

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE



Filip M. Janjić

ODGOVOR AKUTNE FAZE KOD PASA
OBOLELIH OD BABEZIOZE TOKOM
RAZLIČITIH GODIŠNJIH DOBA I VEZA
POJAVE AKUTNOG OBOLJENJA SA
METEOROLOŠKIM PARAMETRIMA

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Filip M. Janjić

**ACUTE PHASE RESPONSE IN DOGS WITH
BABESIOSIS DURING DIFFERENT SEASONS
AND THE RELATIONSHIP BETWEEN THE
OCCURRENCE OF ACUTE DISEASE AND
METEOROLOGICAL PARAMETERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

ČLANOVI KOMISIJE:

MENTOR: dr Milica Kovačević Filipović, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

MENTOR: dr Jelena Ajtić, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

dr Tamara Ilić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

dr Snežana Tomanović, naučni savetnik,

Univerzitet u Beogradu, Institut za medicinska istraživanja

dr Anđelo Beletić, naučni saradnik, specijalista medicinske biohemije,

Klinički centar Srbije, Centar za medicinsku biohemiju

Datum odbrane:

.....

Zahvalnica

Mentoru profesorki Milici Kovačević Filipović na stručnim savetima, podršci i posvećenom vremenu.

Mentoru profesorki Jeleni Ajtić na pruženoj pomoći, savetima, komentarima i sugestijama.

Doktoru Anđelu Beletiću, naučnom saradniku, pod čijim sam neposrednim rukovodstvom savladao primenu statističkih metoda i tumačenja dobijenih rezultata.

Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima

Sažetak

Babezioza pasa, uzrokovana infekcijom protozomom *Babesia canis*, sezonska je bolest na području Beograda, glavnog grada Republike Srbije. Sezone pojave oboljenja se poklapaju sa aktivnošću vektora krpelja *Dermacentor reticulatus*. Period inkubacije varira od četiri do 21 dan, a kliničku sliku karakteriše sistemska akutna inflamacija ili u težim slučajevima sindrom sistemskog inflamatornog odgovora (eng. *Systemic Inflammatory Response Syndrome* – SIRS). Povezanost klimatskih i epidemioloških faktora koja bi precizno pokazala i okarakterisala sezone u kojima se ovo oboljenje javlja na teritoriji Beograda, do sada nije ispitana. Sa kliničko-epidemiološkog aspekta, nameće se pitanje, da li je pojava SIRS-a vezana za pojedine sezone, odnosno da li postoje razlike u intenzitetu odgovora akutne faze kod pasa obolelih u različitim sezonama. Hipoteza ove studije bila je da je tokom prolećne sezone, u kojoj je učestalost pojave pasa akutno inficiranih *B. canis* najveća, odgovor akutne faze najintenzivniji, odnosno da će reaktanti akutne faze pokazati najveće promene, a da će broj pasa sa SIRS-om, biti najzastupljeniji.

Prvi deo studije obuhvatio je ispitivanje učestalosti pojave oboljenja na teritoriji Beograda tokom četiri godine (2013–2016), u različitim sezonama. Ispitan je kratkoročni uticaj (dve nedelje) i dugoročni uticaj meteoroloških parametara (godinu dana) koji su prethodili pojavi 872 zabeležena slučaja babezioze pasa. Drugi deo studije uključio je 66 pasa, sa akutnom infekcijom *B. canis* tokom 2017–2019. godine, od kojih je prikupljan višak pune krvi i seruma koji su preostali posle dijagnostike oboljenja. Rutinskim laboratorijskim testovima su izvedene hematološke i biohemijske analize, dok je elektroforeza proteina izvedena na agaroznom gelu. Parazitemija je određena komercijalnom metodom lančane reakcije polimeraze, dok je prisustvo IgG antitela protiv *B. canis* ispitano komercijalnim serološkim testom. Reaktanti/proteini akutne faze određeni su sledećim testovima: koncentracija serum amiloida A komercijalnom ELISA-om (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), koncentracija ceruloplazmina i aktivnost paraoksonaze 1 spektrofotometrijski, dok je za koncentraciju fibrinogena primenjen metod zagrevanja uz precipitaciju proteina. Klasifikacija pasa na SIRS pozitivne i negativne izvedena je prema odgovarajućim kliničkim i laboratorijskim promenama, dok su indeksi reaktanata akutne faze (IRAF) dobijeni računskim putem. Razlike između varijabli ispitane su pomoću Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U testa i Chi-square testa. Veze između varijabli kvantifikovane su Spirmanovim koeficijentima korelacije odnosno logističkom regresionom analizom.

Rezultati analize distribucije pojave babezioze pasa omogućavaju podelu kalendarske godine na četiri sezone: januar–februar, februar–maj, jun–septembar i oktobar–decembar. Broj dijagnostikovanih slučajeva pokazuje bimodalnu distribuciju sa najvećim brojem tokom kasne zime i proleća i nešto manje tokom jeseni. Pokazano je da su u sezoni sa najvećim brojem slučajeva (februar–maj) kratkoročni „optimalni“ uslovi za pojavu babezioze pasa temperatura (3–16) °C pri vlažnosti vazduha (53–87) %. Temperatura je pokazala dugoročan uticaj na pojavu oboljenja, pa se tako, sa njenim povećanjem u jesen i zimu, kao i smanjenjem u kasno

proleće i rano leto, broj slučajeva povećavao tokom sledećeg zimsko–prolećnog perioda. Takođe, smanjenje vlažnosti vazduha tokom jeseni i zime povezano je sa povećanjem slučajeva u sledećem zimsko–prolećnom periodu. Rezultati analize kliničko-epidemioloških podataka pokazuju da se odnos pasa sa i bez SIRS-a, kao i odnos seroreaktivnih i seronegativnih pasa nije razlikovao između sezona. Ipak, psi oboleli u sezoni februar–maj imali su 25–60 puta veću verovatnoću za pojavu većih IRAF od pasa obolelih u druge dve sezone. Parazitemija i koncentracija kreatinina, albumina i gvožđa bili su niži kod pasa obolelih u sezoni februar–maj u poređenju sa onima obolelim u druge dve sezone.

Rezultati ove teze pokazuju da meteorološki parametri imaju kratkoročni i dugoročni uticaj na učestalost pojave babezioze u pojedinim sezonama. Iako pojava akutne babezioze pasa u sezoni februar–maj nije povezana sa češćom pojavom SIRS pozitivnih pasa, povezana je sa većim intenzitetom reakcije akutne faze.

Ključne reči: *Babesia canis*, reakcija akutne faze, sezonalnost

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Patološka fiziologija

UDK broj: 619:576.89:599.735.13

Acute phase response in dogs with babesiosis during different seasons and the relationship between the occurrence of acute disease and meteorological parameters

Summary

Canine babesiosis, caused by infection with a protozoan *Babesia canis*, is a seasonal disease in the area of Belgrade, the capital of the Republic of Serbia. The seasons of the disease coincide with the activity of the vector *Dermacentor reticulatus*. The disease incubation period varies between 4 and 21 days, and the clinical picture is characterized by systemic acute inflammation or, in severe cases, Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). A connection between meteorological parameters and epidemiological factors that could help characterize the seasons in which this disease occurs in the region of Belgrade, has not been investigated previously. From the clinical-epidemiological aspect, there is a question whether the occurrence of SIRS is restricted to some seasons, or, in other words, whether there are differences in the intensity of the acute phase response in dogs infected in different seasons. This study hypothesized that during the spring season, when the frequency of dogs acutely infected with *B. canis* is the highest, the acute phase response is also the most intense, with acute-phase reactants showing the greatest changes, and the fraction of dogs with SIRS reaching its maximum.

The first part of the study investigated the disease frequency in the Belgrade region in different seasons during four years (2013–2016) when a total of 872 were recorded. A short-term influence (two weeks prior) and long-term influence of meteorological parameters (up to one year prior) were analyzed.

The second part of the study included 66 dogs with acute *B. canis* infection diagnosed between 2017 and 2019. Laboratory analyses were conducted using the excess of the whole blood and serum that remained after the diagnosis of the disease. Hematological and biochemical analyses were performed by routine laboratory tests, while agarose gel was used for electrophoretic analysis of proteins. Parasitemia was measured by a polymerase chain reaction method in a commercial laboratory. The presence of IgG antibodies against *B. canis* was tested by a commercial serological test. The following techniques were used for analyses of acute-phase proteins: commercial Enzyme Linked Immunosorbent Assay for serum amyloid A concentration, spectrophotometry for ceruloplasmin concentration and paraoxonase 1 activity, and heat denaturation method for fibrinogen. The dogs were classified as SIRS positive or negative according to a predefined set of clinical and laboratory changes. The indexes of acute phase reactants (IRAF) were calculated. The significance of the differences between the variables was tested using the Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U, and Chi-square tests. The relationships between variables were quantified by Spearman correlation coefficients and logistic regression analyses.

The number of diagnosed canine babesiosis cases showed a bimodal distribution wherein four seasons of the year can be distinguished: January–February, February–May, June–September and October–December. The highest number of the cases was recorded during late winter and spring, i.e., in the February–May season, and the other, less prominent maximum, occurred during autumn. In the season with the highest number of cases, from February to May, short-term (two weeks prior) "optimal" conditions for the occurrence of dog babesiosis were temperatures (3–16) °C and relative humidity (53–87) %. Further, temperature showed a

statistically significant correlation with the number of diagnosed cases, implying its long-term effect on the disease occurrence. Thus, with a temperature decrease in late spring and early summer, and its increase in autumn and winter, the number of cases increased during the winter–spring period of the following year. Also, a decrease in relative humidity during autumn and winter was linked to an increase in cases in the following winter–spring period. The clinical-epidemiological data showed no seasonal differences in the frequency of dogs with and without SIRS, and the ratio of seroreactive and seronegative dogs. However, dogs infected in the February–May season were 25- to 60-fold more likely to develop higher IRAFs than dogs infected in the other seasons. In this season, parasitemia and concentrations of creatinine, albumin, and iron were lower than in dogs infected in the other seasons.

The results of this thesis imply a significant short-term and long-term influence of meteorological parameters on the frequency of canine babesiosis in certain seasons. The occurrence of acute canine babesiosis in the February–May season seemed not to be associated with a more frequent occurrence of SIRS-positive dogs. Still, its occurrence in this season was linked to a higher intensity of the acute phase reaction.

