-CGAGCGCTCTGCATACGACA-3'	278	65

3. Електрофореза

Електрофореза је изведена на апарату Labnet (Enduro, Horizontal gel System, Woodbridge, САД) у 1 x TAE пуферу (TRIS-EDTA пуфер) који је направљен од 50 x концентрованог TAE пуфера (Thermo Scientific, Вилниус, Литванија) у концентрацији од 0,5% (Слика 10). Гел (2%) је припремљен од агарозе (Lonza Verviers, Белгија) са додатком 1 μL етидијум-бромида (Serva, Хајделберг, Немачка). Етидијум-бромид је додаван и у 1 x TAE пуфер за електрофорезу у запремини од 25 μL на 500 mL 1 x TAE пуфера. За визуелизацију PCR продуката на гелу коришћен је раствор боја GelPilot Loading dye (Qiagen, Хилден, Немачка), док је за одређивање величине фрагмената коришћен маркер GelPilot Plus Ladder (Qiagen, Хилден, Немачка) од 1000 bp. Резултати су читавани на UV транслуминатору (UVP, Апланд, САД).



Слика 10. Припрема узорка за наношење на 2% агароза гел у базен електрофорезе

4.2.3. Одређивање параметара оксидативног стреса

Крв за одређивање активности SOD, CAT, GST и концентрације MDA узоркована је из улнарне или брахијалне вене пилића старих 12, 21 и 40 дана. Узимана је пуна крв у епрувете са литијум-хепарином (BD Vacutainer®) и центрифугирана на 3000 rpm током 10 минута након чега је плазма издвојена, а преостали еритроцити (RBC) три пута испрани у физиолошком раствору и чувани на -20°C до даље анализе.

За одређивање концентрације хемоглобина примењена је цијанометхемоглобинска метода са Драбкиновим реагенсом (Tentori и Salvati, 1981). Све биохемијске анализе су мерене истовремено у три понављања за сваки узорак помоћу спектрофотометра Biobase UV/VIS.

4.2.3.1. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Активност SOD у хемолизатима процењена је епинефринском методом (Misra и Fridovich, 1972), која се заснива на способности SOD да инхибира ауто-оксидацију адреналина до адренохрома. Присутна SOD уклања $\text{O}_2^{\cdot-}$ и при томе инхибира реакцију ауто-оксидације адреналина. Реакциона смеша садржи 0,1 mL узорка, 1,8 mL карбонатног пуфера (карбонатни пуфер и EDTA растворени у дејонизованој води; pH 10,2) и 0,1 mL адреналина (Sigma-Aldrich). Промена апсорбанце је мерена сваки минут у укупном трајању од 3 минута на 480 nm, на температури од 25°C . Јединица активности ензима дефинисана је као количина ензима неопходна да смањи стопу аутооксидације адреналина за 50% у базној средини, у линеарном делу промене апсорбанце у минути. Активност SOD је изражена у јединици по граму хемоглобина (U/g Hb).

4.2.3.2. Одређивање активности каталазе

Активност CAT у узорцима хемолизата је анализирана помоћу H_2O_2 као супстрата (Aebi, 1984). У кварцну кивету сипа се 3 mL подешеног раствора H_2O_2 , а затим додаје она количина узорка која доводи до средње вредности промене

апсорбанце у опсегу од 0,03 до 0,06. Након тога је на спектрофотометру мерено смањење количине H_2O_2 при 240 nm на сваких 30 секунди током 3 минута, на температури од 25°C. Једна јединица САТ активности је дефинисана као активност која је потребна за деградацију 1 mol H_2O_2 за 60 секунди на 25°C и pH 7,0. Активност САТ је израчуната коришћењем моларног коефицијента екстинкције (0,0436 cm^2/mol) и изражена је у јединици по граму хемоглобина (U/g Hb).

4.2.3.3. Одређивање активности глутатион-С-трансферазе

Принцип методе одређивања активности GST у еритроцитима заснива се на способности овог ензима да катализује реакцију везивања 1-хлоро-2,4-динитробензена (CDNB) за сулфхидрилну групу цистеина који улази у састав GSH, при чему се формира CDNB-GSH комплекс. Стопа пораста апсорбанце услед формираног комплекса директно је пропорционална активности GST у узорку. Реакциону смешу за мерење активности ензима осим узорка чини дејонизована вода, CDNB растворен у 95% етанолу, фосфатни пуфер (pH 6,5) и GSH. Повећање апсорбације је праћено спектрофотометријски на таласној дужини од 340 nm, у току 3 минута на температури од 25°C. Специфична активност GST изражена је коришћењем моларног коефицијента екстинкције (9,6/ mM/cm). Активност GST изражена је у јединици по граму хемоглобина (U/g Hb).

4.2.3.4. Одређивање концентрације малон-диалдехида

Концентрација MDA из узорака је измерена спектрофотометријски, на 535 nm (Girotti и сар., 1991). У реакцији MDA са тиобарбитурном киселином у узорку настају једињења жуте боје, чија се концентрација мери спектрофотометријски. У реакцијску смешу умешано је 600 μL узорка и 1,2 mL ТВА реагенса. Смеша је загревана 15 минута на 95°C у воденом купатилу, а затим охлађена у кадици са ледом у трајању од 5 минута. Раствор је затим центрифугиран 10 минута на 3000 rpm и мерена је апсорпција насталог производа реакције на 535 nm. Концентрација MDA је израчуната употребом моларног коефицијента екстинкције за комплекс MDA-тиобарбитурна киселина који износи $1,56 \times 10^5/\text{mol} \times \text{cm}$ и изражена је у nmol/g Hb.

4.2.4. Праћење производних перформанси

Телесна маса сваког пилета појединачно мерена је на почетку експеримента, на крају сваке недеље тога и на крају експеримента. Повећање телесне масе је мерено на недељном нивоу. Потрошња и конверзија хране (FCR) су израчунати на крају огледа.

4.2.5. Процена биосигурносних мера на фармама

Биосигурносне мере су анализиране помоћу упитника који је попуњаван у време сакупљања узорака фецеса на фармама бројлера. Упитник је написан у складу са Законом о добробити животиња (2009).

4.2.6. Статистичка анализа

У статистичкој анализи добијених резултата изведеног експеримента као основне статистичке методе користили смо дескриптивне статистичке параметре. Ови параметри су нам омогућили описивање добијених експерименталних резултата и њихово тумачење. Од дескриптивних статистичких параметара користили смо: аритметичку средину, стандардну девијацију, стандардну грешку, интервал варијације и коефицијент варијације. За праћење FCR и броја оциста сваки бокс је био јединица посматрања. За анализу биохемиских параметара оксидативног стреса и телесне тежине јединица посматрања била је јединка. Обзиром да су подаци за FCR били хетерогени, групе су поређене користећи KruskalWallis ANOVA, а накнадна поређења су урађена са Dunn's тестом. Због хетерогености података за број оциста, извршена је трансформација података $\log_{10}(\text{вредност}+1)$, а групе су тестиране. Подаци биохемиских параметара оксидативног стреса и телесне тежине су били нормално дистрибуирани (Shapiro-Wilk's тест, $p>0,05$) и заједно са бројем оциста су поређени користећи two-way ANOVA са поновљеним мерењем у једном фактору, а накнадна поређења су урађена са Tukey's тестом. За поређене учесталости код биосигурносних мера коришћен је Fisher exact тест, а за поређење фреквенција изолованих *Eimeria* по категорији фарме коришћен је χ^2 тест. Статистичке разлике утврђене су на нивоу

значајности од 5%, осим за процену утицаја примене биосигурносних мера на учесталост инфекције кокцидијама, где је ниво значајности био 5%, 1% и 1%. Сви добијени резултати приказани су табеларно и графички. Статистичка анализа добијених резултата урађена је у GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, Сан Дијего, Калифорнија, САД) и Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, САД).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Параметри оксидативног стреса

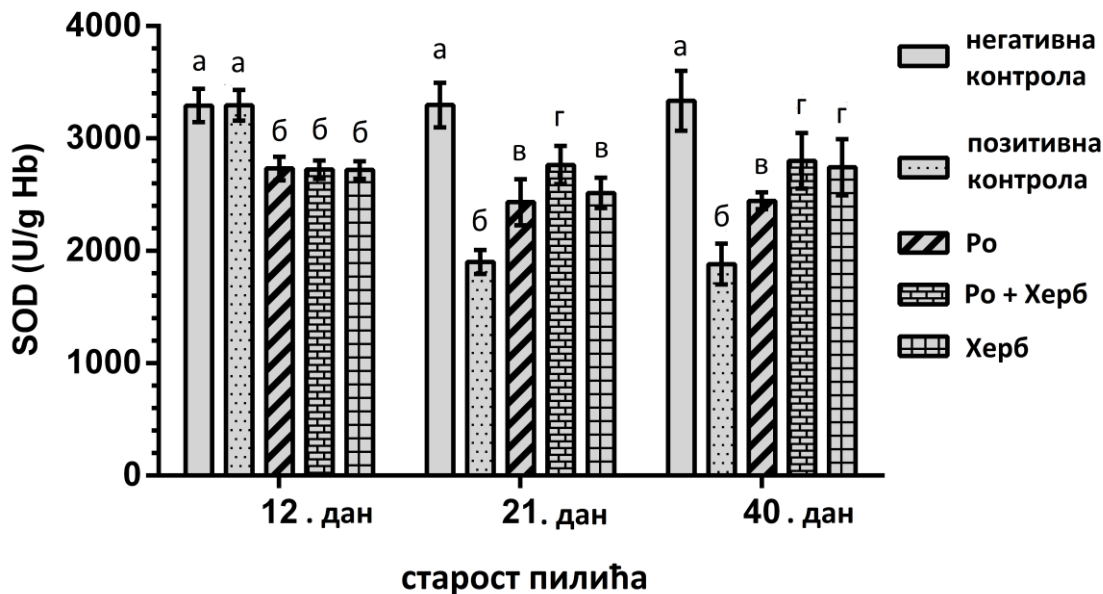
Испитивање параметара оксидативног стреса спроведено је мерењем активности антиоксидативних ензима (SOD, CAT и GST) и концентрације производа липидне пероксидације (MDA) у крви пилића 12, 21. и 40. дана огледа.

5.1.1. Активност SOD

Активност ензима SOD у крви пилића приказана је на Слици 11.

Код мерења спроведеног 12. дана старости уочене су значајне ($p < 0,05$) разлике између контролних и третираних група. Активност SOD код контролних група пилића (негативна и позитивна контрола) је била значајно ($p < 0,05$) виша него код све три третиране групе (Po, Po+Херб и Херб). Значајних ($p > 0,05$) разлика између третираних група (Po, Po+Херб и Херб) није било.

Мерењем активности истог ензима 21. и 40. дана установљено је значајно ($p < 0,05$) смањење активности SOD код свих група инфицираних пилића у односу на негативну контролу. Активност SOD је била значајно ($p < 0,05$) виша код инфицираних пилића третираних антикоксидијским препаратима (Po, Po+Херб и Херб) у односу на инфициране нетретиране пилиће (позитивна контрола). Поређењем активности SOD у третираним групама установљено је да је она у Po+Херб групи била значајно ($p < 0,05$) већа у односу на Po и Херб групу 21. дана, док је 40. дана уочено значајно ($p < 0,05$) повећање активности SOD у Po+Херб и Херб групи у односу на Po групу.



Слика 11. Активност SOD у крви пилића 12, 21. и 40. дана старости у контролним и третираним групама. Подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација (SD). Различита слова изнад стубића указују на значајне разлике између група у сваком појединачном термину узорковања ($p < 0,05$).

Динамика активности SOD у крви пилића код свих група у сва три термина мерења приказана је у Табели 6. Код нетретираних инфицираних пилића (позитивна контрола) уочено је значајно ($p < 0,05$) смањење активности SOD у крви након инфекције кокцидијама (21. и 40. дан) у односу на период пре инфекције (12. дан). Иста појава забележена је код пилића у Po групи, где је уочено значајно ($p < 0,05$) смањење активности SOD након инфекције кокцидијама у односу на стање пре инфекције. Активност SOD код неинфицираних пилића (негативна контрола) није се значајно мењала ($p > 0,05$) током огледа, што је запажено и у Po+Херб групи ($p > 0,05$). Код пилића у Херб групи активност SOD била је 21. дана значајно ($p < 0,05$) нижа у односу на мерења спроведена 12. и 40. дана.

Табела 6. Активност SOD у крви пилића у контролним (негативна и позитивна) и третираним групама (Ро, Ро+Херб, Херб) током огледа

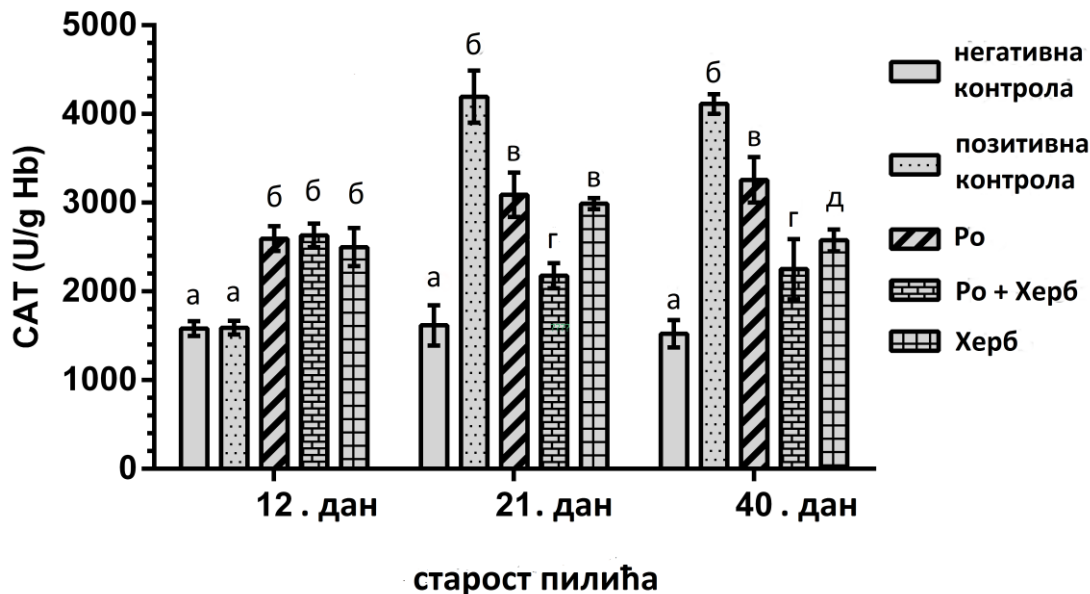
Групе	SOD (U/g Hb)		
	12. дан старости Mean±SD	21. дан старости Mean±SD	40. дан старости Mean±SD
Негативна контрола	3292,66±148,56 ^a	3298,00±198,50 ^a	3336,00±267,30 ^a
Позитивна контрола	3295,85±136,52 ^a	1902,00±105,70 ^b	1883,00±181,90 ^b
Ро	2733,68±104,34 ^a	2434,00±204,70 ^b	2446,00±74,13 ^b
Ро+Херб	2723,34±81,27 ^a	2765,00±169,10 ^a	2802,00±245,40 ^a
Херб	2720,21±76,95 ^a	2516,00±134,60 ^b	2745,00±250,20 ^a

Вредности унутар истог реда обележене различитим словима у суперскрипту указују на статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

5.1.2. Активност САТ

У првом мерењу (12. дан огледа) установљено је да је активност САТ значајно нижа код контролних група у односу на третиране ($p < 0,05$), без значајних разлика између третираних група ($p > 0,05$) (Слика 12).