Key words: *Babesia canis*, acute phase reaction, seasonality

Scientific Field: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Pathophysiology

UDK Number: 619:576.89:599.735.13

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Babezioza pasa izazvana protozooom <i>Babesia canis</i>	3
2.1.1. <i>Babesia canis</i> kao etiološki faktor	3
2.1.2. Životni ciklus <i>B. canis</i>	3
2.1.3. Patogeneza	4
2.1.4. Imunitet protiv protozoa iz roda <i>Babesia</i>	5
2.1.5. Kliničko-patološke promene.....	6
2.1.6. Dijagnostika	6
2.1.7. Terapija	7
2.1.8. Profilaksa	7
2.2. <i>Derma-centor reticulatus</i>	8
2.2.1. Životni ciklus <i>D. reticulatus</i>	8
2.2.2. Aktivnost	10
2.2.3. <i>Derma-centor reticulatus</i> kao vektor	11
2.3. Reakcija akutne faze	12
2.3.1. Proteini akutne faze	13
2.3.2. Gvožđe kao negativni reaktant akutne faze.....	22
2.3.3. Hemostaza i reakcija akutne faze	25
2.4. Sepsa.....	27
2.4.1. Promene u koncentraciji proteina akutne faze tokom sepe.....	28
2.4.2. Sepsa kod babezioze pasa	28
2.5. Klima i klimatske promene.....	28
3. CILJEVI I ZADACI	31
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. Psi.....	33
4.1.1. Evidencija o dijagnostikovanju babeziozi	33
4.1.2. Uzorci krvi pasa uključenih u laboratorijsko ispitivanje	33
4.2. Meteorološki podaci	35
4.3. Hematološke analize.....	35
4.4. Biohemijske analize	36
4.5. Elektroforeza proteina.....	36
4.6. Određivanje koncentracije proteina akutne faze i indeksa reaktanata akutne faze... 36	
4.6.1. Proteini akutne faze	36
4.6.2. Indeksi reaktanata akutne faze	37
4.7. Serološke analize.....	37
4.8. Molekularna dijagnostika.....	37
4.9. Statistička analiza.....	37
5. REZULTATI	39
5.1. Veza pojave akutne babezioze pasa sa meteorološkim parametrima	39
5.1.1. Sezonalnost pojave babezioze pasa.....	39
5.1.2. Kratkoročna veza pojave babezioze i meteoroloških parametara	40
5.1.3. Dugoročna veza pojave babezioze i meteoroloških parametara	42
5.2. Laboratorijske analize	44
5.2.1. Hematološki i biohemijski parametri kod SIRS pozitivnih pasa i pasa bez SIRS-a 44	
5.2.2. Hematološki i biohemijski parametri kod <i>B. canis</i> seronegativnih i seropozitivnih pasa	50
5.2.3. Promene laboratorijskih parametara vezane za sezone	51

5.2.4.	Logistička regresiona analiza laboratorijskih promena vezane za sezone	63
5.2.5.	Korelacije hematoloških i biohemijskih parametara sa količinom DNK <i>B. canis</i> , sezonom i starošću pasa	64
5.2.6.	Promene hematoloških i biohemijskih parametara vezanih za pol i rasu pasa inficiranih protozoon <i>B. canis</i>	65
6.	DISKUSIJA	67
6.1.	Veza pojave akutne babezioze sa meteorološkim parametrima	67
6.1.1.	Sezonalnost babezioze pasa	67
6.1.2.	Kratkoročna veza pojave babezioze pasa i meteoroloških parametara	67
6.1.3.	Dugoročna veza pojave babezioze pasa i meteoroloških parametara	69
6.2.	Kliničko-patološke promene i karakteristike inflamatornog odgovora vezane za prisustvo SIRS-a	70
6.3.	Procena težine zapaljenske reakcije kod pasa prirodno inficiranih <i>B. canis</i> u različitim sezonama	72
6.4.	Promene hematoloških i biohemijskih parametara kod pasa prirodno inficiranih <i>B.</i> <i>canis</i> vezane za rasu, pol i starost	75
7.	ZAKLJUČCI	77
	LITERATURA	79

1. UVOD

Kroz istoriju, počevši od pećinskog slikarstva gde je pas prikazan kao čovekov pomoćnik u lovu, pa do danas, psi su simbol zajedništva, vernosti, prijateljstva i ljubavi. Danas je društvo psa sastavni aspekt života mnogih ljudi. Vlasnici sa svojim ljubimcima ostvaruju vezu u kojoj ne samo da pružaju već i primaju ljubav i naklonost i doživljavaju ih kao članove porodice. Kao posledica ovakve veze, vlasnici posvećuju sve više pažnje zdravlju svojih ljubimaca. Svest vlasnika o opasnostima koje vrebaju njihove ljubimce je svakim danom veća, te je i primena antiparazitika i drugih profilaktičkih sredstava postala uobičajena. Međutim, pojava babezioze je ipak učestala među psima.

Za održavanje babezioze na jednom lokalitetu potrebna su dva domaćina, krpelj i pas. Međutim i bez pasa, u populaciji krpelja uzročnik se može održati nekoliko godina. Na teritoriji Beograda najčešći uzročnik je *Babesia canis*. U organizmu psa, *B. canis* inficira eritrocite, stvarajući solubilne antigene koji aktiviraju imunološki odgovor i inflamatornu reakciju koja može biti različitog intenziteta. Opisana je akutna infekcija sa sistemskom inflamacijom ili SIRS-om (eng. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) i ponekad letalnim ishodom, ali i supklinička, hronična infekcija sa inflamatornom reakcijom blagog intenziteta, usled koje dolazi do blažih promena laboratorijskih parametara.

Pravi domaćin babezije je krpelj *Dermacentor reticulatus*, u kome se odvija seksualno razmnožavanje, a ulogu prelaznog domaćina u kome se odvija aseksualno razmnožavanje pored psa najverovatnije mogu imati kojot, šakal, rakun, afrički divlji pas i lisica. Krpelj u organizam psa inokuliše sporozoite (infektivne oblike *B. canis*), koji naseljavaju eritrocite u kojima se dele bespolnim putem stvarajući merozoite. Sisanjem krvi na inficiranim psima krpelj u organizam unosi eritrocite inficirane merozoitima. U krpelju se onda obavlja seksualno razmnožavanje, a uzročnik može da migrira u pljuvačne žlezde, čime je spreman za novu infekciju psa, ili naseljava ovarijume i prenosi se na sledeću generaciju krpelja.

Babezioza pasa je sezonsko oboljenje koje odslikava sezone vezane za aktivnost krpelja. Istraživanja širom Evrope pokazuju da se najveći broj slučajeva beleži tokom proleća i jeseni, što je u skladu sa najvećom aktivnošću *D. reticulatus*. Ispitivanje sezonalnosti babezioze nije sprovedeno na teritoriji Beograda, u kome se pored proleća i jeseni značajan broj slučajeva beleži i tokom zimskih meseci kada je prosečna temperatura značajno niža od optimalne za aktivnost *D. reticulatus*. Pored temperature i drugi parametri poput vlažnosti vazduha, količine padavina, vazdušnog pritiska i oblačnosti mogu uticati na aktivnost i životni ciklus krpelja. Iz ovih razloga, u doktorskoj disertaciji ispitana je povezanost meteoroloških i epidemioloških parametara koji precizno pokazuju i karakterišu sezone u kojima se ovo oboljenje javlja na teritoriji Beograda.

Posmatarno sa kliničkog stanovišta, babezioza pasa se može javiti u nekomplikovanoj i komplikovanoj formi. Klinički znaci nekomplikovane forme uključuju blede sluzokože, groznicu, anoreksiju, letargiju, splenomegaliju, hipotenziju. Kod komplikovane forme može doći do šoka, rabdmiolize, akutnog respiratornog distresa, akutne insuficijencije jetre, akutnog pankreatitisa, diseminovane intravaskularne koagulacije i često se završi uginućem.

Obe forme karakterišu se odgovorom akutne faze, ali je intenzitet tog odgovora različit. Najčešći laboratorijski nalazi su blaga normocitna, normohromna anemija, trombocitopenija i leukopenija. Međutim, ponekada se mogu uočiti leukocitoza praćena neutrofilijom i limfocitozom. Biohemijski rezultati najčešće ukazuju na smanjenje ukupnih proteina i albumina, dok se koncentracija alanin amino-transferaze i kreatinina povećava. Babeziozu prati i promena proteina akutne faze, koji su nespecifični ali osetljiv pokazatelj oštećenja tkiva. Da bi se povećala osetljivost kojom se detektuje oštećenje tkiva, i zabeležile manje, ali prisutne razlike u odgovoru organizma na oštećenje, u ovom radu je primenjeno kombinovanje više reaktanata akutne faze u jedinstven indeks. Naime, kombinovanjem takozvanih „brzih“ i „sporih“ i pozitivnih i negativnih reaktanata akutne faze dobija se indeks koji oslikava višestruke promene u organizmu tokom sistemske inflamacije. Na taj način je obezbeđeno jednostavnije poređenje intenziteta inflamatornog odgovora među jedinkama obolelim u različitim sezonama. Pretpostavlja se da težina oboljenja tokom infekcije *B. canis* zavisi od faktora vezanih za vektore: broja sporozoita koji su se oslobodili iz pljuvačnih žlezda krpelja, broja infektivnih krpelja koji su infestirali psa, virulencije soja *B. canis* ali i faktora vezanih za pse: prisustvo eventualnih koinfekcija ili komorbiditeta i imunološkog statusa domaćina. Moguće je pretpostaviti da su u sezoni najveće aktivnosti krpelja *D. reticulatus*, psi inficirani višestrukim ubodima krpelja uz inokulaciju većeg broja infektivnih sporozoita. Zbog svega navedenog u ovoj doktorskoj disertaciji je, određivanjem hematoloških i biohemijskih parametara i proteina akutne faze, ispitano i postojanje različitog stepena oštećenja tkiva i intenziteta odgovora akutne faze tokom različitih sezona pojave babezioze pasa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Babezioza pasa izazvana protozooom *Babesia canis*

2.1.1. *Babesia canis* kao etiološki faktor

Babezioza je vektorski prenosivo oboljenje sisara čiji je uzročnik *Babesia*, protozoa iz reda Piroplasmida. *Babesia* je intraeritrocitni parazit koji je prvi put identifikovan 1888. godine u eritrocitima goveda i ovaca. Po pronalazaču, rumunskom bakteriologu Viktoru Babezu, ovaj mikroorganizam je 1893. godine dobio ime *Babesia* (Uilenberg, 2006). Samo dve godine nakon toga, babezioza je prvi put opisana kod pasa (Roncalli Amici, 2001). Najčešći uzročnik babezioze pasa na teritoriji Beograda je *Babesia canis* (Davitkov i sar., 2015), čiji je glavni vektor krpelj *Dermacentor reticulatus* (Karbowski, 2014).

2.1.2. Životni ciklus *B. canis*

Za kompletiranje životnog ciklusa, *Babesia* zahteva dva domaćina, krpelja i sisara, u kojima prolazi kroz tri stadijuma: 1) gametogonija (formiranje i spajanje gameta u epitelnim ćelijama creva krpelja), 2) sporogonija (aseksualno razmnožavanje u pljuvačnim žlezdama krpelja) i 3) merogonija (aseksualno razmnožavanje u eritrocitima sisara). Tokom uzimanja krvnog obroka, krpelj prenosi sporozoite (infektivne oblike parazita – *Babesia* spp.) iz svojih pljuvačnih žlezda u krvotok psa (Irwin, 2010). Iako postoje dokazi o vertikalnoj infekciji (Mierzejewska i sar., 2014) i infekciji transfuzijom inficirane krvi (Stegeman i sar., 2003), način na koji se većina pasa inficira je preko inficiranih krpelja. Kada se nađu u krvotoku psa, sporozoiti se glikozaminoglikanima i sijaloglikoproteinima vezuju za eritrocite i prodiru u njih (Lobo i sar., 2012). U eritrocitima se hrane i transformišu u trofozoite od kojih deobom nastaju merozoiti. Merozoiti liziraju eritrocit u kome su nastali i inficiraju novi. Proces umnožavanja se nastavlja do uginuća domaćina ili, mnogo češće, dok imunološki sistem domaćina ne prekine ovaj proces (Uilenberg, 2006). Umnožavanje se odvija asinhrono tako da se u krvotoku domaćina istovremeno mogu naći različite razvojne faze parazita. U eritrocitima neki od merozoita transformišu se u pregametocite, koje krpelji uzimanjem krvnog obroka unose u svoj organizam. U crevima krpelja pregametociti se diferenciraju u muške i ženske gamete, a zatim se spajaju formirajući zigot. Zigot prolazi kroz barijeru digestivnog trakta krpelja, ulazi u hemolimfu gde sazreva u ookinet i raznosi se u različite organe krpelja uključujući pljuvačne žlezde i ovarijume. Dospevanjem u ovarijume *Babesia* inficira jaja i transovarijano se prenosi na sledeću generaciju krpelja, a zatim se transstadijalno prenosi kroz sve razvojne faze životnog ciklusa krpelja (Chauvin i sar., 2009). Ukoliko ookinet dospe u pljuvačne žlezde, nastupa sporogonija i formiraju se nediferentovani sporoblasti. Kada inficiran krpelj započne ishranu na domaćinu, sporoblasti se diferenciraju u sporozoite, koje krpelji iz pljuvačnih žlezda ubacuju u krvotok sisara i inficiraju ih. Iz jednog sporoblasta može nastati između 5000 i 10000 sporozoita (Homer i sar., 2000). *Babesia* se transovarijalnom i trasstadijalnom infekcijom može prenositi kroz nekoliko generacija krpelja bez nove infekcije (Uilenberg, 2006).