Након инфекције пилића кокцидијама код инфицираних јединки активност САТ значајно се повећала у односу на неинфициране пилиће и 21. и 40. дана огледа ($p < 0,05$). У поређењу са инфицираном нетретираном групом у оба термина мерења, уочава се значајно смањење активности САТ код група третираних антикокцидијским адитивима ($p < 0,05$). Такође, уочава се и значајна разлика између Ро+Херб групе у поређењу са Ро и Херб групама ($p < 0,05$) 21. дана. Код последњег мерења уочена је значајна ($p < 0,05$) разлика између све три групе пилића третиране кокцидиостатицима (Слика 12).



Слика 12. Активност САТ у крви пилића 12, 21. и 40. дана старости у контролним и третираним групама. Подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација (SD). Различита слова изнад стубића указују на значајне разлике између група у сваком појединачном термину узорковања ($p < 0,05$).

Просечна активност САТ код свих група пилића током трајања огледа приказана је у Табели 7. У крви пилића који нису били инфицирани (негативна контрола) нису уочене значајне ($p > 0,05$) промене у активности овог ензима. Код пилића у позитивној контроли дошло је до значајног ($p < 0,05$) повећања активности САТ у крви након инфекције кокцидијама (21. и 40. дан огледа). У крви пилића из Po групе запажено је значајно ($p < 0,05$) повећање активности ензима 21. дана у односу на време пре инфекције, као и 40. дана у односу на 21. дан. Мерењем активности САТ код пилића из Po+Херб групе установљено је њено значајно ($p < 0,05$) смањење после инфекције, 21. и 40. дана, у поређењу са вредностима пре инфекције. Међутим, код пилића у Херб групи активност САТ је била значајно ($p < 0,05$) виша 21. дана у односу на активност и 12. и 40. дана.

Табела 7. Активност САТ у крви пилића у контролним (негативна и позитивна) и третираним групама (Ро, Ро+Херб, Херб) током огледа

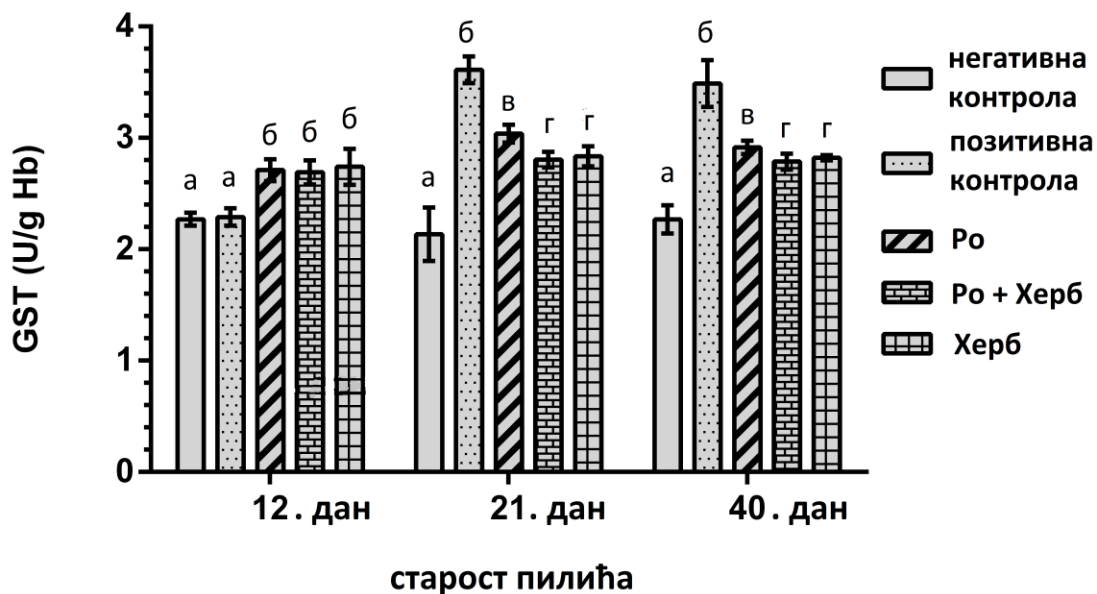
Групе	САТ (U/g Hb)		
	12. дан старости Mean±SD	21. дан старости Mean±SD	40. дан старости Mean±SD
Негативна контрола	1580,42±84,29 ^a	1617,56±227,28 ^a	1523,38±153,58 ^a
Позитивна контрола	1590,13±76,99 ^a	4195,31±294,44 ^b	4114,68±110,78 ^b
Ро	2594,85±140,37 ^a	3089,44±251,66 ^b	3257,84±254,76 ^b
Ро+Херб	2630,77±131,85 ^a	2176,55±143,34 ^b	2250,61±338,68 ^b
Херб	2499,99±216,34 ^a	2989,47±61,97 ^b	2575,33±122,92 ^a

Вредности унутар истог реда обележене различитим словима у суперскрипту указују на статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

5.1.3. Активност GST

Анализом крви пилића спроведеном пре инфекције кокцидијама (12. дан) уочена је значајно ($p < 0,05$) нижа активност GST код контролних група у односу на третиране (Слика 13).

Након инфекције анализе показују значајно ($p < 0,05$) повећање активности GST код инфицираних нетретираних пилића у поређењу са неинфициранима (Слика 13). Значајно нижа активност GST утврђена је код група третираних антикокцидијским адитивима у односу на инфицирану нетретирану групу ($p < 0,05$). Поређењем активности GST између третираних група, како 21, тако и 40. дана огледа, установљена је значајна ($p < 0,05$) разлика између Ро групе у односу на Херб групу и Ро+Херб (Слика 13).



Слика 13. Активност GST у крви пилића 12, 21. и 40. дана старости у контролним и третираним групама. Подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација (SD). Различита слова изнад стубића указују на значајне разлике између група у сваком појединачном термину узорковања ($p < 0,05$).

Резултати мерења активности GST у крви пилића свих група у сва три термина узорковања приказани су у Табели 8. У крви неинфицираних пилића (негативна контрола) значајно ($p < 0,05$) виша активност GST забележена је 21. дана у односу на резултате пре и после тога. Код нетретираних инфицираних пилића (позитивна контрола), као и код пилића који су добијали искључиво робенидин (Po група) активност ензима значајно ($p < 0,05$) се разликовала у сва три термина. Активност GST код пилића у Po+Херб и Херб групи је била значајно ($p < 0,05$) виша у оба термина узорковања после инфекције у односу на активност пре инфекције кокцидијама.

Табела 8. Активност GST у крви пилића у контролним (негативна и позитивна) и третираним групама (Ро, Ро+Херб, Херб) током огледа

Групе	GST (U/g Hb)		
	12. дан старости Mean±SD	21. дан старости Mean±SD	40. дан старости Mean±SD
Негативна контрола	2,27±0,06 ^a	2,14±0,28 ^b	2,27±0,13 ^a
Позитивна контрола	2,29±0,08 ^a	3,61±0,13 ^b	3,49±0,23 ^b
Ро	2,71±0,10 ^a	3,04±0,09 ^b	2,92±0,06 ^b
Ро+Херб	2,69±0,11 ^a	2,80±0,08 ^b	2,79±0,07 ^b
Херб	2,74±0,16 ^a	2,84±0,10 ^b	2,82±0,02 ^b

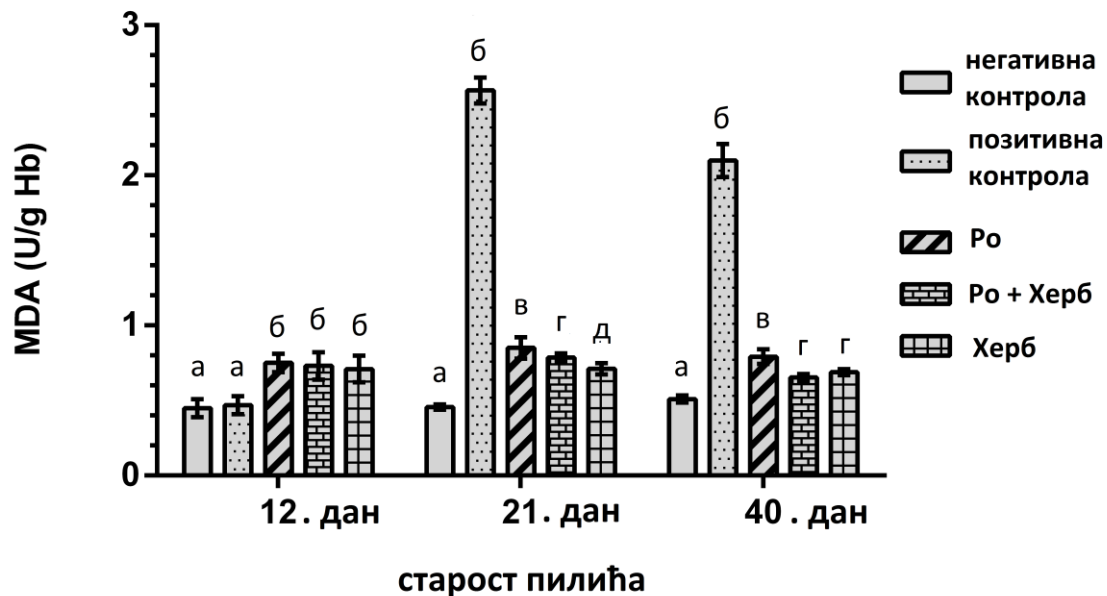
Вредности унутар истог реда обележене различитим словима у суперскрипту указују на статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

5.1.4. Концентрација MDA

Концентрација MDA у крви пилића приказана је на Слици 14. Код првог мерења утврђена је значајно ($p < 0,05$) нижа концентрација MDA код контролних пилића у поређењу са свим третираним групама.

Код другог мерења (21. дан) уочено је значајно ($p < 0,05$) повећање концентрације MDA код инфицираних контролних пилића у односу на неинфициране. Концентрација MDA је била значајно ($p < 0,05$) нижа код инфицираних пилића третираних антикокцидијским супстанцама у односу на инфициране нетретиране пилиће. Поређењем вредности концентрација MDA код третираних група у другом мерењу, утврђене су значајне ($p < 0,05$) разлике између све три групе.

Четрдесетог дана огледа концентрације MDA биле су значајно ($p < 0,05$) ниже у групама Херб и Ро+Херб у односу на Ро групу.



Слика 14. Концентрација MDA у крви пилића 12, 21. и 40. дана старости у контролним и третираним групама. Подаци су приказани као средња вредност±стандардна девијација (SD). Различита слова изнад стубића указују на значајне разлике између група у сваком појединачном термину узорковања ($p < 0,05$).

Концентрација MDA у крви пилића свих група у сва три мерења приказана је у Табели 9. Код неинфицираних пилића (негативна контрола) уочена је значајно ($p < 0,05$) нижа концентрација овог параметра оксидативног стреса у прва два мерења у односу на резултате 40. дана. Концентрације MDA значајно ($p < 0,05$) су се разликовале у сваком појединачном термину узорковања код пилића у позитивној контроли, као и у групама Po и Po+Херб. Међутим, у крви пилића у Херб групи концентрација MDA није се значајно мењала током трајања огледа ($p < 0,05$).

Табела 9. Концентрација MDA у крви пилића у контролним (негативна и позитивна) и третираним групама (Po, Po+Херб, Херб) током огледа

Групе	MDA (nmol/g Hb)		
	12. дан старости Mean±SD	21. дан старости Mean±SD	40. дан старости Mean±SD
Негативна контрола	0,45±0,06 ^a	0,46±0,02 ^a	0,51±0,02 ^b
Позитивна контрола	0,47±0,06 ^a	2,57±0,09 ^b	2,10±0,11 ^b
Po	0,75±0,06 ^a	0,85±0,07 ^b	0,79±0,05 ^b
Po+Херб	0,73±0,09 ^a	0,79±0,03 ^b	0,65±0,02 ^b
Херб	0,71±0,09 ^a	0,71±0,04 ^a	0,69±0,02 ^a

Вредности унутар истог реда обележене различитим словима у суперскрипту указују на статистички значајне разлике ($p < 0,05$).

5.2. Степен конверзије хране (Feed conversion ratio)

У Табели 10 приказане су просечне телесне масе пилића у експерименталним групама и показатељи конверзије хране (FCR) током огледа. На почетку експеримента телесна маса свих група пилића била је уједначена. Међутим, на крају огледа значајно ($p < 0,05$) је била нижа код инфицираних пилића без третмана антикокцидијским адитивима у односу на све остале групе. FCR код пилића у позитивној контроли (2,76) био је значајно ($p < 0,05$) већи него у негативној контроли (1,61) и код пилића третираних антикокцидијским препаратима. Степен конверзије хране није се значајно разликовао ($p > 0,05$) између група бројлера третираних биљним и синтетским кокцидиостатицима или њиховом комбинацијом.

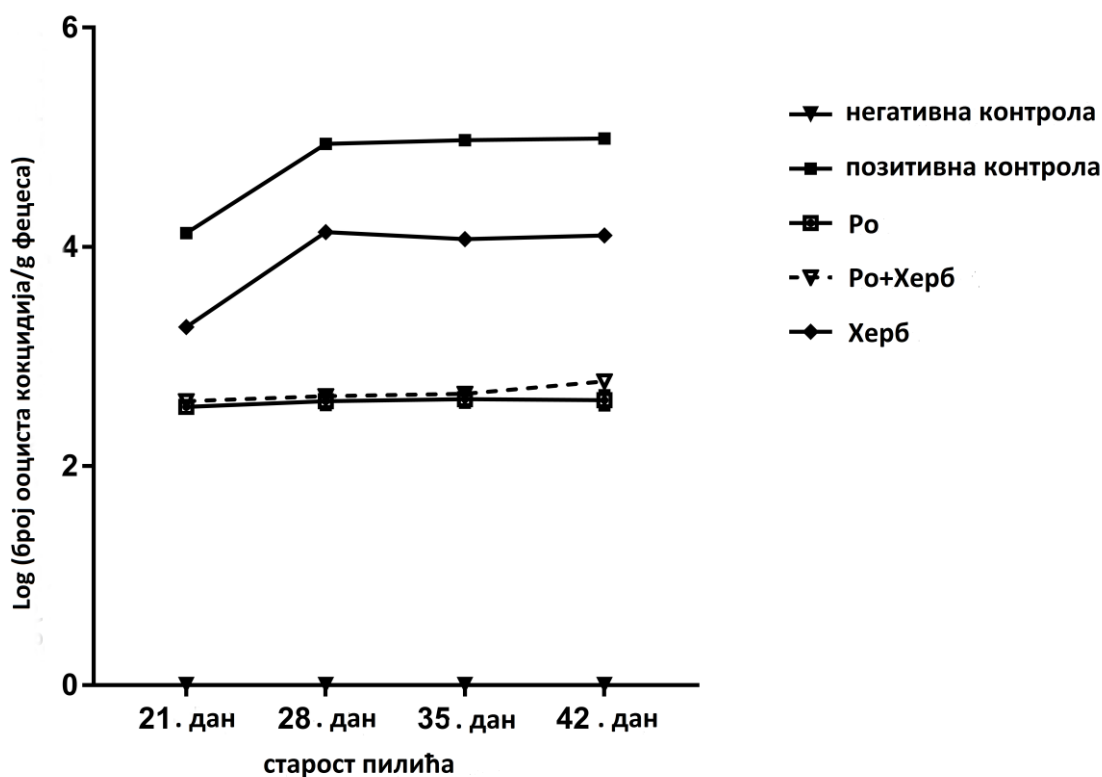
Табела 10. Телесне масе пилића на почетку и на крају огледа и степен конверзије хране (FCR) код контролних и третираних група (Ро, Ро+Херб, Херб).

Групе	Почетне телесне масе (g)	Завршне телесне масе (g)	FCR
	Mean ± SD	Mean ± SD	Median (IQR)
Негативна контрола	39,84 ± 1,18 ^a	2821,22±531,82 ^a	1,61 (1,45-1,85) ^a
Позитивна контрола	39,87 ± 0,99 ^a	1858,68±533,93 ^b	2,76 (2,10-3,62) ^b
Ро	39,67 ± 1,06 ^a	2618,70±494,79 ^{ab}	1,69 (1,57-2,08) ^{ab}
Ро+Херб	39,62 ± 0,91 ^a	2440,35±391,35 ^b	1,91 (1,76-2,07) ^b
Херб	39,72 ± 0,96 ^a	2523,00±521,94 ^{bt}	1,82 (1,60-2,28) ^{ab}

Вредности унутар исте колоне обележене су различитим словима у суперскрипту, која указују на значајне разлике међу групама ($p < 0,05$).

5.3. Број ооциста кокцидија

Анализом фецеса неинфицираних пилића, узоркованог 14, 21, 28, 35. и 42. дана, нису пронађене ооцисте кокцидија (Слика 15). Код инфицираних нетретираних пилића (позитивна контрола) ооцисте су први пут установљене 21. дана (7. дан после инфекције). Њихов број се повећавао приликом сваког следећег узорковања. У групама Ро и Ро+Херб број излучених ооциста у граму фецеса био је значајно ($p < 0,05$) нижи односу на позитивну контролу. Између ових двеју група значајна ($p < 0,05$) разлика у броју ооциста била је забележена само на крају огледа. Бројлери Херб групе излучивали су значајно већи ($p < 0,05$) број ооциста у односу на друге две третиране групе, али још увек значајно ($p < 0,05$) мањи у односу на позитивну контролу (Табела 11).



Слика 15. Број излучених ооциста у граму фецеса (о.р.г.) код контролних и третираних група пилића. Po - група третирана робенидином, Херб - група третирана биљним кокцидиостатиком, Po+Херб - група третирана робенидином и биљним кокцидиостатиком.

Просечан број ооциста кокцидија у граму фецеса (е.р.г.) код свих група у свим терминима узорковања (14, 21, 28, 35. и 42. дан) приказан је у Табели 11 као трансформисана вредност ($\log_{(вредност+1)}$). Током експеримента неинфицирани пилићи нису излучивали ооцисте кокцидија. Код инфицираних нетретираних пилића (позитивна контрола), као и код оних који су добијали биљни антикокцидијски адитив (Херб група), број ооциста у граму фецеса био је значајно ($p < 0,05$) већи 28, 35. и 42. дана у односу на 21. дан. Код инфицираних пилића третираних

робенидином (Po група) број ооциста се није значајно ($p > 0,05$) мењао током огледа. Број ооциста код пилића у Po+Херб групи био је значајно већи ($p < 0,05$) 42. дана у односу на 21. дан; поређењем броја ооциста детектованих 28, 35. и 42. дана није уочена значајна ($p > 0,05$) разлика.

Табела 11. Број ооциста у граму фецеса (e.p.g.) приказан као трансформисана вредност ($\log_{(вредност+1)}$) код контролних и третираних група пилића (Ро, Ро+Херб, Херб) током огледа

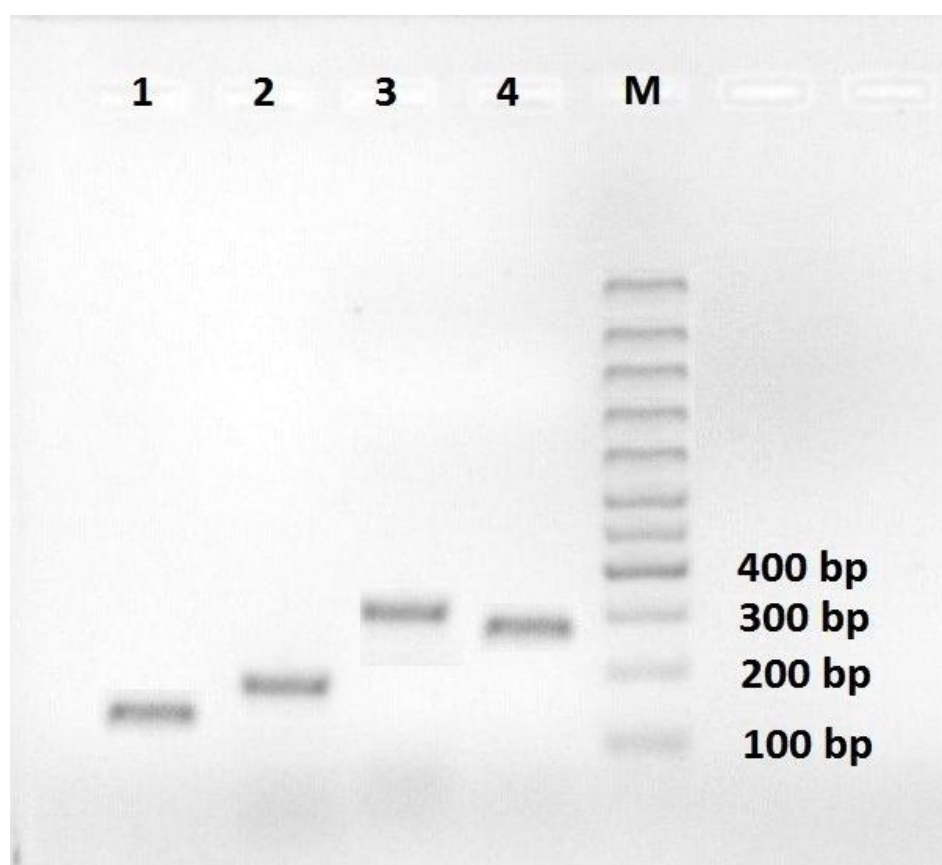
Групе	21. дан старости	28. дан старости	35. дан старости	42. дан старости
Негативна контрола	0,00±0,00 ^{аА}	0,00±0,00 ^{аА}	0,00±0,00 ^{аА}	0,00±0,00 ^{аА}
Позитивна контрола	4,12±0,15 ^{бА}	4,94±0,15 ^{бБ}	4,97±0,15 ^{бБ}	4,99±0,13 ^{бБ}
Ро	2,54±0,04 ^{вА}	2,59±0,07 ^{вА}	2,61±0,07 ^{вА}	2,60±0,08 ^{вА}
Ро+Херб	2,59±0,06 ^{вА}	2,64±0,08 ^{вАБ}	2,66±0,06 ^{вАБ}	2,77±0,08 ^{гБ}
Херб	3,27±0,09 ^{гА}	4,14±0,09 ^{гБ}	4,07±0,10 ^{гБ}	4,11±0,08 ^{дБ}

Ро - група третирана робенидином, Ро+Херб - група третирана са робенидином + биљни кокцидиостатик, Херб - група третирана биљним кокцидиостатиком.

Различита мала слова у суперскипту означавају значајне разлике **између** група пилића у истом времену узорковања ($p < 0,05$); различита слова писана верзалом означавају значајне разлике **унутар** групе током експеримента ($p < 0,05$).

5.4. Детерминација врста *Eimeria*

У периоду од 2015. до 2017. године прикупљено је укупно 100 збирних узорака фецеса на фармама товних пилића са територије АП Војводине: 28 узорака са фарми малог капацитета (<5000 пилића), 34 са фарми средњег капацитета (5000-10000 пилића) и 38 узорака са фарми великог капацитета (>10000 пилића). Ооцисте кокцидија установљене су у 59 узорака, док је 41 узорак био негативан. Методом PCR-а детектоване су 4 врсте *Eimeria*, и то: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* и *E. tenella* (Слика 16).



Слика 16. Електрофореза PCR фрагмената установљених врста кокцидија 1-*E. acervulina* (145 bp), 2-*E. maxima* (205 bp), 3-*E. mitis* (330 bp) и 4-*E. tenella* (278 bp)

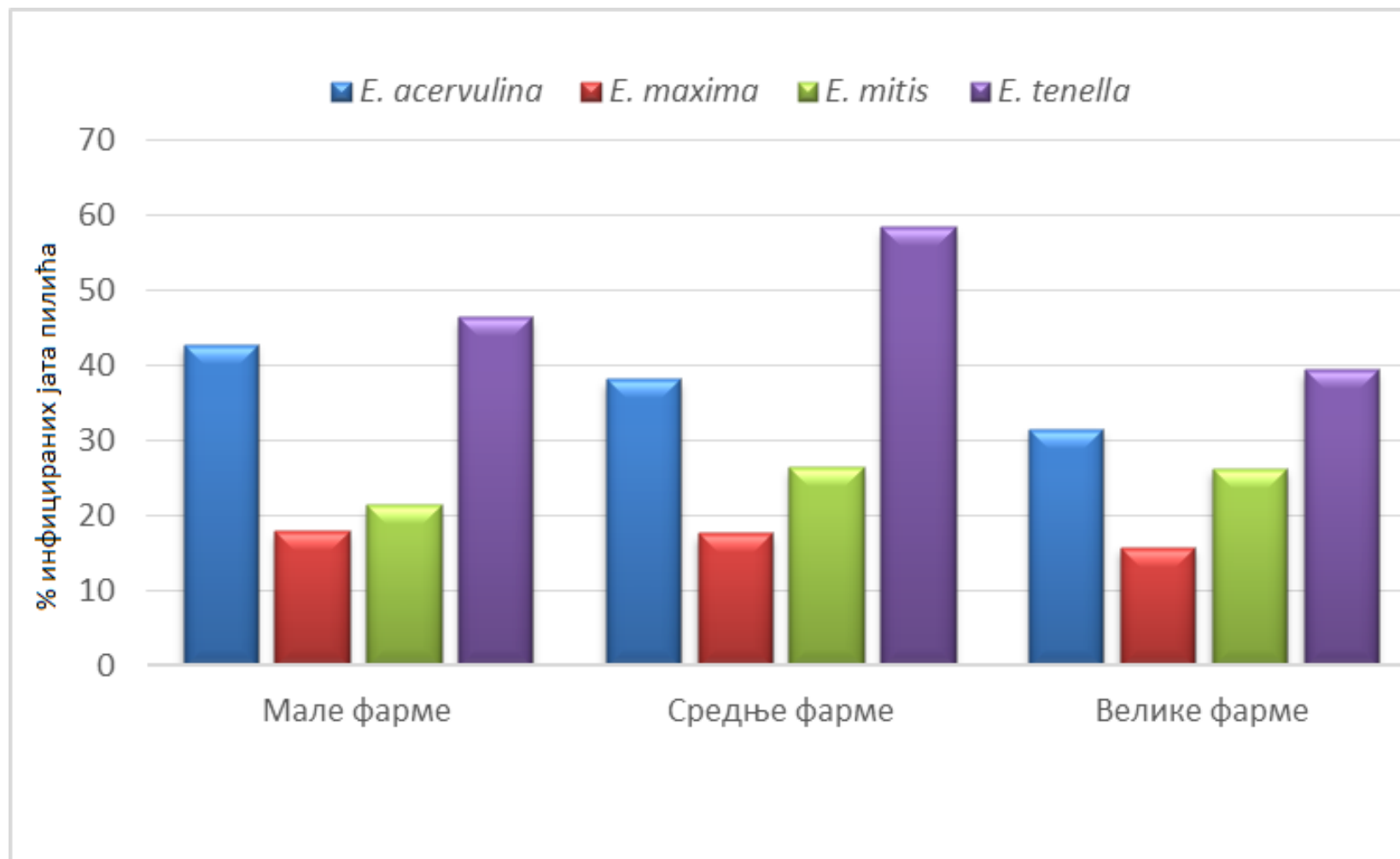
У 18 узорака фецеса од укупно 28 сакупљених на фармама малог капацитета установљене су ооцисте кокцидија. Мешана инфекција је установљена у 12 узорака.

Молекуларном детекцијом утврђене су *E. acervulina* у 12 узорака, *E. maxima* у 5 узорака, *E. mitis* у 6 узорака и *E. tenella* у 13 узорака фецеса (Графикон 1).

На фармама средњег капацитета кокцидије су установљене у 21 од укупно 34 узорка. Инфекција са две и више врста кокцидија је установљена у 15 узорака. Методом PCR-а детерминисане су *E. acervulina* у 13 узорака, *E. maxima* у 6 узорака, *E. mitis* у 9 узорака и *E. tenella* у 20 узорака (Графикон 1).

Број позитивних узорака са фарми великог капацитета био је 20. Мешана инфекција је установљена у 14 узорака. Молекуларном детекцијом утврђене су *E. acervulina* у 12 узорака, *E. maxima* у 6 узорака, *E. mitis* у 10 узорака и *E. tenella* у 15 узорака (Графикон 1).

Поређењем добијених резултата у све три категорије фарми није уочена статистички значајна разлика ($p > 0,05$).