2.1.3. Patogeneza

U patogenezi babezioze pored uzročnika odgovornog za infekciju eritrocita i njihovu razgradnju, važnu ulogu ima i odgovor imunološkog sistema domaćina na parazitemiju.

Jedine ćelije koje *B. canis* inficira su eritrociti. Umnožavanjem u eritrocitima, *Babesia* povećava njihovu osmotsku osetljivost što dovodi do oštećenja ćelijske membrane eritrocita, i posledično, povećane intravaskularne i ekstravaskularne hemolize, tj. do anemije. Anemiji doprinosi i liza neinficiranih eritrocita koja je posledica oksidativnog oštećenja i imunološki posredovanih mehanizama koji dovode do aktivacije sistema komplementa ili fagocitoze (Vannier i sar., 2015). Oslobađanje proinflamatornih citokina se može pokrenuti kontaktom ćelija imunološkog sistema sa glikozil-fosfatidilinozitolnom komponentom antigena babezije, prisutnom na površini samog parazita ili inficiranih eritrocita (Cornillot i sar., 2012). Posledično se stimuliše oslobađanje azot-monoksida koji može uništiti parazita, ali proizveden u većim količinama uzrokuje i oštećenje ćelija organizma. Čak i u uslovima niske parazitemije, anemija može biti ozbiljna, što ukazuje na uklanjanje i neinficiranih eritrocita, kao i na važnu ulogu faktora koji nisu povezani sa samim parazitom u patogenezi bolesti.

Uprkos hemolizi, kod pojedinih pacijenata se može uočiti povećanje hematokritske vrednosti koje ukazuje na dehidrataciju. Ova relativna policitemija nastaje zbog preraspodele tečnosti iz intravaskularnog u ekstravaskularni prostor. Preraspodelom tečnosti povećava se rizik akutnog zatajivanja bubrega, oštećenja moždanih funkcija, kao i otkazivanja funkcija drugih organa i uginuća.

U regulaciji broja eritrocita važnu ulogu ima slezina u kojoj se vrši njihova razgradnja, kao i ekstramedularna hematopoeza, nastala zbog anemije. Ovo objašnjava pojavu splenomegalije pacijenata obolelih od babezioze (Vannier i sar., 2015).

Činjenica da je u cirkulaciji više eritrocita sa jednim parazitom od onih u kojima se nalaze dva parazita, ukazuje da su ranije inficirani eritrociti uklonjeni iz cirkulacije. Ovo se može objasniti imunološkim odgovorom koji uništava inficirane eritrocite, ali takođe može biti zbog sekvestracije u unutrašnjosti organa, ili kombinacijom oba mehanizma (Schetters, 2019). Pokazano je da *B. bovis* ekspresijom VESA (eng - *Variant Erythrocyte Surface Antigen*) na površini inficiranih eritrocita stimuliše njihovo vezivanje za endotel krvnih sudova u procesu koji se naziva sekvestracija (O'Connor i Allred, 2000). Smatra se da je na ovaj način smanjen njihov pristup ćelijama imunološkog sistema i uklanjanja u slezini, čime *B. bovis* izbegava imunološki odgovor domaćina i obezbeđuje perzistentnu infekciju (Vannier i sar., 2008). Kod *B. canis* opisani su geni koji bi mogli učestvovati u ekspresiji ovakvog proteina. Prisustvo VESA nije opisano na eritrocitima inficiranim *B. canis*, ali jeste ekspresija parazitskih antigena koji mogu imati ulogu u početnom vezivanju eritrocita za endotel krvnih sudova (Schetters, 2019). Vezivanje eritrocita za endotel može da dovede do zatvaranja malih krvnih sudova i tkivne hipoksije (Vannier i sar., 2008).

2.1.4. Imunitet protiv protozoa iz roda *Babesia*

Urođeni imunitet ima ulogu u zaštiti od babezioze. Pokazano je da su NK ćelije (eng. *Natural Killer cells*) i makrofagi važni u zaštiti od babezioze. Veza između nivoa NK ćelija i otpornosti na *B. microti* pokazana je kod miševa u ranim fazama infekcije. Istraživanja su pokazala visoku aktivnost NK ćelija tokom vrhunca parazitemije i faze oporavka (Ristic, 1988). Ispitivanjem na miševima pokazana je i uloga makrofaga. Eliminacija makrofaga silicijum-dioksidom eliminiše i zaštitu od *B. microti* (Kostro i sar., 2015). Takođe, pokazano je da inhibicija makrofaga potpuno onemogućava zaštitu imunizovanih miševa od *B. rodhaini* i dovodi do visokog mortaliteta (Zivkovic i sar., 1985).

U formiranju imuniteta na babeziozu učestvuju i humoralni i ćelijski faktori. U početnoj fazi infekcije sporozoiti se kratko zadržavaju u krvotoku. U ovom periodu, pre ulaska sporozoita u eritrocite, antitela ih mogu vezati i neutralisati (Abdalla i sar., 1978). Međutim, smatra se da humoralni imunološki odgovor ima ograničeni značaj. Ranije studije na miševima su pokazale da se serumom koji sadrži specifična antitela može preneti određen stepen imuniteta na *B. microti* (Mahoney, 1967). Međutim, miševi imuni na *B. rodhaini* ostaju zaštićeni nakon doze zračenja koja suzbija proizvodnju antitela (Zivkovic i sar., 1984), a prenos imunog seruma imunodeficientnim miševima inficiranih *B. microti* ne dovodi do prekida infekcije (Matsubara i sar., 1993). Eksperimenti na konjima i teladi pokazali su da IgG antitela, opsonizacijom i uništavanjem slobodnih parazita, kao i inficiranih eritrocita citotoksičnim mehanizmima, značajno smanjuju parazitemiju (Knowles i sar., 1994). Nastanak parazitemije *B. rodhaini* može se odložiti imunim serumom, ali on ne sprečava razvoj infekcije i uginuće inficiranih miševa (Abdalla i sar., 1978).

Pokazano je i da *Babesia* može modifikovati humoralni imunitet domaćina kako bi imala uslove za uspešno parazitiranje. Proteini *B. bigemina* ekspimirani na površini eritrocita učestvuju u vezivanju IgM, što se smatra značajnim za rast i preživljavanje parazita (Echaide i sar., 1998). Ovu hipotezu podržava i zapažanje da su miševi sa nedostatkom IgM otporni na infekciju *B. microti* (Rosenberg i Evans, 1979). Slična zapažanja postoje i za komponente komplemента, budući da je primećeno da su neke od njih neophodne za ulazak *B. rodhaini* u eritrocite čoveka (Chapman i Ward, 1977). Takođe, kod miševa je otkriveno da prisustvo komplemента inhibira fagocitozu merozoita *B. rodhaini* (Abdalla i sar., 1978).

Ključnu ulogu u otpornosti na babeziozu imaju T limfociti. Nakon eksperimentalne infekcije sa *B. microti* miševi bez timusa imali su povišenu i upornu parazitemiju, za razliku od miševa sa timusom kod kojih je parazitemija bila prolazna (Ruebush i Hanson, 1980a). Kod miševa imunizovanih protiv *B. rodhaini* dolazi do rasta parazitemije ukoliko se tretiraju antitimocitnim serumom (Zivkovic i sar., 1985). Pokazano je da prenos prečišćenih T limfocita miševima obezbeđuje otpornost protiv *B. microti* (Ruebush i Hanson, 1980b), a prenos imunih timocita imunodeficientnim miševima dovodi do oporavka od infekcije *B. microti* (Matsubara i sar., 1993). Važnost CD4⁺ T limfocita potvrđena je ispitivanjem na miševima. Infekciji *B. microti* podložniji su miševi bez CD4⁺ T limfocita nego miševi koji posedu ove ćelije, dok kod miševa bez CD8⁺ T limfocita osetljivost na infekciju nije promenjena ili je čak smanjena (Igarashi, 1994; Shimada i sar., 1996).

2.1.5. Kliničko-patološke promene

Kliničke manifestacije babezioze pasa uzrokovane *B. canis* mogu biti različite, od supkliničke infekcije (Kovačević Filipović i sar., 2018) do višestrukog otkazivanja organa i uginuća (Welzl i sar., 2001). Najčešći klinički simptomi povezani sa babezozom su apatija, letargija, anoreksija, blede sluznice, povišena telesna temperatura, dehidracija i pigmenturija (Bilić i sar., 2018).

Tokom infekcije *B. canis* najčešća i najizraženija hematološka promena je trombocitopenija, koja može varirati od blage do teške. Uprkos trombocitopeniji, spontana krvarenja, petehije i ehimoze su retke. Uz trombocitopeniju jedna od glavnih karakteristika babezioze je anemija. Promenjeni su i drugi hematološki parametri, pa nastaje leukopenija, neutropenija i limfopenija (Solano-Gallego i sar., 2016), a broj eozinofila može biti povišen ili snižen (Máthé i sar., 2006). Na infekciju *B. canis* organizam odgovara sa APR (eng. *Acute Phase Reaction*) kada dolazi do promene u koncentraciji APP (eng. *Acute Phase Proteins*). Hemoglobinemija, hemoglobinurija, bilirubinemija i bilirubinurija nastaju kao posledica hemolize. Čest nalaz kod babezioze je splenomegalija (Bilić i sar., 2018).

Kod težih oblika oboljenja može doći do komplikacija i oštećenja različitih organa, pa se može razviti hepatitis, bubrežna insuficijencija, pankreatitis, diseminovana intravaskularna koagulopatija, akutni respiratorni distress sindrom, poremećaj centralnog nervnog sistema i oštećenje mišića (Máthé i sar., 2006; Matijatko i sar., 2009).

2.1.6. Dijagnostika

Sumnja na babezozu postavlja se na osnovu epidemiološke situacije i kliničke slike. Informacije o regionalnoj pojavi babezioze su veoma važne, kao i anamnestički podaci o putovanju pasa u endemska područja. Promene određenih laboratorijskih parametara mogu dodatno pojačati sumnju i uputiti na preduzimanje specifičnih dijagnostičkih metoda (Bilić i sar., 2018).

Mikroskopski pregled krvnog razmaza je brza, najzastupljenija, najjednostavnija i najjeftinija dijagnostička metoda kliničke babezioze. Dijagnoza se zasniva na identifikaciji parazita u eritrocitima na krvnom razmazu (Giemsa, Diff-Quick ili Romanowsky), pregledanih pod svetlosnim mikroskopom. Jedan od nedostataka ovog načina dijagnostike je relativno niska osetljivost. Procenjuje se da je granična vrednost detekcije parazita na krvnom razmazu 0,001 % inficiranih eritrocita (približno 5000 inficiranih eritrocita po mililitru krvi) (Birkenheuer i sar., 2003). Takvi eritrociti manje su gustine te se lociraju po rubovima razmaza (Kirtz i sar., 2012). Njihova zastupljenost veća je u malim krvnim sudovima poput kapilara u uhu (Beugnet i Moreau, 2015), pa se za postizanje veće osetljivosti testa preporučuje uzorkovanje krvi sa ovog mesta. Na krvnom razmazu moguće je razlikovati „velike“ (*B. canis*, *B. vogeli*) od „malih“ (*B. gibsoni*, *B. microti-like*) babezija, dok je za određivanje vrste potrebno uraditi molekularnu dijagnostiku.

Molekularna tehnika, lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) ima veliku specifičnost i omogućava preciznu identifikaciju vrsta i podvrsta *Babesia*. Zbog velike osetljivosti PCR je koristan za otkrivanje infekcije niskim nivoom parazita, a granica detekcije je 50 parazita po mililitru krvi (Birkenheuer i sar., 2003). Međutim, važno je naglasiti da je nalaz

PCR testiranja venske krvi negativan ubrzo nakon lečenja životinje i kod hroničnih infekcija. Ovo je u skladu sa činjenicom da se paraziti zadržavaju u jetri i slezini, čime se objašnjava pojava recidiva (Beugnet i Moreau, 2015). U slučajevima negativnih PCR rezultata, hronična infekcija može se otkriti serološkim testiranjem (Bilić i sar., 2018).