Графикон 1. Процент инфицираних јата бројлера појединим врстама кокцидија на различитим типовима фарми

5.5. Преваленција субклиничке кокцидиозе

Укупно је испитано 100 јата на исто толико фарми бројлерских пилића. Ооцисте кокцидија установљене су биле у 59 јата, док је 41 било слободно од инфекције.

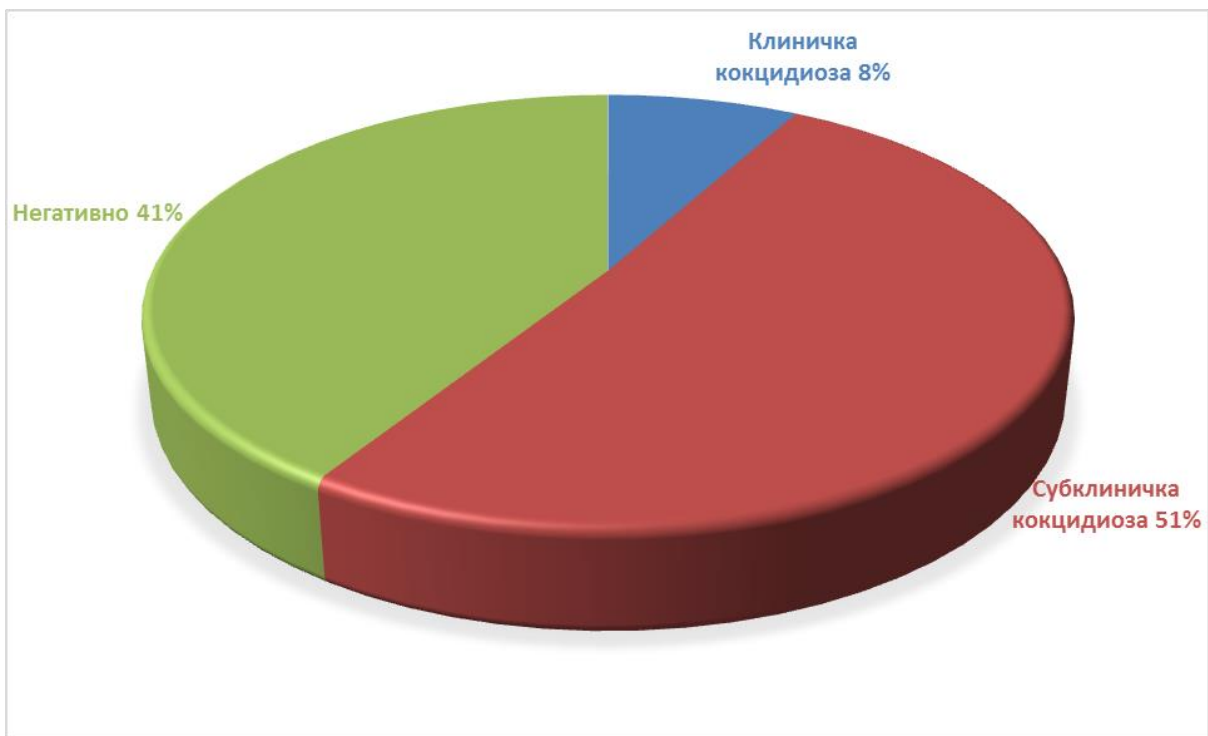
Инфекција кокцидијама је у највећем броју случајева била субклиничка. У 51 јату (51%), бројлера упркос присуству ооциста у фецесу, није било појаве клиничких симптома кокцидиозе. Клинички симптоми код бројлера били су изражени на 8 фарми (Графикон 2). Од клиничких симптома уочени су били: апатија, накомтрешено перје, опуштена крила, смањен унос хране и воде, запрљано перје у пределу око клоаке, дехидратација и присуство крви у фецесу.

Преваленција излованих врста *Eimeria* се разликовала. *E. acervulina* установљена је у 37% јата, *E. maxima* у 17%, *E. mitis* у 25% и *E. tenella* у 48% (Табела 12).

Табела 12. Преваленција врста *Eimeria* изолованих из товних пилића

Врста <i>Eimeria</i>	Број инфицираних јата	Процент инфицираних јата	Преваленција у односу на број инфицираних јата (%)
<i>E. acervulina</i>	37	37,0	62,71
<i>E. maxima</i>	17	17,0	28,81
<i>E. mitis</i>	25	25,0	42,37
<i>E. tenella</i>	48	48,0	81,35

На фармама са клинички испољеном инфекцијом у етиологији су учествовале следеће врсте ејмерија: *E. tenella*, *E. acervulina* и *E. maxima*. На највећем броју фарми установљенљена је била *E. tenella*.



Графикон 2. Преваленција субклиничке и клиничке кокцидиозе

5.6. Веза између примењених биосигурносних мера на фармама и појаве субклиничких и клиничких инфекција кокцидијама

У време сакупљања узорака фецеса бројлера на свим фармама спроведена је анкета са циљем да се прикупе подаци ради процениле биосигурносних мера. Прикупљани су подаци о власнику фарме, врсти простирке, хибриду пилића, старости и величини јата, примењеним кокцидиостатицима и мерама биосигурности, евентуалној појави кокцидиозе и/или секундарних инфекција у претходним циклусима производње. Биосигурносне мере су процењене на основу података који су сакупљени попуњавањем упитника (Табела 13).

Према Закону о добробити животиња (2009) „власник, односно држалац животиња је дужан да обезбеди: одговарајући и сигуран смештај животиње, као и микроклиматске услове, хигијену, довољно простора, слободу кретања, храну и воду која одговара врсти, раси, полу, старости и физичким, биолошким, производним

потребама и потребама у понашању животиње“. Затим, треба да обезбеди „заштиту животиња од штетног утицаја временских прилика, као и од природних непријатеља“, ... „одвојено држање животиња које узнемиравају једна другу или представљају опасност за друге животиње и људе“, као и „одвојено држање болесних, повређених и изнемоглих животиња, да о животињама брине потребан број обучених лица. Власник животиње дужан је да спречи настанак технопатија“. У складу са Законом, припремили смо упитник на основу кога је су процењене биосигурносне мере (Табела 13).

Статистичком анализом резултата анкете (засноване на подацима са сто фарми бројлера) одговарајућом статистичком методом утврђено је да редовно спровођење мера дезинфекције, дезинсекције и дератизације ($p < 0,001$), као и свих наведених биосигурносних мера заједно значајно ($p < 0,05$) могу утицати на смањење појаве ооциста кокцидија у узорцима измета, а самим тим и смањење учесталости инфекције кокцидијама.

Табела 13. Упитник о биосигурносним мерама на фармама

Биосигурносне мере	Број фарми				
	Спровођење мера				Ниво статист. значајности
	ДА		НЕ		
	Инфицирани	Неинфицирани	Инфицирани	Неинфицирани	
Примена принципа „све унутра – све напоље“	58	42	0	0	p>0,05
Постоји период „одмора“ објекта минимум 14 дана	30	22	20	28	p>0,05
Ограђеност дворишта фарме	44	47	6	3	p>0,05
Задовољавајућа хигијена дворишта фарме	10	5	40	45	p>0,05
Постојање дезинфекционе баријере за возила	31	40	19	10	p>0,05
Постојање дезинфекционе баријере за људе	50	50	0	0	p>0,05
Радници пресвлаче одећу и обућу пре уласка на фарму	43	47	7	3	p>0,05
Постојање предулаза	27	36	23	14	p>0,05
Редовно спровођење мера ДДД	9	26	41	24	p<0,001
Прописно одлагање лешева	36	43	14	7	p>0,05
Прање и дезинфекција опреме за храњење, појење и вентилацију	43	48	7	2	p>0,05
Контрола уласка посетилаца на фарму	35	37	15	13	p>0,05
Густина насељености до 15 пилића по m ²	34	35	16	15	p>0,05
Укупно	450	478	208	164	p<0,05

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Ефекти кокцидиостатика на параметре оксидативног стреса

Упркос бројним литературним подацима који указују да инфекција кокцидијама код пилића доводи до оксидативног стреса (Koinarski и сар., 2005; Georgieva и сар., 2006; Pourali и сар., 2014), ретки су они добијени на бројлерима третираним антикокцидијским супстанцама (Bozkurt и сар., 2016).

Праћење параметара оксидативног стреса након примене кокцидиостатика може дати корисне податке о њиховим могућим антиоксидативним ефектима. У нашем истраживању апликован је синтетски кокцидиостатик робенидин, биљни хербакокс, као и њихова комбинација код пилића инфицираних ејмеријама. Наши резултати су показали да су примењени кокцидиостатици значајно утицали на промену параметара оксидативног стреса (SOD, CAT, GST и MDA) код инфицирних пилића.

6.1.1. Утицај на активност SOD

Анализом крви пилића пре инфекције кокцидијама добијени су резултати који показују да је код пилића третираних антикокцидијским препаратима активност SOD (2733,68, 2723,34 и 2720,21 U/g Hb) била нижа него код контролних група (3292,66 и 3295,85 U/g Hb). Значајних разлика између контролних група, као и између третираних група у активности овог ензима није било. У крви пилића контролних група активност SOD пре инфекције кокцидијама је износила 3292,66 и 3295,85 U/g Hb (Рајић и сар., 2019), што је у сагласности са резултатима других аутора који су установили вишу вредност, 3044,6 U/g Hb у крви (Georgieva и сар., 2006) и 3472,5 U/g протеина у ткиву дуоденума (Liu и сар., 2016) у односу на инфициране јединке (2429 U/g Hb у крви и 2653,4 U/g протеина у ткиву дуоденума).

Резултати овог истраживања указали су на смањење активности SOD у крви пилића седам дана након инфекције (позитивна контрола). SOD је укључена у

антиоксидативни систем заштите, у прву линију одбране против ROS (Surai, 2016). Игра важну улогу у елиминисању ROS и заштити од оштећења ћелија и апоптозе, који настају услед њиховог утицаја. Нижа активност SOD у крви инфицираних јединки у односу на неинфициране је вероватно настала услед повећања производње H_2O_2 . Овај ензим катализује реакцију дисмутације супероксидног анјона до H_2O_2 и O_2 (Nikolić и сар., 2015). Смањење активности SOD код пилића инфицираних ејмеријама установили су и други аутори (Georgieva и сар., 2006; Pourali и сар., 2014; Liu и сар., 2016).

Примена антикокцидијских супстанци код инфицираних пилића резултирала је повећањем активности SOD, најизраженијим у Po+Херб групи (2765,0 U/g Hb), што је ублажило ефекат оксидативног стреса (Рајић и сар., 2019). Претпостављамо да су антикокцидијски адитиви спречили инактивацију SOD путем H_2O_2 (Nikolić-Kokić и сар., 2010), који настаје услед дисмутације супероксидног анјона. Vozkurt и сарадници (2016) су такође уочили значајно повећање активности SOD код пилића који су били инфицирани и третирани биљним кокцидиостатиком на бази уља оригана (67,3 у односу на 55,1 % инхибиције код позитивне контроле) и јонофорним антибиотиком монензином (60,3 у односу на 55,1 % инхибиције код позитивне контроле). Исти аутори су доказали да и комбинација монензина и биљног кокцидиостатика позитивно утиче на оксидативни статус пилића и смањује ефекте оксидативног стреса (60,7 у односу на 55,1 % инхибиције код позитивне контроле).

6.1.2. Утицај на активност САТ

Код пилића након третмана антикокцидијским супстанцама и инфекције кокцидијама праћена је активност САТ. У литератури нема објављених података који би приказали утицај комбинације биљних и синтетских антикокцидијских супстанци на активност САТ код инфицираних пилића. У нашем истраживању активност овог ензима 12. дана била је нижа код пилића у контролним групама (1580,42 U/g Hb) у односу на третиране пилиће (2630,77 U/g Hb у Po+Херб).

У нашем огледу, седам дана након инфекције, највиша активност САТ установљена је у крви пилића у позитивној контроли (4195,31 U/g Hb) а најнижа у

негативној (1617,56 U/g Hb) (Рајић и сар., 2019). Овај налаз је у сагласности са подацима Georgieva и сарадника (2006), који су такође установили значајну разлику у активности овог ензима између позитивне и негативне контроле. До сличних резултата дошли су и други аутори, који указују на повећање активности САТ код пилића инфицираних врстама *E. acervulina* и *E. tenella* (Koinarski и сар., 2005; Georgieva и сар., 2010; El-maksoud, 2014). Активност САТ се код оксидативног стреса повећава (Nikolić и сар., 2015), што се сматра компензаторним механизмом пилића инфицираних кокцидијама (Georgieva и сар., 2006). У овом истраживању, код група инфицираних бројлера које су добијале кокцидиостатике у храни забележено је смањење активности САТ (3089,44 у Po, 2176,55 у Po+Херб и 2989,47 U/g Hb у Херб групи) у односу на инфициране нетретираних пилиће (4195,31 U/g Hb), седам дана након инфекције. Међу испитаним третираним групама најнижа активност САТ 21. и 40. дана уочена је у Po+Херб групи (2176,55, односно 2250,61 U/g Hb), што значи да је комбинација два кокцидиостатика значајно утицала на смањење оксидоредукционог дисбаланса насталог као одговор на присуство паразита.

У узорцима крви пилића узетим на крају огледа, постојале су значајне разлике у активности САТ (3257,84 у Po, 2250,61 у Po+Херб и 2575,33 U/g Hb у Херб групи) између третираних група, као и између контролних група пилића (1523,38, односно 4114,68 U/g Hb). САТ игра веома битну улогу у очувању интегритета ћелије (Pamplona и Costantini, 2011) јер спречава настанак хидроксил радикала, који може изазвати ћелијско оштећење путем липидне пероксидације, оксидације ДНК и протеина (Arrioku, 2013).

6.1.3. Утицај на активност GST

Анализом активности GST пре инфекције кокцидијама, у нашем истраживању је доказана значајно виша вредност код пилића из третираних група у односу на контролне. Код пилића у третираним групама активност овог ензима била је 2,71, 2,69 и 2,74 U/g Hb, у односу на контролне пилиће, код којих су измерене вредности 2,27 и 2,29 U/g Hb (Рајић и сар., 2019).

У нашем истраживању седмог дана након инфекције доказали смо највишу активност GST код инфицираних пилића (3,61 U/g Hb) у поређењу са неинфицираним (2,14 U/g Hb) и третираним групама (3,04, 2,80 и 2,84 U/g Hb). Исту појаву код пилића, насталу деловањем спољних чинилаца, забележили су и Ismail и сарадници (2013).

GST учествује у заштити ћелије од штетног дејства ROS (Chikezie, 2015). У нашем истраживању установљена је нижа активност овог ензима код третираних група у поређењу са позитивном контролом (21. и 40. дана), на основу чега може да се претпостави да су антикоксидијски адитиви утицали на смањење продукције супстрата (ROS) и последично довели до смањене активности овог ензима. Најнижа активност GST је уочена код Po+Херб групе - 2,80 U/g Hb 21. дана и 2,79 U/g Hb 40. дана.

Иако у литератури нема података о активности GST после примене антикоксидијских супстанци, постоје објављени резултати истраживања спроведених са неким другим биљним препаратима. На пример, Giannenas и сарадници (2010) су установили да препарати на бази гљива повећавају активност GST и позитивно утичу на раст и искоришћавање хране, и стимулишу секрецију дигестивних ензима бројлера. Слично томе, доказано је и да биљни препарат на бази рузмарина код пилића испољава антиоксидативно дејство тако што повећава активност GST (Ghozlan и сар., 2017).

6.1.4. Утицај на концентрацију MDA

MDA настаје у процесу липидне пероксидације услед деловања ROS. Његова концентрација у крви и ткиву је директно пропорционална ћелијском оштећењу (Georgieva и сар., 2006). Резултати нашег истраживања показали су повећану концентрацију MDA код инфицираних пилића 21. и 40. дана (2,57 и 2,10 nmol/g Hb), што указује на повећан степен липидне пероксидације (Рајић и сар., 2019). Сличне податке о промени концентрације MDA објавили су и други аутори, који су установили повећан ниво MDA у крвној плазми (Georgieva и сар., 2006), мукози дуоденума (Liu и сар., 2016) и јетри инфицираних пилића (Pourali и сар., 2014).

Значајно смањење нивоа MDA је уочено код јединки које су добијале кокцидиостатике, што наводи на закључак да су они утицали на смањење продукције ROS и на тај начин довели до пада липидне пероксидације. У истраживању које су спровели Vozkurt и сарадници (2016) забележено је да биљни кокцидиостатици ублажавају ефекат оксидативног стреса тако што смањују концентрације MDA (9,05 $\mu\text{mol/L}$ у односу на 12,01 $\mu\text{mol/L}$ крвног серума). Giannenas и сарадници (2010) су установили да млевене сушене гљиве *Agaricus bisporus* унете храном имају антиоксидативна својства и смањују концентрацију MDA. Такође, доказано је биљни препарати на бази рузмарина смањују концентрацију MDA у мишићном ткиву бројлера (Ghozlan и сар., 2017).

6.1.5. Општа запажања о параметрима оксидативног стреса током трајања огледа

Посматрањем резултата наших испитивања активности ензима антиоксидативне заштите и концентрације производа липидне пероксидације може се уочити да је комбинација две антикокцидијске супстанце - робенидина и хербакокса - значајно ублажила оксидативни стрес, с обзиром да су вредности његових параметара код третираних пилића биле најближе неинфицираним јединкама. Робенидин је утицао на смањење броја ооциста код пилића, док је примена хербакокса деловала на повећан степен антиоксидативне одбране, што се одразило на добијене вредности параметара оксидативног стреса. На крају огледа у групи која је била третирана обема супстанцама, активност SOD била је значајно ($p < 0,05$) виша (2802,00 U/g Hb) у поређењу са позитивном контролом (1883,00 U/g Hb), активности CAT (2250,61 U/g Hb, у поређењу са 4114,68 U/g Hb у позитивној контроли) и GST (2,79 U/g Hb, насупрот 3,49 U/g Hb) значајно ниже, као и концентрација MDA (0,65 nmol/g Hb, насупрот 2,10 nmol/g Hb). Значајне разлике у вредностима параметара оксидативног стреса такође су биле испољене и у групи пилића која је добијала искључиво биљни антикокцидијски адитив, у односу на позитивну контролу. Овим је доказано да екстракти биљака (оригано, тимијан и коријандер) присутни у хербакоксу поседују значајна антиоксидативна својства. Они углавном садрже

биоактивна једињења као што су полифеноли, кинини, флавоноиди, алкалоиди и полипептиди. Фенолна једињења ароматичних биљака и њихова етерична уља су моћни извори природних антиоксиданата (Mohiti-Asli и Ghanaatparast-Rashti, 2015; Starčević и сар., 2015). Флавоноиди врше конверзију хидроксилне групе у прооксиданте при чему се оксидишу ROS и на тај начин заустављају оксидативне реакције (Masood и сар., 2013; Muthamilselvan и сар., 2016). Пилићи који су добијали хербакокс излучивали су ооцисте у већем броју у односу на остале две третиране групе (Po и Po+Херб), али је примењени биљни препарат испољио ефикасан антикокцидијски ефекат.

6.2. Утицај кокцидиостатика на производне параметре

Анализирајући добијене резултате производних параметара може се уочити да је најнижа просечна телесна маса (1858,68 g) на крају тога била код инфицираних нетретираних пилића, код којих је био и највећи FCR (2,76). Овај смањени прираст може да се припише инфекцији кокцидијама. Ооцисте кокцидија током свог развоја у дигестивном тракту пилића разарају ентероците, изазивају оштећења слузнице црева, отежавају апсорпцију храњљивих материја, отварају врата инфекције другим патогенима и директно утичу на прираст (Yegani и Korver, 2008; Adamu и сар., 2013; Charman, 2014). Поређењем телесних маса пилића у третираним групама на крају огледа уочава се да је највећа просечна телесна маса била код оних који су добијали робенидин (2618,70 g), и имали најмањи степен конверзије хране (1,69). Најнижа просечна телесна маса била је код пилића у групи која је добијала робенидин и хербакокс (2440,35 g). Повећан дневни прираст и телесна маса код пилића који су добијали синтетске и биљне антикокцидијске супстанце су уочени и у истраживањима других аутора. Assis и сарадници (2012) су установили да примена диклазурила смањује степен конверзије хране и повећава дневни прираст (1613 g 35. дана старости). Pourali и сарадници (2014) су доказали да се применом биљног антикокцидијског адитива на бази екстраката белог лука ублажавају штетни ефекти инфекције кокцидијама и значајно повећава дневни прираст. Позитивне ефекте биљних препарата на бази етеричних уља (пореклом од оригана, тимијана и белог

лука) у циљу превенције кокцидиозе и побољшања производних перформанси бројлера, су установили и Abou-Elkhair и сарадници (2014). Они су применом биљног и синтетског кокцидиостатика побољшали дневни прираст и телесну масу пилића (1840 g код група са биљним и 1577 g са синтетским, 35. дана старости) у односу на инфициране пилиће без третмана кокцидиостатиком (967 g). Позитиван ефекат на производне параметре добијен употребом хемијских и биљних антикокцидијских супстанци описали су и други аутори (Arczewska-Wlosek и Swiatkiewicz, 2012; Bozkurt и сар., 2012; Adulugba и сар., 2017). Биљне антикокцидијске супстанце, за разлику од синтетских, не остављају резидуе у месо пилића (Haselmeyer и сар., 2014), због чега се њихови антикокцидијски ефекти све више истражују (Abou-Elkhair и сар., 2014; Barbour и сар., 2015; Muthamilselvan и сар., 2016). Они у храни потпомажу прираст пилића и смањују FCR, што се може објаснити повећаном апсорпционом површином црева и бољом ензимском активношћу дигестивног система (Peek и Landman, 2011; Masood и сар., 2013; Bozkurt и сар., 2016).

Резултати добијени у овом истраживању показали су да су инфицирани третирани бројлери излучивали значајно мањи број ооциста у граму фецеса у односу на инфициране нетретирани пилиће. Најмањи просечан број ооциста био је установљен код пилића третираних робенидином, што показује његов добар антикокцидијски ефекат. Механизам деловања робенидина заснива се на инхибицији оксидативне фосфорилације у митохондријама паразита, чиме се спречава њихов раст (Charman, 1997; Peek и Landman, 2011; Kant и сар., 2013). Код пилића који су добијали робенидин и хербакокс, ооцисте су такође биле присутне у значајно мањем броју у односу на инфициране нетретирани пилиће, што указује да је ова комбинација антикокцидијских супстанци постигла добар антикокцидијски ефекат (Barbour и сар., 2015; Mohiti-Asli и Ghanaatparast-Rashti, 2015; Adulugba и сар., 2017).

6.3. Детерминација врста *Eimeria* и преваленција субклиничке кокцидиозе

Кокцидиоза представља једну најчешћих болести живине, која је одговорна за велике економске губитке у савременом живинарству широм света (Gharekhanі и сар., 2014). У литератури је описано седам врста *Eimeria* патогених за товне пилиће

(Long и сар., 1976; Prakashbabu и сар., 2017), које показују различите нивое патогености (Chapman, 2014). *E. necatrix*, *E. tenella* и *E. brunetti* сматрају се најпатогенијим, јер проузрокују крварења на слузници црева, ентеритис, потпуно оштећење слузнице са одвајањем епитела, као и висок морбидитет и морталитет код товних пилића. *E. acervulina* и *E. maxima* су умерено патогене, али могу изазвати малапсорпцију, малнутрицију и дехидратацију. Слабо патогеним се сматрају *E. mitis* и *E. praecox*, које могу изазвати повећан степен конверзије хране, смањену апсорпцију хране и смањен прираст пилића (Hafez, 2008; Chapman, 2014; Brown Jordan и сар., 2018).

У нашем истраживању анализирали смо узорке фецеса пореклом од 100 јата товних пилића са територије Војводине. Субклиничку кокцидиозу смо установили у 51 јату (51%), док је клиничка кокцидиоза установљена у 8 јата (8%). Ооцисте кокцидија нису доказане на 41 фарми. Субклиничка кокцидиоза је све више присутна на фармама и изазива велике економске проблеме због негативног утицаја на прираст и искористљивост хране. Она се сматра важним чиниоцем у настанку некротичног ентеритиса пилића, јер ствара услове за инфекцију врстом *Clostridium perfringens*. Један од главних фактора настанка субклиничке кокцидиозе је и резистенција *Eimeria* према антикокцидијским супстанцама (Shirzad и сар., 2011), која често настаје уколико се кокцидиостатски програми („shuttle“ и програм ротације) не спроводе плански.

Према резултатима других аутора (Shirzad и сар., 2011) субклиничка кокцидиоза је повезана са старошћу јата, па се тако најчешће јавља у узрасту пилића од 5 до 6 недеља. У нашем истраживању субклиничка кокцидиоза је уочена у узрасту пилића од 3 до 6 недеља, на 51% прегледаних фарми. Резултати једног истраживања на фармама товних пилића у Ирану показали су преваленцију субклиничке кокцидиозе од 75% (Shirzad и сар., 2011). Најзаступљенија је била *E. acervulina* са преваленцијом од 65,5%, затим *E. maxima* (17,7%), *E. tenella* (15,5%), *E. brunetti* (10%), док је *E. necatrix* установљена у 5,5% узорака (Shirzad и сар., 2011). Наши резултати се разликују, јер је најраширенија била *E. tenella* (48%), затим *E. acervulina* (37%), *E. mitis* (25%) и *E. maxima* (17%).

Gharekhani и сарадници (2014) су спровели истраживање о преваленцији кокцидиозе у Ирану на бројлерским фармама. Применом модификоване Мекмастер методе установили су присуство кокцидиозе на 31,8% фарми, а у етиологији су доминирале *E. acervulina* (75,7%), *E. tenella* (54,3%), *E. necatrix* (28,6%) и *E. maxima* (20,0%). Мешане инфекције су уочене на свим инфицираним фармама (Gharekhani и сар., 2014). Установљена преваленција кокцидиозе од 31,8% је нижа у односу на податке из нашег истраживања, где су такође доминирале *E. acervulina* (37%) и *E. tenella* (48%).

Друга група аутора (Arabkhazaeli и сар., 2011) спровела је истраживање такође у Ирану. Установљена је преваленција кокцидиозе од 30%. Детерминација врста *Eimeria* вршена је мерењем величине ооциста и на основу њиховог облика, а пронађене су *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. tenella* и *E. necatrix*. *E. maxima* је била најраширенија врста (Arabkhazaeli и сар., 2011). Установљена преваленција је била нижа у односу на податке добијене у нашем истраживању.

Nadipour и сарадници (2013) спровели су истраживање на 20 газдинстава у Ирану. Присуство ооциста кокцидија је установљено у 64% узорака. Детектоване су *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. necatrix* и *E. maxima*. *E. tenella* је била најдоминантнија (24%), затим *E. acervulina* (18%), *E. necatrix* (12%) и *E. maxima* (10%). Закључено је да је преваленција варирала у зависности од менаџмента фарме, али не и од броја једники у јату (Nadipour и сар., 2013). Преваленција инфекције је била слична нашим налазима, а у етиологији најчешће је учествовала такође *E. tenella*.

У истраживању спроведеном у Индији преваленција кокцидиозе на фармама пилића је износила 39,58%, што је нижи проценат него у нашем истраживању (59%). Детектовано је пет врста ејмерија, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. acervulina* и *E. mitis* (Sharma и сар., 2015), док су у нашем истраживању детерминисане четири врсте. *E. tenella* је била најзаступљенија, што је у складу са нашим резултатима. Pant и сарадници (2018) у истраживању спроведеном на бројлерским пилићима приказују преваленцију кокцидиозе од 60%. Доминантне врсте су биле *E. tenella* (66,6%), затим *E. maxima* (50%) и *E. necatrix* (33,3%) (Pant и сар., 2018).

Други аутори (Ahad и сар., 2015). такође у Индији су установили преваленцију кокцидиозе од 29,9%. Доказано је присуство пет врста кокцидија: *E. tenella* са заступљеношћу од 18,13%, *E. acervulina* 10,13%, *E. maxima* 8,26%, *E. necatrix* 7,2 % и *E. mitis* 1,86% (Ahad и сар., 2015). У поређењу са нашим резултатима установљен је нижи степен преваленције кокцидиозе. Ооцисте *E. tenella* су биле најчешће присутне, што је у сагласности са нашим подацима.

Kumar и сарадници (2014) су спровели истраживање у Индији, Египту, Либији и Великој Британији. Установили су преваленцију кокцидиозе од 71,9% на 139 фарми (Египат, Либија и Велика Британија) и 82,2% на 45 фарми (Индија), што представља вишу преваленцију у односу на наше резултате. Применом софтвера „СОССИМОРПН“ доказане су ооцисте *E. acervulina* 96,7%, *E. maxima* 36,7%, *E. mitis* 90,0%, *E. praecox* 3,3%, *E. necatrix* 23,3% и *E. tenella* 16,7%. Исти аутори су употребом nested PCR установили преваленцију *E. acervulina* 93,3%, *E. brunetti* 10,0%, *E. maxima* 86,7%, *E. mitis* 96,7%, *E. praecox* 66,7%, *E. necatrix* 80,0% и *E. tenella* 100%. Једном методом multiplex PCR установљена је преваленција *E. maxima* 16,7%, *E. mitis* 3,3%, *E. necatrix* 43,3%, *E. praecox* 3,3% и *E. tenella* 13,3%, а другом multiplex PCR нешто другачији резултати: *E. acervulina* 36,7%, *E. maxima* 43,3%, *E. mitis* 53,3%, *E. praecox* 56,7%, *E. necatrix* 6,7% и *E. tenella* 46,7% (Kumar и сар., 2014). У овом испитивању доказано је присуство више врста ејмерија у поређењу са нашим резултатима.