Serološki testovi mogu se primenjivati dug period nakon infekcije, jer antitela mogu opstati mesecima ili čak godinama, te mnoge životinje imaju antitela bez kliničkih znakova, zbog čega se rezultati moraju pažljivo tumačiti (Beugnet i Moreau, 2015). IFAT (eng. *Indirect Fluorescent Antibody Test*) je test koji se najčešće primenjuje kao pomoćno sredstvo u dijagnostici babezioze pasa. Smatra se da je IFAT visoko osetljiv i umereno specifičan za otkrivanje hroničnih i supkliničkih infekcija (Bilić i sar., 2018). Međutim, zbog potrebnog perioda od osam do deset dana za proizvodnju antitela, u akutnim infekcijama moguće je dobiti negativne rezultate. U istraživačke i epidemiološke svrhe se većinom koristi ELISA (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Bilić i sar., 2018; Beletić i sar., 2021).

2.1.7. Terapija

Imidokarb dipropionat je lek izbora u terapiji babezioze pasa izazvane protozom *B. canis*. Smatra se da postoji nekoliko mehanizama njegovog dejstva: sprečava ulazak inozitola u inficirane eritrocite, što izaziva gladovanje parazita; ometa proizvodnju ili upotrebu poliamina od strane parazita, ili oštećuje DNK *B. canis* i inhibira replikaciju. Preporučena doza imidokarb dipropionata od strane Uprave za hranu i lekove u Sjedinjenim Američkim Državama, iznosi 6,6 mg/kg intramuskularno ili supkutano, koju je potrebno ponoviti za dve nedelje (Baneth, 2018).

Ovakva terapija nekomplikovanih slučajeva dovodi do značajnog poboljšanja kliničkog stanja pacijenta u roku od 24 do 48 časova, sa profilaktičkim dejstvom od četiri do šest nedelja. Aplikacija imidokarb-dipropionata povezana je i sa neželjenim efektima kao što su bol na mestu aplikacije i holinergički simptomi (salivacija, lakrimacija, povraćanje, dijareja, podrhtavanje mišića, tahikardija i dispneja). Neželjeni efekti brzo prolaze, a neki se mogu sprečiti premedikacijom atropinom ili glikopirolatom. Treba znati da se imidokarb-dipropionat ne sme koristiti u većoj dozi od propisane, jer u dozi od 10 mg/kg ispoljava toksične efekte od kojih su najčešći nekroza jetre i nefrotoksičnost (Bilić i sar., 2018).

2.1.8. Profilaksa

U cilju prevencije babezioze pasa potrebno je sprečiti kontakt krpelja i psa. Poseban oprez je neophodan u proleće i jesen kada su krpelji najaktivniji. Preporučuje se izbegavanje oblasti u kojima su oni zastupljeni, kao i redovni pregledi od strane vlasnika. Ukoliko se pronađe krpelj, potrebno ga je što pre ukloniti i ne dozvoliti da započne ishranu, a time i prenos *B. canis*. U borbi sa krpeljima primenjuju se brojna akaricidna sredstva sa različitim mehanizmima dejstva: repelentno dejstvo, sprečavanje vezivanja i početka ishrane, ili brzo ubijanje krpelja i sprečavanje oslobađanja *B. canis* u krvotok psa kada je krpelj već započeo ishranu. Zbog mogućeg prenosa uzročnika transfuzijom inficirane krvi, sve pse donore treba testirati (Bilić i sar., 2018).

Za postizanje zaštite u upotrebi je i vakcina protiv *B. canis*, koja sadrži rastvorljive antigene parazita (eng. *Soluble Parasite Antigens – SPA*) (Schetters, 2005). Ova vakcina dovodi do porasta titra antitela, koja ne sprečavaju nastanak babezioze, ali smanjuju težinu kliničke slike. Vakcina se aplikuje dvokratno sa razmakom od tri nedelje, a zaštita nastaje tri nedelje nakon druge doze i traje najmanje šest meseci. Nakon toga, revakcinacija jednom dozom dovoljna je za održavanje imuniteta dodatnih šest meseci (Schetters i sar., 2006).

2.2. *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794): Dermacentor: Metastriata: Ixodidae: Ixodoidea: Ixodida: Parasitiformes: Acari: Arachnida: Chelicerata: Arthropoda: Ecdysozoa: Protostomia: Bilateria: Animalia: Opisthokonta: Eucariotes: Life.

2.2.1. Životni ciklus *D. reticulatus*

Krpelji imaju kompleksan životni ciklus, tokom koga kraći vremenski period parazitiraju na kičmenjacima. U procesu razvića prolaze kroz stadijum larve, nimfe i adulta. Svi razvojni stadijumi obligatno se hrane krvlju domaćina na kojima parazitiraju. *Dermacentor reticulatus* trodomaćinski je krpelj što znači da svaki razvojni stadijum ima svog domaćina. Larve, nimfe i adulti uzimaju po jedan krvni obrok. Nakon zasićenja napuštaju domaćina, larve i nimfe se presvlače u sledeći stadijum, a ženke počinju sa polaganjem jaja (Milutinović i sar., 2012). Kada se presvuku, a pre početka traganja za domaćinom, svi razvojni stadijumi miruju nekoliko dana u kom periodu kutikula potpuno očvrstne. Na domaćinu se nalaze samo tokom uzimanja obroka a najveći deo života provode u vegetaciji ili na tlu (Estrada-Peña, 2015).

U laboratorijskim uslovima na 30 °C, larve se izlegu iz jaja nakon 12–19 dana (Arthur, 1960), dok se u prirodi to najčešće dešava nakon jednog meseca i ukoliko su uslovi sredine optimalni, za oko dve nedelje počinju sa potragom za domaćinom (Wall i Shearer, 2008). Veličina larvi je 0,5 mm i najčešće parazitiraju na malim sisarima kao što su glodari i karnivori, povremeno i pticama. Na domaćinima se zadržavaju četiri do šest nedelja, od čega se hrane 2,5–6 dana. U srednjoj Evropi, ishrana se odvija od maja do jula sa najvećom zastupljenošću u periodu jun–jul (Földvári i sar., 2016). Nakon uzimanja obroka, larve se odvajaju od domaćina, padaju na tlo i u prirodnim uslovima, nakon dve do tri nedelje, presvlače se u nimfe. Najkraći period od odvajanja sa domaćina do presvlačenja u nimfe, zabeležen u eksperimentalnim uslovima, iznosio je pet do sedam dana (Arthur, 1960). Zabeleženo je da larve koje nisu uzele krvni obrok mogu preživeti šest meseci (Arthur, 1960).

Posle presvlačenja, nimfe miruju oko dve nedelje nakon čega traže domaćina za krvni obrok. Kao i kod larvi, domaćini su mali sisari i ptice na kojima parazitiraju mesec dana (jul–avgust). Veličina nimfi je od 1,4 mm do 1,8 mm. Obrok uzimaju tokom četiri do dvanaest dana, posle čega se odvajaju od domaćina i za 10–14 dana presvlače u adulte (Földvári i sar., 2016). Eksperimentalno je pokazano da nimfe koje nisu uzele krvni obrok, na sobnoj temperaturi mogu preživeti 37 dana (Arthur, 1960).

Divlji i domaći preživari, konji i psi najčešći su domaćini odraslih krpelja. Aktivnost adulta u prirodi i potraga za domaćinom najveća je u proleće i jesen, dok tokom leta gotovo u potpunosti

prestaje (Földvári i sar., 2016). Sa ciljem pronalaženja domaćina penju se na travu ili drugu vegetaciju, čija je visina direktno povezana sa veličinom domaćina na kome se hrane. U vegetaciji, krpelji čekaju prolazak domaćina zauzimajući karakterističan, aktivan „questing“ položaj, u kom je prvi par nogu podignut, a sa preostala tri para, krpelji su oslonjeni na vegetaciju (Milutinović i sar., 2012). Halerovim organom smeštenim na prvom paru nogu detektuju stimulse koje iz spoljašnje sredine šalju domaćini. Na osnovu tako primljenih informacija, krpelji se grupišu na lokacijama sa većom verovatnoćom kontakta sa domaćinima. Pri direktnom kontaktu, na domaćina se kače prvim parom nogu. U questing položaju ostaju do prelaska na domaćina ili dok transpiracijom preko kutikule ne izgube određenu količinu vode. Krpelji mogu nadoknaditi vodu ili spuštanjem u mikrostanište sa većom vlažnošću vazduha, gde vodu mogu apsorbovati iz atmosfere, ili pijenjem. Kada dostignu određeni stepen hidriranosti ponovo se penju na vegetaciju. Ovaj proces se ponavlja do uspešnog kačenja za domaćina. Stoga, preživljavanje krpelja u ovoj fazi života povezano je sa relativnom vlažnošću vazduha (koja zavisi i od apsolutne količine vodene pare u vazduhu, i od temperature vazduha). Ako je ona toliko niska da krpelj ne može da apsorbuje vodu iz vazduha, krpelj će dehidrirati i uginuti (Estrada-Peña, 2015). Ženke *D. reticulatus* otpornije su na isušivanje od mužjaka (Hornok i Farkas, 2009).

Ženke se hrane 9–15 dana. Ovaj period najkraći je tokom proleća, u jesen je duži za jedan do dva dana, a tokom zime čak tri do četiri dana (Balashov, 1972). Nenasisane ženke veličine su između 3,8 mm i 4,2 mm, dok nasisane dostižu 1 cm (Földvári i sar., 2016). Prvi korak u procesu ishrane krpelja je probijanje kože i sekrecija „cementa“, supstance koja se sastoji od proteina, lipida i ugljenih hidrata. Pri kontaktu sa domaćinom, cement se stegne i doprinosi fiksiranju krpelja. Tokom ishrane postoje naizmenični periodi sisanja krvi i salivacije sa regurgitacijom pljuvačke u kojoj se nalazi nekoliko desetina farmakološki aktivnih jedinjenja (histamin vezujući proteini, inhibitori komplementa, imunoglobulin vezujući proteini, modulatori leukocita) koja doprinose neprekidnom protoku krvi, liziranju ćelija koje okružuju mesto uboda i izbegavanju imunološkog odgovora domaćina (Nuttall i Labuda, 2004). Ritam ishrane je takav da je uzimanje obroka najintenzivnije noću, ujutru se smanjuje, a tokom dana je minimalno. Ovakav ciklus se smenjuje tokom sisanja koje je sporo sve do poslednjeg dana kada krpelj uzima najveću količinu obroka. Brzo sisanje krvi poslednjeg dana podstaknuto je parenjem (Oliver, 1989). Veličina krvnog obroka koji mogu uzeti, poredeći sa veličinom njihovog tela, relativno je velika i iznosi nekoliko mililitara, a moguća je zahvaljujući koncentraciji uzete krvi eliminacijom vode iz nje sekretom pljuvačnih žlezda (Estrada-Peña, 2015).

Adulti *D. reticulatus* mogu da tolerišu gladovanje, te mogu preživeti tri do četiri godine bez prisustva domaćina (Földvári i sar., 2016). Mužjaci čija je veličina (4,3–4,8) mm, hrane se intermitentno, što ih čini važnim vektorima. Obrok uzimaju tokom tri do pet dana, a na domaćinu provode dva do tri meseca. U tom periodu oplode nekoliko ženki (Balashov, 1972), a kada potroše seme umiru (Kiszewski i sar., 2001).

Spermatogeneza i oogeneza počinju u stadijumu nimfe, a zaustavljaju se kod adulta. Nastavak formiranja muških i ženskih polnih ćelija uslovljen je kačenjem za domaćina i uzimanjem obroka, pa je ishrana preduslov parenja (Kiszewski i sar., 2001). Tokom uzimanja obroka ženka luči feromone kojima privlači mužjake. Parenje se odvija na domaćinu, a ženka nastavlja sa

ishranom tokom parenja i nakon njega (Saari i sar., 2019). Po završetku ishrane ženka se odvaja od domaćina i na tlu polaže jaja prekrivena sekretom koji ih štiti od isušivanja. Broj položenih jaja proporcionalan je veličini ženke i iznosi 3000–7200. U zavisnosti od temperature i vlažnosti vazduha, polaganje jaja traje šest do 25 dana, a u nepovoljnim uslovima (temperatura ili vlažnost vazduha iznad ili ispod optimalnih), početak se može odložiti nekoliko nedelja (Wall i Shearer, 2008). Cirkadijalni ritam polaganja jaja regulisan je fotoperiodom, a vrhunac je tokom noći. Smatra se da svetlost deluje inhibitorno na ovaj proces (Fujisaki i sar., 1973). Nakon polaganja jaja, ženka umire (Peter, 1993).

Zavisno od uslova sredine, životni ciklus *D. reticulatus* se može završiti za godinu dana ili, ako krpelj uđe u dijapauzu, za dve godine (Földvári i sar., 2016).

2.2.2. Aktivnost

Za aktivnost krpelja karakteristična je periodičnost kojom se životni ciklus prilagođava godišnjim dobima. Sezonski ritmovi manifestuju se na nivou populacije i bazirani su na izmeni perioda aktivnosti (traženje domaćina, ishrana, razvoj nakon ishrane) i perioda uspavanosti (eng. *dormancy*) u sinhronizaciji sa vremenskim uslovima (Belozerov, 1982).

Uspavanost se smatra stanjem minimalne metaboličke aktivnosti sa prestankom rasta i razvoja, bilo kao reakcija na nepovoljne uslove ili kao deo normalnog godišnjeg ritma organizma. U okviru uspavanosti razlikuju se dijapauza i mirovanje (eng. *quiescence*) (Belozerov, 2009). Dijapauza predstavlja neurohumoralno posredovano stanje niske metaboličke aktivnosti kao odgovor na brojne stimulse iz okruženja koji prethode nepovoljnim uslovima. Dijapauza, dakle, nije direktan odgovor na nepovoljne uslove, već odgovor na signale koji najavljuju njihov početak. Dijapauza prethodi početku nepovoljnih uslova što krpeljima omogućava preživljavanje (Belozerov, 1982). Mirovanje je stanje ukočenosti krpelja i neposredan je odgovor na nepovoljne uslove sredine, obično nisku temperaturu, a nasuprot dijapauzi, prestaje sa nestajanjem nepovoljnih uslova. Pored dijapauze i mirovanje uslovljeno niskim zimskim temperaturama može odložiti potragu za domaćinom, kao i ishranu krpelja koji su već na domaćinu. Ako dijapauza nije dovoljno duga da se izbegne trajanje nepovoljnih uslova, krpelji mogu ući u post-dijapauzno mirovanje, i ostati ukočeni do pojave povoljnih uslova (Belozerov, 2009). Dijapauzu i mirovanje nije moguće razlikovati jednostavnim posmatranjem u prirodi, posebno usled pojave post-dijapauznog mirovanja (Gray i sar., 2016).

Sa fiziološkog gledišta razlikuju se dva tipa dijapauze, bihevioralna i razvojna. Bihevioralna je odlaganje potrage za domaćinom nenasisanih krpelja i odlaganje sisanja krpelja koji se već nalaze na domaćinu. Razvojna dijapauza je odlaganje embriogeneze, presvlačenja nasisanih nezrelih stadijuma i polaganja jaja nasisanih oplodjenih ženki (Milutinović i sar., 2012). Dijapauza ima za cilj sinhronizaciju razvoja i aktivnosti krpelja sa povoljnim vremenskim uslovima, odnosno izbegavanje nepovoljnih uslova (npr., ekstremno niske ili visoke temperature, suša, nedostatak hrane). Cilj se postiže blokiranjem nekih od ključnih događaja u životnom ciklusu čime se usporava metabolizam, smanjuje potrošnja energije i kiseonika. Fiziologija dijapauze nije dovoljno ispitana, ali dosadašnja saznanja ukazuju na postojanje tri ključna koraka u obradi stimulusa koji je indukuju. Prvi je registrovanje signala iz spoljašnje

sredine, drugi prikupljanje ovih informacija u mozgu i treći prenos ovih informacija u obliku hormonskog signala, posredstvom neurosekretornih ćelija (Belozerov, 1982).

Primarni stimulus za indukciju dijapauze izgleda da je fotoperiod (dužina obdanice), jer njegova promena precizno najavljuje smenu godišnjih doba. Odgovor krpelja na njega je spor i obično je potrebno dve do tri nedelje izloženosti promeni fotoperioda da bi nastupila dijapauza. U mnogim slučajevima fotoperiod je važan ne samo za početak dijapauze, već i njeno održavanje i kraj. Međutim, kod nekih krpelja nakon uzimanja obroka izmenjena je reakcija na fotoperiod, pa on dovodi do dijapauze, ali je ne održava. Takođe, starenje krpelja dovodi do slabljenja uticaja fotoperioda na početak i održavanje dijapauze. Kritičan fotoperiod je dužina obdanice pri kojoj krpelj ulazi u dijapauzu ili izlazi iz nje, a on varira sa geografskom širinom, životnom fazom i genetikom lokalne populacije krpelja. Promena temperature može menjati dužinu kritičnog fotoperioda. Još uvek je nejasno da li je dijapauza krpelja izazvana fiziološkom promenom aktiviranom dostizanjem određene dužine obdanice, ili krpelj reaguje na postepenu promenu dužine obdanice. U većini laboratorijskih istraživanja je pretpostavljeno da je specifična dužina obdanice sama po sebi dovoljna da indukuje dijapauzu. Međutim, neki autori smatraju da, u prirodi, akumulacija senzornih informacija može biti relevantnija (Gray i sar., 2016).

Na aktivnost krpelja pored fotoperioda veliki uticaj ima i temperatura, pa je zimska dijapauza *D. reticulatus* zabeležena u regionima sa hladnom zimom, dok u toplijim krajevima blagi zimski uslovi nisu dovoljni za njeno aktiviranje. Kod *D. reticulatus* oblik koji najčešće prezimi u bihejvioralnoj dijapauzi su nenasisani adulti, dok je prezimljavanje nasisanih ženki, larvi i nimfi ređe, tako da u proleće sveže presvučeni adulti čine samo 5 % individua. Za razliku od većine trodomaćinskih krpelja, *D. reticulatus* ima sposobnost prezimljavanja na domaćinu. Tokom zimskog perioda se ne hrani, premda u uslovima blage zime adulti mogu biti aktivni tokom cele godine. U Velsu njihova aktivnost je zabeležena pri temperaturi od 3,3 °C tokom dana i -5,4 °C tokom noći (Földvári i sar., 2016). U istočnom delu Poljske optimalni uslovi pri kojima traga za domaćinom su (4–21) °C i (61–100)% relativne vlažnosti vazduha (Bartosik i sar., 2011), dok su u južnom delu Italije optimalni uslovi (13–18) °C i (45–60) % relativne vlažnosti vazduha (Olivieri i sar., 2017). Nakon zimskog perioda aktivni su odmah po nestanku snežnog pokrivača, pri temperaturi od (2–4) °C, pa je moguće naći aktivne krpelje tokom januara i februara (Karbowski, 2014). Kao donji i gornji temperaturni prag aktivnosti pominju se temperature od 1 °C i 39 °C (Bartosik i sar., 2011). Južno od Beograda najveća aktivnost *Dermacentor* vrsta zabeležena je u proleće pri srednjoj dnevnoj temperaturi od 10 °C i relativnoj vlažnosti vazduha od 73 % (Milutinović i Radulović, 2002). U zapadnom delu Sibira aktivni su tokom proleća (april–jun) i kratko tokom jeseni, dok su u Velsu i Francuskoj aktivni većim delom godine sa kratkom letnjom dijapauzom (jun–avgust) i mirovanjem od mesec dana u zimskom periodu (decembar–januar) (Martinod i Gilot, 1991; Peter, 1993).

2.2.3. *Dermacentor reticulatus* kao vektor

Neposredne posledice ishrane *D. reticulatus* su oštećenje kože psa. Pored toga, on je glavni vektor protozoe *Babesia canis* a takođe je vektor i drugih patogena, kao što su: *B. caballi*, *Theileria equi*, *Anaplasma marginale*. Zbog ovih karakteristika, kao i zbog visoke stope reprodukcije i sposobnosti da preživi na različitim staništima, *D. reticulatus* ima veliki

epidemiološki značaj (Karbowiak, 2014). Pored horizontalne transmisije među krpeljima preko domaćina, patogen se može prenositi i vertikalno sa ženke na jaja i transstadijalno. Eksperimentalnim ispitivanjem pokazano je da *D. reticulatus* na psa može preneti *B. canis* osam časova nakon početka ishrane (Varloud i sar., 2018).

2.3. Reakcija akutne faze

Reakcija akutne faze (APR) je sistemska reakcija organizma na lokalni ili sistemski poremećaj homeostaze usled dejstva infekcije, povrede tkiva, neoplazme ili imunološkog poremećaja (Gabay i Kushner, 1999). Svrstava se u urođeni imunitet koji je odgovoran za zaštitu organizma tokom rane faze oštećenja tkiva ili poremećaja homeostaze. To je nespecifična i kompleksna reakcija organizma, javlja se nekoliko minuta nakon narušene homeostaze, a svrha mu je da je obnovi i otkloni uzrok njenog poremećaja. Manifestuje se nizom promena u organizmu kao što su: povišena telesna temperatura, anoreksija, somnolencija, letargija, leukocitoza, aktivacija sistema komplementa, disbalans procesa hemostaze, povećanje nivoa adrenokortikotropnog hormona, glukokortikoida i bakra, smanjenje nivoa tiroksina, kalcijuma, cinka, gvožđa, vitamina A i α -tokoferola. Javljalju se i kataboličke promene (pojačana lipoliza, glukoneogeneza i negativan „bilans azota“), kao i promenjen biosintetski „obrazac“ proteina plazme, prvenstveno zbog metaboličkih promena u jetri (Gruys i sar., 1994; Dinarello, 1983, 1989).

Zbog kompleksnosti i velikog broja fizioloških, imunoloških i biohemijskih mehanizama, treba istaći glavne karakteristike APR (Kajikawa i sar., 1999):

- APR je veoma brz, razvija se pre stimulacije specifičnog imunološkog odgovora i u mnogim slučajevima pre nastanka kliničkih znakova bolesti. Stoga, može se smatrati jednim od najranijih markera svakog patološkog procesa ili oboljenja.
- APR je nespecifična, tj. promene koje nastaju su istovetne bez obzira na uzrok koji je doveo do oštećenja tkiva ili poremećaja homeostaze.
- Tokom APR dolazi do promena u proteinima akutne faze koje su specifične za vrstu.

Funkcija APR je da spreči dalje oštećenja tkiva, otkloni uzrok poremećaja, izoluje i uništi patogen ili infektivni organizam, i da aktivira mehanizme oporavka organizma domaćina (Baumann i Gauldie, 1994). Usled prejakih, hroničnih ili rekurentnih stimulusa, kao i različitih dodatnih poremećaja kod pacijenata, APR može da dovede do obimnijeg oštećenja tkiva i daljih komplikacija (Ceciliani i sar., 2002).

Pokretanje APR uključuje delovanje citokina, tj. polipeptidnih signalnih molekula koji se stvaraju na mestu delovanja faktora koji je doveo do lokalnog ili sistemskog poremećaja homeostaze. Proizvode se u različitim ćelijama, ali najvažniji izvor su makrofagi i monociti. Citokini difunduju u ekstracelularnu tečnost, cirkulišu u krvi, i mogu delovati autokrino, parakrino ili endokrino. Ćelije su vrlo retko izložene dejstvu samo jednog citokina; najčešće se radi o kombinaciji više njih čiji efekti mogu biti antagonistički ili sinergistički (van Miert, 1995). Glavni citokini u APR su: interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), faktor nekroze tumora- α (eng. *Tumor Necrosis Factor Alpha* – TNF- α), interferon- γ (INF- γ) i transformišući faktor rasta β (eng. *Transforming Growth Factor Beta* – TGF- β) (Gabay i Kushner, 1999; Kushner, 1993; Wigmore i sar., 1997).