Преваленцију врста *Eimeria* на фармама товних пилића у Румунији истраживали су Györke и сарадници (2013). Доказали су присуство ооциста кокцидија у 91% узорака. Четири врсте *Eimeria* су детерминисане: *E. acervulina* (91%), *E. tenella* (61%), *E. maxima* (22%) и *E. praecox* (13%) (Györke и сар., 2013). Установљена преваленција *Eimeria* је виша у односу на наше резултате. Две доминантне врсте су биле *E. acervulina* и *E. tenella*, што је у сагласности са нашим налазима, али је код нас најзаступљенија била *E. tenella*.

Применом молекуларних техника (метода PCR) Sun и сарадници (2009) су у Кини (покрајина Шандунг) установили субклиничку инфекцију на 65,8% фарми. *E. tenella* и *E. praecox* су биле најдоминантније врсте, а поред њих заступљене су биле

E. acervulina, *E. maxima* и *E. mitis*. На већини фарми на којима је доказана субклиничка кокцидиоза у етиологији је учествовало више врста *Eimeria*, понекад и седам (Sun и сар., 2009). Ови резултати су слични нашим по преваленцији инфекције, као и по најзаступљенијим врстама ејмерија. Такође, у нашем истраживању у већини субклиничких инфекција у етиологији је учествовало две или више врста ејмерија.

У Турској је спроведено истраживање у које је било укључено 1110 бројлерских јата, пореклом са 817 фарми. Преваленција кокцидиозе је износила 56,2%. На основу морфолошких и морфометријских анализа идентификоване су ооците *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* и *E. tenella* у свим позитивним узорцима. Коришћењем молекуларних техника детектоване су ооците *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. praecox*, *E. tenella* (класичан PCR) и *E. mitis*, *E. brunetti* (nested PCR). Ооците *E. necatrix* нису пронађене молекуларним методама (Güven и сар., 2013). Из приложених резултата уочава се да се применом морфолошких и морфометријских метода проналази више врста *Eimeria*, али је њихов број у узорку вероватно био недовољан да би се детектовале молекуларним методама. Преваленција доказана у овом раду је слична оној коју смо ми установили у нашем истраживању.

Према подацима других аутора (Сисек и сар., 2016) преваленција клиничке кокцидиозе код бројлерских јата у Турској је износила 7,72%. Утврђена је значајна веза између учесталости клиничке кокцидиозе и старости пилића - највећи број позитивних узорака је потицао од пилића старих 36 до 42 дана. Детерминисане су четири врсте *Eimeria*: *E. brunetti* (35,48%), *E. necatrix* (35,48%), *E. maxima* (19,35%) и *E. tenella* (9,68%). Мешана инфекција је установљена у 45,83% узорака фецеса (Сисек и сар., 2016). Резултати овог истраживања указују на мању преваленцију кокцидиозе у односу на наше податке.

У неколико истраживања спроведених у Етиопији добијени су различити подаци о преваленцији кокцидиозе. На пример, Adamu (2015) је доказао присуство кокцидиозе на 60% фарми, а субклиничку инфекцију у 80% случајева. Идентификовао је шест врста ејмерија: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* и *E. tenella*. *E. tenella* је била доминантна (Adamu, 2015), као и у нашем

истраживању. Међутим, према подацима Negash и сарадника (2015), преваленција кокцидиозе је износила 20,1%, док су Luu и сарадници (2013) применом методе флотације и PCR теста дошли до података о преваленцији кокцидиозе од 56%. Од свих позитивних узорака, код 64% је била присутна инфекција са две или више врста *Eimeria* (Luu и сар., 2013). Подаци које су добили наведени аутори указују на преваленцију кокцидиозе од 20,1% до 60%, у оквиру којем се налази и наш налаз (59%).

Испитивање преваленције кокцидиозе у Бразилу истраживали су Meireles и сарадници (2004). Спровели су истраживање на фармама бројлерских пилића, на којима су прикупили 156 узорака фецеса. Методом PCR су установили да је 70 узорака (44,87%) позитивно на *E. praecox* и 45 (28,85%) на *E. mitis* (Meireles и сар., 2004). Друга група аутора спровела је истраживање у коме су поредили традиционалне и молекуларне методе дијагностике кокцидиозе. Испитивали су узорке сакупљене са фарми бројлерских пилића. Применом комбинације ових метода установили су присуство *Eimeria praecox* и *Eimeria maxima* у свим јатима, а преваленција осталих врста је износила: *Eimeria mitis* и *Eimeria necatrix* (93,3%), *Eimeria tenella* (76,7%), *Eimeria acervulina* (56,7%) и *Eimeria brunetti* (16,7%). Само на основу макроскопских оцена лезија на цревима установили су присуство *E. maxima* на 46,7% фарми, *E. acervulina* на 30%, *E. tenella* на 23,3% и *E. necatrix* на 10%, док *E. brunetti* и *E. praecox* нису идентификоване овом методом. Морфолошком детерминацијом ооциста установљено је присуство *E. brunetti* и *E. tenella* у 100% узорака, а *E. acervulina* у 63,3%. Закључено је су молекуларне методе поузданије за праћење преваленције кокцидиозе код живине, јер омогућавају бржу и сигурнију дијагностику субклиничких инфекција (Carvalho и сар., 2011). Њихова примена се показала ефикасном и у нашем истраживању.

Према подацима Godwin и Morgan (2015) у истраживању спроведеном у Аустралији, кокцидије су доказане у 98% бројлерских фарми и 81% фарми са испустом („free range“). На бројлерским фармама најдоминантније врсте биле су *E. acervulina* (67%), *E. maxima* (58%) и *E. mitis* (46%), док су *E. mitis* (54%) и *E. acervulina* (28%) биле најчешће установљене врсте на фармама са испустом (Godwin

и Morgan, 2015). Ови подаци показују сличност са нашим истраживањем у којем је доказано присуство истих врста ејмерија, али у различитом проценту.

У Нигерији је у десетогодишњем испитивању забележена укупна преваленција кокцидиозе од 41,3%, најчешће у бројлерским јатима (Ola-Fadunsin, 2017). Друга група аутора (Mohammed и Sunday, 2015) су доказали преваленцију од 52,9%, што је мање него у нашем истраживању.

Применом молекуларних техника установљена је преваленција кокцидиозе у Канади од 5,55%. Од укупно 360 испитаних узорака пореклом од пилића, само у 20 су пронађене кокцидије. *E. tenella* је доказана у 2,5% узорака, *E. maxima* у 1,38% узорака и *E. acervulina* у 0,27%. Мешана инфекција врстама *E. maxima* и *E. tenella* доказана је у 1,38% узорака (Ogedengbe и сар., 2011). Поређењем ових података са резултатима нашег истраживања уочава се значајно нижа преваленција кокцидиозе у Канади у односу на фарме у Војводини.

У истраживању спроведеном у Египту доказана је преваленција кокцидиозе од 21,24%. Идентификовано је пет врста ејмерија. *E. necatrix* је доказана у 58,27% узорака, *E. tenella* у 25,82%, *E. acervulina* у 19,20%, *E. mitis* у 10,59% и *E. maxima* у 4,66%. Најранији налаз ооциста кокцидија био је код пилића старих 3 недеље (Al-Gawad и сар., 2012). Преваленција кокцидиозе у Египту је нижа у односу на податке из нашег истраживања. Међутим, изоловане врсте ејмерија су у сагласности са нашим налазима.

У Пакистану Awais и сарадници (2012) спровели су истраживање на индустријским фармама бројлерских пилића. Установили су преваленцију кокцидиозе од 43,89%. Изоловане су честири врсте ејмерија. Највишу преваленцију имала је *E. tenella* (27,04%), затим *E. maxima* (22,42%), *E. acervulina* (19,89%) и *E. necatrix* (4,02%) (Awais и сар., 2012). Установљена преваленција нижа је у поређењу са преваленцијом у Војводини. Према подацима других аутора (Bachaya и сар., 2012) у истраживању спроведеном такође у Пакистану на фармама пилића лаке линије преваленција кокцидиозе је била 59,60%. Такође су изоловане четири врсте *Eimeria*: *E. maxima* у 30,20% узорака, *E. tenella* у 39,93%, *E. mitis* у 19,13% и *E. necatrix* у 10,74%. Око 60,16% позитивних узорака је потицало од пилића узраста 3 до 4 недеље

(Bachaya и сар., 2012). Подаци из овог истраживања показују сличан ниво преваленције као и наши резултати. У једном другом истраживању спроведеном на бројлерима установљена је преваленција кокцидиозе од 65%. Идентификоване су *E. tenella* (40,92%), *E. maxima* (31,38%), *E. mitis* (18,15%) и *E. necatrix* (9,53%). Највећи број позитивних узорака (око 65,95%) потицао је од пилића узраста 3 до 4 недеље (Bachaya и сар., 2015). Преваленција је била виша у односу на наше налазе.

Испитивање преваленције кокцидиозе на фармама бројлерских пилића у Алжиру спровели су Debbou-Ioukpane и сарадници (2018). Установили су присуство ооциста *Eimeria* у 63,26% узорака простирке и 71,55% узорака цревног садржаја. Мешане инфекције су установљене у 54,28% узорака. Идентификовано је пет врста *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima*, *E. brunetti* и *E. mitis*). *E. acervulina* и *E. tenella* су биле доминантне врсте са преваленцијом од 32,05%, односно 26,92% (Debbou-Ioukpane и сар., 2018). Преваленција кокцидиозе у Алжиру је виша у односу на ону која је доказана нашим истраживањем.

У испитивању спроведеном у Норвешкој на фармама бројлерских пилића доказано је присуство четири врсте ејмерија. Преваленција је износила: *E. acervulina* 100,0%, *E. maxima* 27,5%, *E. praecox* 9,8% и *E. tenella* 76,5% (Haug и сар., 2008). Најдоминантније врсте ејмерија су била *E. acervulina* и *E. tenella*, што је у сагласности са нашим резултатима.

Преваленција кокцидиозе у Тунису на фармама са слободним начином држања пилића („free-range“) је износила 31,8%. Детерминисане су три врсте ејмерија. Преваленција *E. tenella* је била 61,5%, *E. maxima* 12,0% и *E. acervulina* 1,5%. Мешана инфекција је установљена у 26,5% узорака (Kaboudi и сар., 2016). Ови подаци указују на доминантно присуство врсте *E. tenella*, што је у сагласности са нашим резултатима.

Према подацима из Пољске у истраживању спроведеном код пилића који се држе у слободном начину узгоја („free-range“) доказана је инфекција кокцидијама у 32,7% јата (Tomza-Marciniak и сар., 2014), што је нижи проценат у односу на наше резултате (59%).

6.4. Биосигурносне мере на фармама и њихов утицај на појаву кокцидиозе

Примена биосигурносних мера на фармама товних пилића је један од битних предуслова за превенцију појаве болести уопште, а нарочито кокцидиозе (Sharma, 2010). Правилно управљање фармом и добра организација производње имају значајну улогу у спречавању појаве или ширења кокцидиозе, јер су ооцисте свеприсутне у природи и лако се могу преносити у оквиру фарме (Khan и сар., 2006). Због високог репродуктивног потенцијала ејмерија, врло је тешко обезбедити амбијенталне услове слободне од кокцидија, посебно на савременим фармама са интензивним начином узгоја пилића. На великим индустријским фармама најчешће се у једном дворишту налази више објеката, а веома често су присутне различите старосне категорије. Такође, најчешће радници опслужују више објеката, што повећава ризик од преношења ејмерија преко обуће и опреме (Davou и сар., 2015). Увођењем мере обавезног пресвлачења и преобувања радника приликом преласка из објекта у објекат, овај ризик се може смањити (Williams, 1995). Након излучивања из организма пилета ооцисте брзо спорулишу и могу дуго преживети у простирци. Њихово преживљавање могу нарушити амонијак, висока температура, бактерије и неки други микроорганизми у простирци (Williams, 1995, Allen и Fetterer, 2002). Биосигурносне мере на фарми су један је од најважнијих предуслова како би се превенирала појава болести (Sharma, 2010).

На основу статистичке обраде података добијених током спроведене анкете (попуњавањем упитника на сто фарми бројлера) у нашем истраживању утврђено је да редовно спровођење мера дезинфекције, дезинсекције и дератизације ($p < 0,001$), као и свих наведених биосигурносних мера заједно значајно ($p < 0,05$) могу утицати на смањење појаве ооциста кокцидија у узорцима измета, а самим тим и смањење учесталости инфекције кокцидијама.

Могућност процене биосигурносних мера на фарми на основу примене одговарајућег упитника доказано је и у истраживању које су спровели Nesresa и сарадници (1997). Graat и сарадници (1998) указују на значајност примене хигијенских мера на фармама као меру превенције кокцидиозе. Они наводе да је

тешко доказати факторе који доприносе појави кокцидиозе, али да на то утичу лош хигијенски статус фарме (ДДД), коришћење исте одеће у више објеката за узгој пилића, присуство других животиња на фарми, системи за храњење и појење који се тешко перу и чисте, радници који раде и на другим фармама (Graat и сар., 1998).

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања закључено је следеће:

1. Примена синтетског (робенидин) и биљног антикокцидијског адитива (Хербакокс) у концентрацијама које препоручују произвођачи значајно утиче на промене параметара оксидативног стреса код третираних инфицираних пилића у поређењу са инфицираним нетретираним пилићима.
2. Значајно ниже ($p < 0,05$) активности CAT и GST, и нивоа MDA, као и повећана активност SOD код третираних група у односу на K+ групу пилића 21. и 40. дана огледа, указују да антикокцидијске супстанце могу да смање оксидативни стрес код инфицираних пилића.
3. Примењени антикокцидијски адитиви довели су до статистички значајног ($p < 0,05$) смањења броја излучених ооциста код инфицираних пилића. Током огледа број ооциста по граму фецеса био је значајно мањи ($p < 0,05$) у групама Po и Po+Херб, у поређењу са групом Херб. Број ооциста у K+ остао је сигнификантно виши ($p < 0,05$) током целог огледа.
4. Синтетски антикокцидијски адитив и комбинација оба адитива (синтетски и биљни) дали су бољи ефекат у превенцији кокцидиозе у односу на ефекат адитива на биљној бази. Међутим, резултати указују да се и сам биљни адитив може користити у спречавању појаве кокцидиозе.
5. Резултати овог истраживања могу помоћи у избору антикокцидијских адитива и директно утицати на смањење економских губитака проузрокованих кокцидиозом.
6. Пилићи који су добијали робенидин постигли су највећу телесну масу, значајно ($p < 0,05$) вишу у односу на остале експерименталне групе. Такође, код њих је уочен и најнижи степен конверзије хране ($FCR=1,69$).