Koncentracija citokina u serumu povećava se u roku od par sati nakon početnog stimulusa, a potom se u roku od nekoliko sati citokini uklanjaju iz cirkulacije. Iako je promena njihove koncentracije prva promena u organizmu nakon narušene homeostaze, zbog izuzetno kratkog poluživota, retko se koriste u dijagnostičke svrhe (Gruys i sar., 1994; Blackburn, 1994).

Citokini imaju veliki uticaj na neuroendokrini sistem i na metabolizam. Dejstvo na centralni nervni sistem mogu ostvariti: a) pasivnom difuzijom u delovima gde je krvno moždana barijera (eng. *Blood Brain Barrier* – BBB) nerazvijena ili slabo razvijena, kao i na mestima njenog oštećenja; b) aktivnim transportom kroz BBB; c) vezivanjem za receptore na BBB čime aktiviraju sekundarne glasnike koji deluju na neuronsku aktivnost; ili d) vezivanjem za paraganglije koje oslobađanjem neurotransmitera stimulišu *nervus vagus* (Banks i sar., 1995; Maier i Watkins, 1998). Povišena telesna temperatura, karakteristična za APR, je jedan od glavnih znakova neuroendokrinih promena uzrokovanih citokinima (Dinarello, 1999). Povišen nivo glukokortikoida je takođe jedna od posledica delovanja citokina, stimulisanjem stvaranja kortikotropnog oslobađajućeg hormona i posledične reakcije osovine hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlezda, ili povećanjem sinteze glukokortikoida direktnim delovanjem na nadbubrežnu žlezdu (Chrousos, 1995). Od promena u ponašanju indukovanih citokinima javljaju se anoreksija, somnolencija i letargija (Gabay i Kushner, 1999). Citokini takođe menjaju metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina. U hepatocitima menjaju koncentraciju nekih enzima (citohrom P450, azot oksid sintetazu, superoksid dismutazu, hem oksigenazu,) i metalvezujućih proteina, a snižavaju nivo cinka. Takođe, smanjuju ekspresiju receptora za hormon rasta na hepatocitima odnosno nivo insulinu sličnog faktora rasta 1 (Johnson, 1997; Wolf i sar., 1996). Jedna od uloga citokina u APR je stimulacija sinteze proteina akutne faze u jetri.

2.3.1. Proteini akutne faze

Proteini plazme čija se koncentracija menja tokom odgovora akutne faze nazivaju se proteini akutne faze (APP). Glavno mesto njihove sinteze su hepatociti, ali pojedini APP imaju i izoforme koje mogu stvarati endotelne ćelije, fibroblasti, leukociti, epitelne ćelije tubula korteksa bubrega, enterociti, adipociti, epitelne ćelije mlečne žlezde, pneumociti tipa II i alveolarni makrofagi (Dobryszczycka, 1997; Ebersole i Cappelli, 2000; Eckersall i sar., 2001; Fournier i sar., 2000; Jabs i sar., 2003; Kovačević Filipović i sar., 2012; Lin i sar., 2001). Njihova uloga je u kontroli reakcije akutne faze, smanjenju lokalnog oštećenja tkiva i obezbeđenju uslova za odvijanje regeneracije ili reparacije tkiva (Ansar i Ghosh, 2016).

Tokom odgovora akutne faze, koncentracija APP u plazmi menja se značajno i dinamično. Oni čija koncentracija raste nazivaju se pozitivni APP. Kao najznačajniji APP kod pasa se navode serum amiloid A, C reaktivni protein, ceruloplazmin, haptoglobin i fibrinogen. Proteini čija se koncentracija smanjuje, nazivaju se negativni APP. Manje su brojni u odnosu na pozitivne APP, a među najvažnije predstavnike kod pasa se ubrajaju albumin, transferin i paraoksonaza. Pozitivni APP učestvuju u opsonizaciji mikroorganizama i njihovih produkata, aktivaciji sistema komplementa, vezivanju ostataka liziranih ćelija, neutralizaciji enzima, uklanjanju slobodnih radikala i u modulaciji imunološkog odgovora (Jain i sar., 2011).

Sinteza APP je pod kontrolom citokina i hormona (insulin i glukokortikoidi) (Ansar i Ghosh, 2016). Glavni medijator sinteze većine APP u jetri je IL-6, dok IL-1 i TNF- α indukuju sintezu

manjeg broja ovih proteina. Kupferove ćelije nakon stimulacije pro-inflamatornim citokinima proizvode IL-6 koji deluje na hepatocite (Knolle i sar., 1995). Aktiviranjem osovine hipotalamus–hipofiza–nadbubrežna žlezda proizvode se glukokortikoidi. Oni pojačavaju ekspresiju receptora za citokine na hepatocitima i na taj način doprinose sintezi APP (Heinrich i sar., 1990). Glukokortikoidi takođe dovode do smanjene sinteze citokina (IL-1, IL-6 i TNF- α) u monocitima i makrofagima, formirajući sistem negativne povratne sprege između nervnog i imunološkog sistema u cilju kontrole sinteze citokina (Baybutt i Holsboer, 1990). Smanjena proizvodnja IL-1 i TNF- α u mononuklearnim fagocitima postiže se i dejstvom IL-6, čime se kaskadna reakcija ograničava (Schindler i sar., 1990). U regulaciji tj. ograničavanju sinteze APP učestvuje i jetra brzim uklanjanjem citokina iz cirkulacije. Takođe, Kupferove ćelije oslobađanjem IL-10 smanjuju lokalnu proizvodnju IL-6 (Knolle i sar., 1995). Reakcija hepatocita na citokine delom je ograničena i dejstvom IL-1 i IL-4 i pojedinim APP koji mogu promeniti proizvodnju citokina u monocitima (Loyer i sar., 1993; Pue i sar., 1996).

Pozitivni APP mogu se klasifikovati na osnovu stepena promene njihove koncentracije tokom APR. Koncentracija „Major“ ili „glavnih“ APP se povećava 10 do 100 puta, kod „Moderate“ ili „umerenih“ APP dva do 10 puta, dok se blaga povećanja, manja od dvostrukog, beleže za „Minor“ ili „sporedne“ APP (Cerón i sar., 2005).

Porast koncentracija tzv. "brzo reagujućih" APP (npr. serum amiloida A) je veoma izražen tokom četiri sata nakon zapaljenskog stimulusa, nakon čega se brzo snižava na fiziološki nivo (Gabay i Kushner, 1999). Drugi APP se smatraju "sporo reagujućim" budući da se karakterišu kasnijim porastom koncentracije u plazmi, koji se održava do dve nedelje po prestanku stimulusa (Petersen i sar., 2004). Pad koncentracije APP odslikava proces oporavka od oštećenja tkiva ili narušavanja homeostaze, koji se okončava u roku od četiri do sedam dana nakon inicijalnog stimulusa ukoliko nema daljeg oštećenja tkiva. Kada je aktivirana ponovljenim stimulusima, APR može postati hronična. U takvim uslovima, koncentracija APP je povećana, ali u znatno manjem stepenu povećanja u poređenju sa APR (Heegaard i sar., 2000; Murtaugh, 1994). Manjak aminokiselina nastao usled povećane potrošnje zbog proizvodnje pozitivnih APP i drugih važnih medijatora zapaljenja uzrokuje smanjenje koncentracije negativnih APP (Paltrinieri, 2008).

Treba napomenuti da dugo gladovanje, ishrana siromašna proteinima, anoreksija ili oštećenje jetre mogu smanjiti sintezu APP (Gruys i sar., 2005).

Serum amiloid A (SAA) je familija proteina koji su se kroz evoluciju vrlo malo menjali. Pokazano je da različite vrste imaju veliku homologiju DNK domena odgovornih za sintezu ovih proteina, pa tako mišji i ljudski imaju 76 % identičnih sekvenci (Zhang i sar., 2019). Pored sisara, pronađeni su kod riba (Jensen i sar., 1997), a pronalazak kod bodljokožaca ukazuje da je SAA nastao pre više od 500 miliona godina. Zbog toga se može zaključiti da SAA ima važnu funkciju u organizmu (Santiago i sar., 2000).

SAA je prvobitno otkriven kao komponenta amiloida u amiloidozi A, nakon čega je dokazano i njegovo prisustvo u plazmi tokom APR, a kasnije i da je on apolipoprotein lipoproteina velike gustine (eng. *High Density Lipoproteins* – HDL), koji je glavni nosilac SAA u krvi (Benditt i Eriksen, 1971; Levin i sar., 1972; Morrow i sar., 1981). SAA ima više izoformi koje se na osnovu

odgovora tokom zapaljenskog stimulusa mogu podeliti u dve grupe. Konstitutivne izoforme SAA prisutne su u uslovima fiziološke ravnoteže (eng. *Constitutive Serum Amyloid A – C-SAA*) i kao apolipoproteini ulaze u sastav HDL. Njihova se koncentracija ne menja tokom zapaljenja. Tokom reakcije akutne faze nastaje serum amiloid A akutne faze (eng. *Acute-Phase Serum Amyloid A – A-SAA*) čija koncentracija intenzivno raste. (Uhlar i Whitehead, 1999).

Glavno mesto sinteze C-SAA i A-SAA je jetra. Tokom APR jetra usmerava veliki deo sintetskih kapaciteta u proizvodnju A-SAA, koji čine oko 3 % njenih ukupno sintetisanih proteina. Koncentracija A-SAA u plazmi povećava se do 1000 puta (Morrow i sar., 1981). Pored povećanja u plazmi, njeno povećanje otkriveno je i u oštećenom tkivu tokom zapaljenske reakcije. Sinteza A-SAA indukovana je sa nekoliko faktora koji variraju u zavisnosti od vrste tkiva i tipa ćelije u kojoj se sintetiše. U jetri ovu ulogu imaju citokini, od kojih su najvažniji IL-1, IL-6 i TNF- α (Uhlar i Whitehead, 1999). Koncentracija A-SAA u plazmi počinje da raste tri do četiri sata nakon zapaljenskog stimulusa i najveću koncentraciju dostiže za 24 h. Pod uslovom da nema daljeg stimulusa, na ovom nivou zadržava se dva dana, a na bazalni nivo vraća se nakon sedam do deset dana (Lindhorst i sar., 1997). Poluživot cirkulišućeg A-SAA je oko 90 minuta (Tape i Kisilevsky, 1990). Pored hepatocita, A-SAA mogu sintetisati i makrofagi, glatkomišićne ćelije, endotelne ćelije, adipociti, Lejdigove ćelije, mononuklearne ćelije slezine, Kupferove ćelije, granulociti, sinovijalni fibroblasti, hondrociti i epitelne ćelije mlečne žlezde, kolona, prostate, bubrega i pluća (Benditt i Meek, 1989; Marhaug i sar., 1997; Meek i sar., 1994; Rokita i sar., 1987; Urieli-Shoval i sar., 1998; Yamada i sar., 1996).

Uloge A-SAA: Mehanizmi putem kojih A-SAA učestvuje u APR su i dalje predmet istraživanja. Do sada je pokazano da je neophodan za hemotaksu ćelija na mesto zapaljenja, stimulišući migraciju limfocita, monocita, neutrofila, nezrelih dendritičnih ćelija, T-ćelija, mastocita, endotelnih ćelija, glatko mišićnih ćelija i sinovijalnih fibroblasta (De Buck i sar., 2016). Deluje i kao opsonin, vezujući ostatke bakterija, gljiva i parazita u cilju aktivacije komplementa i fagocita (Cray i sar., 2009). Ovaj protein direktno vezuje neke gram-negativne bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Vezivanje se obavlja preko liganda, spoljno membranskog proteina A, koji se nalazi na većini gram-negativnih bakterija. Nakon njihovog vezivanja, A-SAA deluje kao opsonin za makrofage i neutrofile (Hari-Dass i sar., 2005). A-SAA može ispoljiti antivirusnu aktivnost protiv hepatitis C virusa (HCV) kroz inhibiciju replikacije virusa i blokiranjem ulaska virusa u ćeliju. Ovo se može objasniti činjenicom da se A-SAA i HCV vezuju za isti receptor na hepatocitima (Lavie i sar., 2006).