7. Применом модификоване методе по МекМастеру на 59% испитиваних фарми бројлерских пилића (n=100) установљена је присуство ооциста кокцидија, што су потврдили и налази молекуларногенетичке дијагностике (PCR).
8. На 51% прегледаних фарми установљена је супклиничка инфекција кокцидијама, а клинички испољена инфекција на 8%.
9. Молекуларном методом су идентификоване четири врсте *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* и *E. tenella*, чија је учесталост била: *E. tenella* 48%, *E. acervulina* 37%, *E. mitis* у 25% и *E. maxima* 17%.
10. Редовно спровођење мера дезинфекције, дезинсекције и дератизације (посматране независно од осталих биосигурносних мера), као и свих биосигурносних мера заједно могу значајно ($p < 0,001$, односно $p < 0,05$) утицати на смањење учесталости инфекције кокцидијама.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdelrahman, W., Mohnl, M., Teichmann, K., Doupovec, B., Schatzmayr, G., Lumpkins, B., & Mathis, G. (2014). Comparative evaluation of probiotic and salinomycin effects on performance and coccidiosis control in broiler chickens. *Poultry science*, 93(12), 3002-3008.
2. Abou-Elkhair, R., Gaafar, K. M., Elbahy, N. M., Helal, M. A., Mahboub, H. D., & Sameh, G. (2014). Bioactive effect of dietary supplementation with essential oils blend of oregano, thyme and garlic oils on performance of broilers infected with *Eimeria* species. *Global Veterinaria*, 13(6), 977-985.
3. Abudabos, A. M., Alyemni, A. H., Swilam, E. O., & Al-Ghadi, M. (2017). Comparative anticoccidial effect of some natural products against *Eimeria* spp. infection on performance traits, intestinal lesion and oocyte number in broiler. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(6), 1989-1995.
4. Adamu, M., Boonkaewwan, C., Gongruttananun, N., & Vongpakorn, M. (2013). Hematological, biochemical and histopathological changes caused by coccidiosis in chickens. *Kasetsart Journal*, 47(3), 238-246.
5. Adamu, M. (2015). Evaluation of risk factors associated with coccidiosis in broiler farms of selected towns of Ethiopia. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1), 34-40.
6. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology*, Vol. 105, pp. 121-126.
7. Ahad, S., Tanveer, S., & Malik, T. A. (2015). Seasonal impact on the prevalence of coccidian infection in broiler chicks across poultry farms in the Kashmir valley. *Journal of parasitic diseases*, 39(4), 736-740.
8. Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A., & Smet, S. (2016). Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 37, 1-14.
9. Al-Gawad, A. A., Mahdy, O. A., El-Massry, A. A., & Al-Aziz, M. S. (2012). Studies on coccidia of Egyptian Balady breed chickens. *Life Science Journal*, 9(3), 568-576.
10. Allen, P. C., & Fetterer, R. H. (2002). Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical microbiology reviews*, 15(1), 58-65.
11. Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive

- oxygen species on the testis. *Journal of reproduction & infertility*, 14(4), 158-172.
12. Arabkhazaeli, F., Nabian, S., Modirsaneii, M., Mansoori, B., & Rahbari, S. (2011). Biopathologic characterization of three mixed poultry *Eimeria* spp. isolates. *Iranian journal of parasitology*, 6(4), 23-32.
 13. Arczewska-Wlosek, A., & Swiatkiewicz, S. (2012). The effect of a dietary herbal extract blend on the performance of broilers challenged with *Eimeria* oocysts. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(1), 133-142.
 14. Awais, M. M., Akhtar, M., Iqbal, Z., Muhammad, F., & Anwar, M. I. (2012). Seasonal prevalence of coccidiosis in industrial broiler chickens in Faisalabad, Punjab, Pakistan. *Tropical animal health and production*, 44(2), 323-328.
 15. Bachaya, H. A., Raza, M. A., Khan, M. N., Iqbal, Z., Abbas, R. Z., Murtaza, S., & Badar, N. (2012). Predominance and detection of different *Eimeria* species causing coccidiosis in layer chickens. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 22(3), 597-600.
 16. Bachaya, H. A., Abbas, R. Z., Raza, M. A., Iqbal, Z., Rehman, T. U., Baber, W., & Hussain, R. (2015). Existence of coccidiosis and associated risk factors in broiler chickens in Southern Punjab, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(1), 81-84.
 17. Badran, I., & Lukesova, D. (2006). Control of coccidiosis and different coccidia of chicken in selected technologies used in tropics and subtropics. *Agricultura tropica et subtropica*, 39(1), 39-43.
 18. Barbour, E. K., Bragg, R. R., Karrouf, G., Iyer, A., Azhar, E., Harakeh, S., & Kumosani, T. (2015). Control of eight predominant *Eimeria* spp. involved in economic coccidiosis of broiler chicken by a chemically characterized essential oil. *Journal of applied microbiology*, 118(3), 583-591.
 19. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
 20. Blake, D. P., Qin, Z., Cai, J., & Smith, A. L. (2008). Development and validation of real-time polymerase chain reaction assays specific to four species of *Eimeria*. *Avian pathology*, 37(1), 89-94.
 21. Blake, D. P., & Tomley, F. M. (2014). Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in parasitology*, 30(1), 12-19.
 22. Blake, D. P., Hesketh, P., Archer, A., Carroll, F., Shirley, M. W., & Smith, A. L. (2005). The influence of immunizing dose size and schedule on immunity to subsequent challenge with antigenically distinct strains of *Eimeria maxima*. *Avian pathology*, 34(6), 489-494.

23. Blake, D. P., Pastor-Fernández, I., Nolan, M. J., & Tomley, F. M. (2017). Recombinant anticoccidial vaccines-a cup half full?. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 55, 358-365.
24. Bozkurt, M., Selek, N., Küçükyılmaz, K., Eren, H., Güven, E., Çatli, A. U., & Çınar, M. (2012). Effects of dietary supplementation with a herbal extract on the performance of broilers infected with a mixture of *Eimeria* species. *British poultry science*, 53(3), 325-332.
25. Bozkurt, M., Ege, G., Aysul, N., Akşit, H., Tüzün, A.E., Küçükyılmaz, K., Borum, A.E., et al. (2016). "Effect of anticoccidial monensin with oregano essential oil on broilers experimentally challenged with mixed *Eimeria* spp.," *Poultry Science*, Vol. 95 No. 8, pp. 1858–1868.
26. Brown Jordan, A., Blake, D., Beard, J., Beharry, A., Serrette, L., Soleyn, A., ... & Oura, C. (2018). Molecular Identification of *Eimeria* Species in Broiler Chickens in Trinidad, West Indies. *Veterinary sciences*, 5(1), 12, 1-7.
27. Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Teixeira, M., Carneiro, J. A. M., Melo, A. D. B., & Albuquerque, G. R. (2011). Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Veterinary parasitology*, 176(2-3), 95-100.
28. Chapman, H. D. (1997). Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian pathology*, 26(2), 221-244.
29. Chapman, H. D. (2007). Rotation programmes for coccidiosis control. *International Poultry Production*, 15(1), 7-9.
30. Chapman, H. D., & Rayavarapu, S. (2007). Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens reared on new or reused litter. *Avian pathology*, 36(4), 319-323.
31. Chapman, H. D., Jeffers, T. K., & Williams, R. B. (2010). Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry science*, 89(9), 1788-1801.
32. Chapman, H. D. (2014). Milestones in avian coccidiosis research: a review. *Poultry science*, 93(3), 501-511.
33. Chikezie, P. C. (2015). Glutathione S-transferase Activity in Diagnostic Pathology. *Metabolomics*, 5(153), 2153-0769.
34. Cicek, H., Cicek, H., Keleş, H., Tandoğan, M., & Eser, M. (2016). The Prevalence of Clinical Coccidiosis and the Estimation of the Costs of Disease Control and Treatment in Broiler Production. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 22(4), 525-528.
35. Conway, D. P., & McKenzie, M. E. (2007). Poultry coccidiosis: diagnostic and testing procedures, Third Edition. John Wiley & Sons, 7-40.

36. Cornelissen, J. B. W. J., Swinkels, W. J. C., Boersma, W. A., & Rebel, J. M. J. (2009). Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima* and *tenella*: a cumulation of single responses. *Veterinary parasitology*, 162(1-2), 58-66.
37. Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Slijepcevic, D., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2016). Molecular detection and prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses of central Balkan. *Acta Parasitologica*, 61(2), 337-342.
38. Dalloul, R. A., & Lillehoj, H. S. (2006). Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert review of vaccines*, 5(1), 143-163.
39. Dalloul, R. A., Bliss, T. W., Hong, Y. H., Ben-Chouikha, I., Park, D. W., Keeler, C. L., & Lillehoj, H. S. (2007). Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. *Molecular immunology*, 44(4), 558-566.
40. Davou, M. G., Kumbish, P. R., Barde, I. J., Ahmed, J. S., Olabode, H. O. K., & Wungak, Y. S. A (2015). Retrospective Study on Chicken Coccidiosis in Ilorin, Kwara State, Nigeria. *Direct Research Journal of Agriculture and Food Science*, Vol.3 (5), 93-97.
41. De Gussem, M. (2007), Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. Proceedings of the 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, 253–261.
42. Debbou-Iouknane, N., Benbarek, H., & Ayad, A. (2018). Prevalence and aetiology of coccidiosis in broiler chickens in Bejaia province, Algeria. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 85(1), 1-6.
43. Delaplane, J. F., Batchelder, R. M., & Higgins, T. C. (1947). Sulfaquinoxaline in the prevention of *Eimeria tenella* infections in chickens. *The North American veterinarian*, 28(1), 19-24.
44. Delić, N., Drašković, V., Stevanović, J., Savić, B., Lakić, N., Bošnjak-Neumüller, J., & Stanimirović, Z. (2018). The efficacy of two phytogenic feed additives in a control of swine dysentery. *Acta Veterinaria-Beograd* 68 (2) 178-189.
45. Del Vesco, A. P., & Gasparino, E. (2013). Production of reactive oxygen species, gene expression, and enzymatic activity in quail subjected to acute heat stress. *Journal of animal science*, 91(2), 582-587.
46. Dhawan, V. (2014). Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations. *Studies on Respiratory Disorders* . Humana Press, New York, 27-47.
47. Draskovic, V., Bosnjak-Neumuller, J., Vasiljevic, M., Petrujkic, B., Aleksic, N., Kukolj, V., & Stanimirovic, Z. (2018). Influence of phytogenic feed additive on

- Lawsonia intracellularis infection in pigs. *Preventive veterinary medicine*, 151, 46-51.
48. Đukić, M. M. (2008). Oksidativni stres-slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi, Mono i Manjana.
 49. Eckert J., Braun R., Shirley M. W., & Coudert, P. (1995). EUR 16602 - Guidelines on techniques in coccidiosis research, Luxembourg: *Office for Official Publications of the European Communities*, XVI, 306.
 50. El-Maksoud, A., Afaf, H. A., Abdel-Magid, D., & El-Badry, M. A. (2014). Biochemical effect of coccidia infestation in laying hen. *Benha veterinary medical journal*, 26(1), 127-133.
 51. Erdoğmuş S. Z., Gülmez N., Fındık A., Şah H. & Gülmez M. (2019). Efficacy of probiotics on health status and growth performance of *Eimeria tenella* infected broiler chickens. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25 (3): 311-320.
 52. Estévez, M. (2015). Oxidative damage to poultry: from farm to fork. *Poultry Science*, 94(6), 1368-1378.
 53. Georgieva, N. V., Koinarski, V., & Gadjeva, V. (2006). Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *The Veterinary Journal*, 172(3), 488-492.
 54. Georgieva, N. V., Koinarski, V., & Gabrashanska, M. (2010). Combined effect of Cygro® and vitamin E on oxidative stress status of broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Agricultural Science and Technology*, 2(4), 191-196.
 55. Gharekhani, J., Sadeghi-Dehkordi, Z., & Bahrami, M. (2014). Prevalence of coccidiosis in broiler chicken farms in Western Iran. *Journal of veterinary medicine*, 2014, 1-4.
 56. Girotti, M. J., Khan, N., & McLellan, B. A. (1991). Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *The Journal of trauma*, 31(1), 32-35.
 57. Godwin, R. M., & Morgan, J. A. (2015). A molecular survey of *Eimeria* in chickens across Australia. *Veterinary parasitology*, 214(1-2), 16-21.
 58. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271.
 59. Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004). Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 53(suppl 1), S110-S118.
 60. Graat, E. A. M., Van der Kooij, E., Frankena, K., Henken, A. M., Smeets, J. F. M., &

- Hekerman, M. T. J. (1998). Quantifying risk factors of coccidiosis in broilers using on-farm data based on a veterinary practice. *Preventive veterinary medicine*, 33(1-4), 297-308.
61. Güven, E., Beckstead, R. B., Kar, S., Vatansever, Z., & Karaer, Z. (2013). Molecular identification of *Eimeria* species of broiler chickens in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 60(4), 245-250.
 62. Györke, A., Pop, L., & Cozma, V. (2013). Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. *Parasite*, 20, 50, 1-8.
 63. Hadipour, M. M., Olyaie, A., Naderi, M., Azad, F., & Nekouie, O. (2011). Prevalence of *Eimeria* species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5(20), 3296-3299.
 64. Hafez, H. M. (2008). Poultry coccidiosis: Prevention and control approaches. *Archiv Fur Geflugelkunde*, 72(1), 2-7.
 65. Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.
 66. Haselmeyer, A., Zentek, J., & Chizzola, R. (2015). Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(3), 504-508.
 67. Haug, A., Williams, R. B., & Larsen, S. (2006). Counting coccidial oocysts in chicken faeces: a comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method. *Veterinary parasitology*, 136(3-4), 233-242.
 68. Haug, A., Thebo, P., & Mattsson, J. G. (2007). A simplified protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2), 35-45.
 69. Haug, A., Gjevre, A. G., Skjerve, E., & Kaldhusdal, M. (2008). A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway. *Avian Pathology*, 37(3), 333-341.
 70. Ismail, I. B., Al-Busadah, K. A., & El-Bahr, S. M. (2013). Oxidative stress biomarkers and biochemical profile in broilers chicken fed zinc bacitracin and ascorbic acid under hot climate. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3, 202-214.
 71. Johnson, J., & Reid, W. M. (1970). Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental parasitology*, 28(1), 30-36.
 72. Kaboudi, K., Umar, S., & Munir, M. T. (2016). Prevalence of coccidiosis in free-