Proinflamatorna aktivnost A-SAA uključuje i indukciju sinteze pro-IL-1 β preko aktiviranja NLRP3 (eng. *Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Family, Pyrin-Domain Containing 3*) tokom akutnog zapaljenja. NLRP3 aktivira kaspazu-1, a ona učestvuje u konverziji pro-IL-1 β u njegov biološki aktivan oblik IL-1 β (Migita i sar., 2012). Indukuje stvaranje i drugih proinflamatornih citokina (IL-1 α , IL-6, IL-23 i TNF- α), hemokina (CXCL8 i CCL2) i enzima razgradnje ekstracelularnog matriksa (kolagenaza, matriks metaloproteinaze 2 i 3) (Ather i sar., 2011; Badolato i Oppenheim, 1996; De Buck i sar., 2016; Griffiths i sar., 2017).

Brza sinteza A-SAA tokom APR dovodi do povećanja njegove koncentracije u plazmi i zamene apolipoproteina HDL sa A-SAA. Koncentracija apolipoproteina A1 (apoA-1), apoA-2, apoC i apoE u HDL, opada tokom APR, njihovo mesto popunjava A-SAA, koji zavisno od stepena zapaljenja može činiti od 30 do 80 % proteinske komponente HDL (Lindhorst i sar., 1997). A-SAA može biti vezan i sa lipoproteinima koji sadrže apoB-100, lipoproteinima male i lipoproteinima vrlo male gustine. Istraživanja gojaznosti i ateroskleroze na miševima ukazuju da ishrana sa visokim udelom masti dovodi do preraspodele A-SAA na lipoproteine koji sadrže apoB-100 (King i sar., 2010; Subramanian i sar., 2008).

Biološke karakteristike HDL koji sadrži A-SAA različite su od fiziološkog HDL, prisutnog u plazmi tokom homeostaze. Ovako izmenjen HDL u zapaljenju učestvuje u recikliranju holesterola. A-SAA pojačava afinitet HDL ka makrofagima, a smanjuje ka hepatocitima. Čišćenjem mesta zapaljenja od eritrocita, mrtvih ćelija i ćelijskih ostataka, makrofagi postaju bogati holesterolom. Nakon ostvarivanja kontakta HDL sa makrofagima, holesterol brzo prelazi na HDL od koga se odvaja A-SAA. Smatra se da takav HDL transportuje holesterol do koštane srži u kojoj se ponovo koristi za hematopoezu, odnosno najverovatnije za granulopoezu. Ovo je korisno za organizam, jer se tokom zapaljenja, zbog povećane proizvodnje eritrocita, leukocita, i ćelija zapaljenja, i zbog obnove oštećenog tkiva, povećavaju potrebe za holesterolom, te se na ovaj način smanjuje njegov gubitak (Kisilevsky i Manley, 2012).

Mnoge proinflamatorne aktivnosti A-SAA, se smanjuju kada je A-SAA vezan za HDL. Na primer, HDL inhibira proizvodnju TNF- α u monocitima indukovanu od strane A-SAA i smanjuje hemotaksične osobine A-SAA (Badolato i sar., 1994; Franco i sar., 2011). Međutim, vezivanje A-SAA za površinu gram-negativnih bakterija nije inhibirano (Hari-Dass i sar., 2005).

Većina poznatih efekata A-SAA je proinflamatorna, on pokazuje i antiinflamatorne karakteristike. A-SAA potencira oslobađanje antiinflamatornog citokina IL-10 (Cheng i sar., 2008; Lee i sar., 2006; Song i sar., 2009), smanjuje groznicu nastalu dejstvom IL-1 i TNF- α . Inhibira proliferaciju limfocita, endotelnih ćelija, agregaciju trombocita i adheziju T limfocita za proteine ekstracelularnog matriksa (Urieli-Shoval i sar., 2000). Inhibicija oslobađanja mijeloperoksidaze i direktne migracije fagocita takođe predstavlja mehanizam putem koga A-SAA smanjuje zapaljenske procese (Gatt i sar., 1998). Inhibicija oksidativnog praska u neutrofilima je još jedna antiinflamatorna uloga A-SAA. Međutim, inhibitorno deluje samo u niskim koncentracijama, dok veće koncentracije ($\geq 50 \mu\text{g/mL}$) stimulišu oksidativni prasak (Gatt i sar., 1998). Uključen je i u inhibiciju proizvodnje antitela, preko inhibicije interakcije makrofaga i T ćelija, ili indukcije supresivnih faktora u makrofagima i u T ćelijama (Aldo-Benson i Benson, 1982). A-SAA stimuliše aktivnost regulatornih T ćelija za koje se smatra da imaju važnu ulogu u imunološkoj toleranciji. Na ovaj način kontroliše jačinu zapaljenskog odgovora i ograničava širenje zapaljenja (Nguyen i sar., 2014).

Serum amiloid A u oboljenjima pasa: Koncentracija SAA u krvi zdravih pasa kreće se u referentnom intervalu (1–4) $\mu\text{g/mL}$ (Tecles i sar., 2005) i ne menja se tokom lokalnog, ali raste tokom sistemskog zapaljenja, pri čemu pokazuje veću osetljivost od tradicionalno korišćenih parametara kao što su telesna temperatura, broj leukocita i neutrofila (Horadagoda i sar., 1999; Mozes i sar., 1989).

Značaj povišenja koncentracije SAA ispitivan je kod brojnih oboljenja pasa, a rezultati ukazuju da se može koristiti kao dijagnostički i prognostički faktor. Porast nivoa SAA se beleži kod postojanja tumora analne žlezde; kod benignih tumora tokom terapije nivo se smanjuje i vraća na fiziološki nivo, dok kod malignih tumora uprkos terapiji ostaje povećan (Lisiecka i sar., 2019). Određivanjem koncentracija SAA omogućava razlikovanje piometre sa otvorenim i zatvorenim grličem materice, procenu težine zapaljenskog procesa i njegovo praćenje (Dabrowski i sar., 2013). Povećana je i kod akutnog oštećenja gastrične mukoze, lajšmanioze, monocitne erlihioze i akutne babezioze (Martinez-Subiela i sar., 2003; Milanovic i sar., 2017; Mylonakis i sar., 2011). Interesantno je naglasiti da se kod pasa koji su inficirani *B. canis* dešava da koncentracija ApoA-1 raste paralelno sa koncentracijom SAA (Milanović i sar., 2019), što je suprotno sa uobičajenim promenama vezanim za APP kod pasa i drugih sisara. Naime, promene koncentracije ApoA-1 su najčešće u negativnoj korelaciji sa koncentracijom SAA (Han i sar., 2006).

Ceruloplazmin je glikoprotein α_2 globulinske frakcije seruma. To je jednolančani molekul izgrađen od 1046 aminokiselina i šest jona bakra. Konformaciono je organizovan u tri homologne jedinice od po dva domena (domen jedan i dva, tri i četiri i pet i šest čine par) (Rydeń L., 1984, Sedlak i sar., 2008). Ove tri jedinice veoma su homologne. Ceruloplazmin je član „*multicopper oxidases*“ porodice i sadrži 95 % ukupne količine bakra u serumu. Bakar ovom proteinu daje plavu boju po kojoj je dobio ime (lat. *Caeruleus* – plavo). Na osnovu spektroskopskih svojstava, atomi bakra koji ulaze u sastav ceruloplazmina, mogu se podeliti na tip I, tip II i tip III. Domeni dva, četiri i šest vezuju po jedan bakar tipa I, dok mesto za vezivanje jednog bakra tip II i dva bakra tip III obezbeđuju zajedno domen jedan i domen šest. Joni bakra tipa II i III formiraju katalitički centar, takozvani trinuklearni klaster, koji ima važnu ulogu u reakcijama oksidacije. Pored toga, povezujući različite delove molekula ceruloplazmina, bakar ima ulogu u formiranju njegove konformacije (Vachette i sar., 2002).

U hepatocitima, glavnom mestu sinteze ceruloplazmina, prvo se sintetiše polipeptidni lanac, a zatim se dodaje bakar. U endoplazmatskom retikulumu nastaje apoceruloplazmin koji prelazi u Goldžijev aparat gde se vrši ugradnja bakra. Bakar u hepatocite unose bakar transportni proteini Ctr1 (eng. *Copper transporter*) i Ctr2. Kada se nađe u ćeliji, bakar se vezuje za šaperon pod nazivom Atox1, koji ga isporučuje bakar transportujućim ATP-azama, kao što je Wilson-ov protein, čime se omogućava ulaz bakra u Goldžijev aparat (Bartnikas i Gitlin, 2001). Ugradnjom bakra u apoceruloplazmin nastaje holoceruloplazmin, aktivni oblik ceruloplazmina (Sato i Gitlin, 1991). Zabeležena je i ekstrahepatična sekrecija ceruloplazmina vezana za ćelije oka, testisa, pluća, slezine i mozga (Aldred i sar., 1987; Fleming i Gitlin, 1990; Klomp i sar., 1996; Mittal i sar., 2003; Salzer i sar., 1998). Pored ceruloplazmina slobodnog u plazmi, u astrocitima i Sertolijevim ćelijama nalazi se forma ceruloplazmina usidrena u membranu ćelija pomoću glikozilfosfatidilinozitola (GPI), što je uzrokovano alternativnim spajanjem egzona 19 i 20 u genu za ceruloplazmin (Fortna i sar., 1999; Mittal i sar., 2003; Patel i David, 1997).

U uslovima deficita bakra, bez obzira na razlog (npr., deficijentna ishrana, mutacije u genima proteina koji učestvuju u prenosu bakra), sinteza apoceruloplazmina nije prekinuta. Međutim, apoceruloplazmin je nestabilan i u velikom stepenu se razgrađuje u hepatocitima, tako da u cirkulaciju dospeva samo mala količina apoceruloplazmina, koji je neaktivan, usled odsustva

bakra, i ima život od svega oko pet sati, za razliku od holoceruloplazmina, čiji život iznosi oko pet dana (Shim i Harris, 2003). U fiziološkim uslovima, ali i tokom APR, odnos apoceruloplazmina i holoceruloplazmina u cirkulaciji iznosi jedan prema devet (Matsuda i sar., 1974).

Uloga ceruloplazmina u oksidaciji gvožđa iz fero oblika u feri oblik otkrivena je 1969. godine (Ragan i sar., 1969). Ostvaruje se zahvaljujući bakru koji povezuje oksidaciju fero jona sa redukcijom molekula kiseonika (Osaki i sar., 1966; Vachette i sar., 2002). Elektron se prenosi sa fero jona vezanog za bakar tip I, na kiseonik vezan za trinuklearni klaster, čiju redukciju prati nastanak molekula vode (Calabrese i sar., 1989). Na ovaj način ceruloplazmin je uključen u metabolizam gvožđa koje se transferinom može prenositi samo u feri obliku. Zbog ove karakteristike, ceruloplazmin se još naziva ferooksidaza (Vulpe i sar., 1999).

Uloga ceruloplazmina u APR: Ceruloplazmin je umereni sporo reagujući APP. Povećanje njegove koncentracije tokom APR posledica je povećane transkripcije gena posredovane citokinima. Povećava se dva do tri puta, sa početkom 24 h nakon inflamatornog stimulusa. Najveću koncentraciju dostiže nakon četiri dana (Cerón i sar., 2005).