- range chicken in Sidi Thabet, Tunisia. *Scientifica*, 2016, 1-6.
73. Kant, V., Singh, P., Verma, P. K., Bais, I., Parmar, M. S., Gopal, A., & Gupta, V. (2013). Anticoccidial Drugs Used in the Poultry: An Overview. *Science International*, 1: 261-265.
 74. Kehrer, J. P., & Klotz, L. O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical reviews in toxicology*, 45(9), 765-798.
 75. Khaier, M. A., Salih, M. A., & Abukashawa, S. M. (2015). Molecular Characterization of *Eimeria acervulina* in Broiler Chickens. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 569-572.
 76. Khan, M. Q., Irshad, H., Anjum, R., Jahangir, M., & Nasir, U. (2006). Eimeriosis in poultry of Rawalpindi/Islamabad area. *Pakistan Veterinary Journal*, 26(2), 85-87.
 77. Koinarski, V., Georgieva, N., Gadjeva, V., & Petkov, P. (2005). Antioxidant status of broiler chickens, infected with *Eimeria acervulina*. *Revue de médecine vétérinaire*, 156(10), 498-502.
 78. Kumar, S., Garg, R., Moftah, A., Clark, E. L., Macdonald, S. E., Chaudhry, A. S., ... & Blake, D. P. (2014). An optimised protocol for molecular identification of *Eimeria* from chickens. *Veterinary parasitology*, 199(1-2), 24-31.
 79. Li, G., Lillehoj, E. P., & Lillehoj, H. S. (2002). Interleukin-2 production in SC and TK chickens infected with *Eimeria tenella*. *Avian diseases*, 46(1), 2-9.
 80. Liu, Y. X., Liu, Y. L., Yang, J. P., & Li, W. T. (2016). Effects of dietary conjugated linoleic acid on the duodenal mucosal immunity response and redox status of broiler chicks infected with *Eimeria acervulina*. *Czech Journal of Animal Science*, 61(4), 186-193.
 81. Long, P. L., Millard, B. J., Joyner, L. P., & Norton, C. C. (1976). A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Veterinaria Latina*, 6(3), 201-217.
 82. Long, P. L., & Joyner, L. P. (1984). Problems in the identification of species of *Eimeria*. *The Journal of protozoology*, 31(4), 535-541.
 83. Luu, L., Bettridge, J., Christley, R. M., Melese, K., Blake, D., Dessie, T., ... & Terfa, Z. G. (2013). Prevalence and molecular characterisation of *Eimeria* species in Ethiopian village chickens. *BMC veterinary research*, 9(1), 208, 1-6.
 84. Masood, S., Abbas, R. Z., Iqbal, Z., Mansoor, M. K., Sindhu, Z. U. D., Zia, M. A., & Khan, J. A. (2013). Role of Natural Antioxidants for the Control of Coccidiosis in Poultry. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(4), 401-407.

85. McDougald, L. R. (1998). Intestinal protozoa important to poultry. *Poultry science*, 77(8), 1156-1158.
86. Meireles, M. V., Roberto, L. O., & Riera, R. F. (2004). Identification of *Eimeria mitis* and *Eimeria praecox* in broiler feces using polymerase chain reaction. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 6(4), 249-252.
87. Mihaljev, Ž. (2013). Selen i avijarni antioksidativni kapacitet pilića. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, 17-26.
88. Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, 247(10), 3170-3175.
89. Mohammed, B. R., & Sunday, O. S. (2015). An overview of the prevalence of avian coccidiosis in poultry production and its economic importance in Nigeria. *Veterinary Research International*, 3(3), 35-45.
90. Mohiti-Asli, M., & Ghanaatparast-Rashti, M. (2015). Dietary oregano essential oil alleviates experimentally induced coccidiosis in broilers. *Preventive veterinary medicine*, 120(2), 195-202.
91. Muthamilselvan, T., Kuo, T. F., Wu, Y. C., & Yang, W. C. (2016). Herbal remedies for coccidiosis control: A review of plants, compounds, and anticoccidial actions. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016, 1-19.
92. Negash, A., Mohamed, A., & Wondimu, K. (2015). Study on Prevalence and Risk Factors Associated with Poultry Coccidiosis in and Around Hawassa Town, South Ethiopia. *British Journal of Poultry Sciences*, 4(2), 34-43.
93. Nespeca, R., Vaillancourt, J. P., & Morrow, W. M. (1997). Validation of a poultry biosecurity survey. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(1-2), 73-86.
94. Nikolić, T. V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., Stanimirović, Z., ... & Blagojević, D. P. (2015). Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 90(4), 181-194.
95. Nikolić-Kokić, A., Blagojević, D., & Spasić, M. (2010). Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes. *Journal of Medical Biochemistry*, 29(3), 189-195.
96. Ogedengbe, J. D., Hunter, D. B., & Barta, J. R. (2011). Molecular identification of *Eimeria* species infecting market-age meat chickens in commercial flocks in Ontario. *Veterinary parasitology*, 178(3-4), 350-354.
97. Oladiran, A., Hitchen, S. J., Katzenback, B. A., & Belosevic, M. (2010). Biology of select zoonotic protozoan infections of domestic animals. *Veterinary Science*, 253-

274.

98. Ola-Fadunsin, S. D. (2017). Investigations on the Occurrence and Associated Risk Factors of Avian Coccidiosis in Osun State, Southwestern Nigeria. *Journal of parasitology research*, 2017, 1-6.
99. Pajić, M., Aleksić, N., Vejnović, B., Polaček, V., Novakov, N., Andrić, D. O., & Stanimirović, Z. (2019). Influence of Anticoccidials on Oxidative Stress, Production Performance and Faecal Oocyst Counts in Broiler Chickens Infected with *Eimeria* Species. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25(3), 379-385.
100. Pamplona, R., & Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(4), R843-R863.
101. Pant, S., Bhatt, P., Shekhar, S., & Krishna, G. (2018). Epidemiological Investigation of Poultry Coccidiosis in and around Tarai Region of Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(7): 374-380.
102. Peek, H. W. (2010). Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers, Doctoral dissertation, Utrecht University, 1-105.
103. Peek, H. W., & Landman, W. J. M. (2003). Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathology*, 32(4), 391-401.
104. Peek, H. W., & Landman, W. J. M. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary quarterly*, 31(3), 143-161.
105. Peek, H. W., Ter Veen, C., Dijkman, R., & Landman, W. J. M. (2017). Validation of a quantitative *Eimeria* spp. PCR for fresh droppings of broiler chickens. *Avian Pathology*, 46(6), 615-622.
106. Pellerdy, L. P. 1974. *Coccidia and Coccidiosis*, 2nd ed. Akademi Kiado, Budapest, 1-959.
107. Pourali, M., Kermanshahi, H., Golian, A., Razmi, G. R., & Soukhtanloo, M. (2014). Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(3), 227-232.
108. Prakashbabu, B. C., Thenmozhi, V., Limon, G., Kundu, K., Kumar, S., Garg, R., ... & Banerjee, P. S. (2017). *Eimeria* species occurrence varies between geographic regions and poultry production systems and may influence parasite genetic diversity. *Veterinary parasitology*, 233, 62-72.

109. Price, K. R., & Barta, J. R. (2010). Immunological control of coccidiosis in poultry. *Studies by Undergraduate Researchers at Guelph Journal*, 4(1), 101-108.
110. Price, K. R., Hafeez, M. A., Bulfon, J., & Barta, J. R. (2016). Live *Eimeria* vaccination success in the face of artificial non-uniform vaccine administration in conventionally reared pullets. *Avian Pathology*, 45(1), 82-93.
111. Radakovic, M., Davitkov, D., Borozan, S., Stojanovic, S., Stevanovic, J., Krstic, V., & Stanimirovic, Z. (2016). Oxidative stress and DNA damage in horses naturally infected with *Theileria equi*. *The Veterinary Journal*, 217, 112-118.
112. Razmi, G. R., & Kalideri, G. A. (2000). Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(3-4), 247-253.
113. Quiroz-Castañeda, R. E., & Dantán-González, E. (2015). Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed research international*, 2015, 1-11.
114. Saif, Y.M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K. & Swayne D. E. (2008). Diseases of Poultry 12th Edition, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA, 1067-1085.
115. Sharma, B. (2010). Poultry production, management and bio-security measures. *Journal of Agriculture and Environment*, 11, 120-125.
116. Sharma, S., Iqbal, A., Azmi, S., Mushtaq, I., Wani, Z. A., & Ahmad, S. (2015). Prevalence of poultry coccidiosis in Jammu region of Jammu & Kashmir State. *Journal of parasitic diseases*, 39(1), 85-89.
117. Shivaramaiah, C., Barta, J. R., Hernandez-Velasco, X., Téllez, G., & Hargis, B. M. (2014). Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 5, 23-34.
118. Shirzad, M. R., Seifi, S., Gheisari, H. R., Hachesoo, B. A., Habibi, H., & Bujmehrani, H. (2011). Prevalence and risk factors for subclinical coccidiosis in broiler chicken farms in Mazandaran province, Iran. *Tropical animal health and production*, 43(8), 1601-1604.
119. Shojaei, S. S. R. (2014). Evaluation of experimental coccidiosis in two commercial strains of broiler chicken by lesion scoring and opg quantitation. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 4(2), 355-360.
120. Sivaseelan, S., Vijayakumar, S., Malmarugan, S., Balachandran, P., & Balasubramaniam, G. A. (2013). Assessment of predisposing effect of coccidiosis to necrotic enteritis in broiler chickens. *Veterinarski arhiv*, 83(6), 653-664.

121. Stanimirović, Z., Glavinić, U., Lakić, N., Radović, D., Ristanić, M., Tarić, E., & Stevanović, J. (2017). Efficacy of plant-derived formulation "Argus Ras" in *Varroa destructor* control. *Acta Veterinaria*, 67(2), 191-200.
122. Starčević, K., Krstulović, L., Brozić, D., Maurić, M., Stojević, Z., Mikulec, Ž., ... & Mašek, T. (2015). Production performance, meat composition and oxidative susceptibility in broiler chicken fed with different phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(6), 1172-1178.
123. Stiff, M. I., & Bafundo, K. W. (1993). Development of immunity in broilers continuously exposed to *Eimeria* sp. *Avian Diseases*, 37, 295-301.
124. Sun, X. M., Pang, W., Jia, T., Yan, W. C., He, G., Hao, L. L., ... & Suo, X. (2009). Prevalence of *Eimeria* species in broilers with subclinical signs from fifty farms. *Avian diseases*, 53(2), 301-305.
125. Surai, P. F. (2016). Antioxidant systems in poultry biology: superoxide dismutase. *Journal of Animal Research and Nutrition*, 1(1), 8, 1-17.
126. Swinkels, W. (2008). Host Response to *Eimeria* Infections, Doctoral dissertation, Utrecht University, 1-29.
127. Swinkels, W. (2009). Host response to *Eimeria* infections. *Tijdschr Diergeneeskd*, 134(3):114-116.
128. Tentori, L., & Salvati, A. M. (1981). Hemoglobinometry in human blood. In *Methods in enzymology*, 76, 707-715.
129. Tewari, A. K., & Maharana, B. R. (2011). Control of poultry coccidiosis: changing trends. *Journal of Parasitic Diseases*, 35(1), 10-17.
130. Tomley, F. (1994). Antigenic diversity of the asexual developmental stages of *Eimeria tenella*. *Parasite immunology*, 16(8), 407-413.
131. Tomza-Marciniak, A., Pilarczyk, B., Tobińska, B., & Tarasewicz, N. (2014). Gastrointestinal parasites of free-range chickens. *Annals of parasitology*, 60(4), 305-308.
132. Tyzzer, E. E. (1929). Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Epidemiology*, 10(2), 269-383.
133. Wang, D., Zhou, L., Li, W., Zhou, H., & Hou, G. (2018). Anticoccidial effects of areca nut (*Areca catechu* L.) extract on broiler chicks experimentally infected with *Eimeria tenella*. *Experimental parasitology*, 184, 16-21.
134. Williams R. (1995). Epidemiological studies of coccidiosis in the domestic fowl (*Gallus gallus*), Physical condition and survival of *Eimeria acervulina* oocysts in poultry house litter. *Applied parasitology journal*, 36: 90-96.

135. Williams, R. B. (1998). Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International journal for parasitology*, 28(7), 1089-1098.
136. Witcombe, D. M., & Smith, N. C. (2014). Strategies for anti-coccidial prophylaxis. *Parasitology*, 141(11), 1379-1389.
137. Yegani, M., & Korver, D. R. (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry science*, 87(10), 2052-2063.
138. You, M. J. (2014). The comparative analysis of infection pattern and oocyst output in *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina* in young broiler chicken. *Veterinary World*, 7(7), 542-547.

БИОГРАФИЈА

Марко Пајић је рођен у Шапцу 03.12.1987. године. Основну школу „Жика Поповић“ завршио је 2002. године са одличним успехом. Средњу пољопривредну школу „23 октобар“, образовног профила ветеринарски техничар завршио је 2006. године у Шапцу са одличним успехом.

Диплому доктора ветеринарске медицине је стекао на Департману за ветеринарску медицину, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду 2012. године са просечном оценом 8,40. Мастер рад је одбранио 2013. године под називом „*Компаративна анализа регулативе дијагностике и контроле трихинелозе у Европској унији и Републици Србији*“ на истом факултету. Докторске студије је уписао октобра 2013. године на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. Положио је све испите предвиђене студијским програмом докторских академских студија са просечном оценом 9,36.

Од септембра 2013. године запошљен је на Одељењу за епизоотиологију, клиничку дијагностику, патологију и ДДД, Научног института за ветеринарство "Нови Сад" у Новом Саду. У звање истраживача приправника изабран је 2014. године, а у звање истраживача сарадника 2017. године.

Од новембра 2013. године ангажован је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Истраживање фармаколошких карактеристика антимикуробних агенаса, увођење нових технолошких решења и алтернативних метода профилаксе с циљем да се побољша контрола инфективних обољења домаћих животиња“, којим руководи др Дубравка Миланов (бр. ТР 31071).

Као аутор и коаутор објавио је преко 30 научних радова од којих су 4 од међународног значаја.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Марко Пајић

број уписа 15/18

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Оксидативни стрес код товних пилића инфицираних врстама паразита рода *Eimeria* након примене кокцидиостатика“

- 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марко Пајић

Број уписа: 15/18

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Оксидативни стрес код товних пилића инфицираних врстама паразита рода *Eimeria* након примене кокцидиостатика“

Ментори: Проф. др Невенка Алексић, Др Милена Радаковић

Потписани: Марко Пајић

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.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Оксидативни стрес код товних пилића инфицираних врстама паразита рода *Eimeria* након примене кокцидиостатика“

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).

Потпис докторанда

У Београду, _____

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.