Ceruloplazmin ima ulogu u uklanjanju slobodnih radikala. Zbog neutralizacije superoksid anjona smatra se ekstraćelijskom superoksid dismutazom. Zaštitna svojstva pokazuje i neutralizacijom slobodnog radikala azot oksida, što je praćeno redukcijom kupri u kupro jon (Samokyszyn i sar., 1989). Inhibira proizvodnju singlet kiseonika (Joshi, 1998), omogućava inkorporaciju bakra prilikom biosinteze citohrom C oksidaze i superoksid dismutaze (Mukhopadhyay i sar., 1997). Ceruloplazmin je inhibitor mijeloperkosidaze koja tokom inflamacije učestvuje u stvaranju oksidativnih radikala i oštećenju tkiva (Chapman i sar., 2013). Inhibirajući odgovor limfocita indukovani fitohemaglutininom, deluje imunosupresivno (Hou i sar., 2016). Međutim, pojedina istraživanja ukazuju na to da ceruloplazmin može potencirati oksidaciju lipoproteina male gustine i nastanak ateroskleroze (Fox i sar., 2000).

Ceruloplazmin u oboljenjima pasa: Koncentracija ceruloplazmina u krvi zdravih pasa kreće se u referentnom intervalu (1–6) g/L (Tecles i sar., 2005). Povećanje je zabeleženo kod raznih oboljenja, npr., lajšmanioza, autoimuna hemolitička anemija i erlihioza; takođe i kod pasa nakon hiruških intervencija (Conner i sar., 1988; Martinez-Subiela i sar., 2003; Munhoz i sar., 2012; Tecles i sar., 2005). Koncentracija mu je povećana kod pasa sa babezozom, ali znatno više kod komplikovanih formi (Ulutas i sar., 2005). Takođe, porast se beleži i kod parvoviroze, s tim što su uginuli psi imali znatno veću koncentraciju od preživelih (Kocaturk i sar., 2010).

Treba napomenuti da se koncentracije ceruloplazmina izmerene u plazmi i serumu mogu razlikovati, što zavisi od izbora antikoagulansa. U heparinskoj plazmi koncentracija je najveća, manja je u uzorcima sakupljenim sa EDTA (eng. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*), dok vrednosti u citratnoj plazmi odgovaraju onim dobijenim u serumu (Martinez-Subiela i Ceron, 2005).

Albumin je najzastupljeniji protein u krvi, koji čini (35–50) % proteina plazme zdravih pasa (Cerón i sar., 2005). Sa mioglobinom i hemoglobinom ima homologne sekvence, pa se smatra da vode poreklo od istog molekula i da su evoluirali pre 100–530 miliona godina (Brown, 1976). Velika je sličnost u građi među molekulima albumina različitih životinjskih vrsta i ljudi, pa se

danas u terapiji pasa koristi albumin izolovan iz humane krvi (Mathews, 2008). Zbog važne uloge u organizmu, albumin je dugo predmet istraživanja. Tako je zabeleženo da je još pre 500 godina albumin precipitiran iz urina ljudi najverovatnije obolelih od nefrotskog sindroma (Pagel, 1982). Prva terapijska upotreba humanog albumina zabeležena je 1941. godine, kod sedam mornara koji su zadobili teške opekotine nakon napada na Perl Harbor tokom Drugog svetskog rata (Peters Jr., 1995).

Sinteza albumina odvija se uglavnom u jetri i iznosi 10 % ukupne količine proteina sintetisanih u jetri. Nakon proteolize N-kraja na prekursorom molekulu, proalbuminu (Squire i sar., 1968), sintetisani albumin se bez skladištenja u ćeliji izlučuje u cirkulaciju, pri čemu celokupan proces sinteze i sekrecije traje oko 30 minuta (Barle i sar., 1997). Osim u jetri, prisustvo iRNK albumina je pokazano i u pankreasu, bubrezima, mozgu, srcu i plućima (Yoshida i sar., 1997). Aktivna transkripcija gena albumina zabeležena je u tubularnim ćelijama fetalnih i neonatalnih bubrega pacova (Nahon i sar., 1988). Pored toga, albumin i njegova iRNK otkriveni su u retini miša, ukazujući na to da se albumin takođe sintetiše u oku (Dodson i sar., 2001).

Mnogi faktori, kao što su ishrana, koloido-osmotski pritisak, hormoni i različita oboljenja, utiču na sintezu albumina. Koloido-osmotski pritisak koji se detektuje osmoreceptorima u blizini hepatocita glavni je regulator sinteze albumina. Povećanje koloido-osmotskog pritiska dovodi do smanjene sinteze, a njegovo smanjenje stimuliše sintezu (Rothschild i sar., 1988). Sinteza se smanjuje i kod dugotrajnog gladovanja ili ishrane siromašne proteinima (Arnal i sar., 1987), nedostatka insulina, oboljenja jetre (De Feo i sar., 1991), hronične, ali ne i akutne acidoze (Ballmer i sar., 1995; Kleger i sar., 2001) i dejstva proinflamatornih citokina kao što su TNF- α , IL-6 i IL-1 β (Castell i sar., 1989). Suprotno tome, sinteza albumina može se povećati do četiri puta kao odgovor na hipoalbuminemiju, stimulaciju insulinom, glukokortikoidima ili hormonom rasta (Kernoff i sar., 1971; Moshage i sar., 1985; Peavy i sar., 1985; Sun i Kaysen, 1994). Pored njih, sintezu povećavaju i tiroksin i testosteron. Iako je kod pacijenata sa hiperadrenokorticismom i hipertireoidizmom sinteza albumina povećana, ne dolazi do povećanja koncentracije u cirkulaciji, jer istovremeno raste stopa njegove razgradnje i gubitka iz cirkulacije (Rothschild i sar., 1973). Iako su brojna patološka stanja povezana sa povećanom sintezom, osim dehidracije ne postoji stanje sa hiperalbuminemijom, a najveći nivo koncentracije albumina u plazmi se može zabeležiti kod zdravih organizama (Levitt i Levitt, 2016).

Celokupna količina albumina raspoređena je u intravaskularnom (40 %) i intersticijalnom prostoru (60 %). Razmena između ova dva odeljka odvija se konstantno i prosečno iznosi (4–5) % (intravaskularnog dela) tokom jednog sata. U organima koji imaju sinusoide ili kapilare sa fenestriranim endotelom, albumin može preći iz intravaskularnog u intersticijalni deo kroz velike kapilarne otvore. Tamo gde su kapilari sa kontinuiranim endotelom, albumin prelazi aktivnim transportom. Ovo kretanje albumina je jednosmerno, pa se balans održava njegovim povratkom u cirkulaciju preko limfnih sudova (Yoshida i sar., 1997).

Najveća količina albumin se razgrađuje, prvenstveno u jetri, bubrezima i mišićima, a samo mali deo se gubi bubrezima i gastrointestinalnim traktom (Yoshida i sar., 1997). Balansom između

procesa sinteze, razmene između intravaskularnog i intersticijalnog prostora, razgradnje, i eliminacije urinom i fecesom, koncentracija albumina u plazmi održava se konstantnom.

Funkcije albumina u organizmu su veoma brojne. Glavna je komponenta sistema za održavanje koloido-osmotskog pritiska plazme, molekul je koji uklanja slobodne radikale kiseonika, prenosilac je endogenih i egzogenih molekula, ispoljava antikoagulantni efekat i ima značajnu ulogu u održanju pH vrednosti plazme u fiziološkim granicama (Yoshida i sar., 1997).

Većina kapilara ne propušta proteine, te ostajući u cirkulaciji, proteini u njoj zadržavaju i vodu i rastvorene supstance. Albumin ima veliki kapacitet vezivanja vode (18 mL/g) i odgovoran je za 80 % koloido-osmotskog pritiska plazme. Gibbs-Donanovim efektom albumin ostvaruje 40 % svoje koloido-osmotske aktivnosti (Nicholson i sar., 2000).

Albumin poseduje svojstvo da vezuje mnoštvo endogenih i egzogenih jedinjenja. Među njima se nalaze bilirubin, masne i žučne kiseline, vitamini, hormoni, različiti lekovi itd. Takođe, u kompleksu sa albuminom se mogu naći i divalentni katjoni, poput kalcijuma i magnezijuma, kao i metali, npr. bakar i cink. Vezujući ih, albumin reguliše njihovu slobodnu koncentraciju, distribuciju i klirens, a samim tim i biološku funkciju (Fasano i sar., 2005; Levitt i Levitt, 2014). Albumin je takođe sekundarni ili tercijarni transporter određenih molekula koji imaju specifične vezujuće proteine, kao primarne transportere. Kao primer se mogu navesti derivati steroida, vitamin D i tiroksin (čiji su primarni transporteri: vitamin D vezujući protein (eng. *Vitamin D binding Protein*) i tiroksin vezujući globulin (eng. *thyroxine-binding globulin*). Steroidi imaju nizak afinitet vezivanja za albumin, ali su zbog velike koncentracije albumina vezani u velikim količinama za njega. Nizak afinitet vezivanja olakšava njihovo otpuštanje na ciljnim lokacijama (Nicholson i sar., 2000). Na kapacitet vezivanja određenih molekula utiče koncentracija albumina, prisustvo kompetitivnih materija (više vrsta molekula koje vezuje albumin) i komorbiditeti (npr. oboljenje bubrega) (Nicholson i sar., 2000).

Oksidativni stres preko slobodnih radikala kiseonika ili reaktivnih vrsta azota, može oštetiti molekule, dovodeći do nakupljanja toksičnih produkata i disfunkcije ćelije. Albumin čini više od 50 % antioksidansnog kapaciteta plazme. Ova aktivnost pripisuje se mnoštvu tiolnih grupa u albuminu koje učestvuju u neutralizaciji slobodnih radikala kiseonika i azota (Quinlan i sar., 2005). Pored direktne antioksidantne uloge, albumin dodatno doprinosi zaštiti od oksidativnog stresa tako što vezuje azot-oksidi i bilirubin koji takođe poseduju antioksidativna svojstva (Stocker i sar., 1987).

Zbog prisustva velikog broja negativno naelektrisanih grupa u albuminu, mehanizam ispoljavanja antikoagulacionog efekta sličan je heparinu, koji negativno naelektrisanim sulfatnim grupama vezuje pozitivno naelektrisane grupe antitrombina III. Istraživanja su pokazala negativnu korelaciju između koncentracije albumina i potrebe za heparinom kod pacijenata podvrgnutih hemodijalizi (Joergensen i Stoffersen, 1979).

Albumin u APR: Koncentracija albumina u plazmi smanjuje se tokom APR, te je albumin označen kao negativni APP. Kao i kod drugih životinja, kod pasa su zabeležena brojna oboljenja sa značajnim padom koncentracije albumina. Neka od njih su parvoviroza, spirocerkoza i

dirofilarioza (Kocaturk i sar., 2015; Mendez i sar., 2014; Nivy i sar., 2014) Jedno od tih oboljenja je i babezioza (Lobetti i sar., 2000; Maegraith i sar., 1957).

Tokom APR, sinteza albumina je smanjena, jer osobođeni citokini smanjuju transkripciju gena za albumin i usmeravaju amino-kiseline ka sintezi pozitivnih APP (Moshage i sar., 1987). Kod pacova sa indukovanom inflamacijom, sinteza albumina se smanjuje i dostiže minimum nakon 36 sati, a zatim počinje da raste. Ukoliko inflamatorni odgovor potraje duže, produžava se i inhibicija sinteze (Liao i sar., 1986). Međutim, pojedina istraživanja pokazuju da je apsolutna sinteza albumina povećana uprkos niskoj plazma koncentraciji (Barle i sar., 2006; Barle i sar., 1997; Essen i sar., 1998). Uz smanjenu sintezu, povećan katabolizam albumina i povećan izlazak u intersticijum dovode do smanjenja njegove koncentracije u plazmi (Guyton i Lindsey, 1959).

Tokom APR koncentracija albumina se smanjuje u roku od nekoliko sati. Kako poluživot albumina u cirkulaciji zdravih pasa iznosi 8,2 dana, brz pad koncentracije rezultat je brzog gubitka albumina iz vaskularnog prostora do kog dolazi usled povećane kapilarne filtracije (Dixon i sar., 1953; Fleck i sar., 1985; Parving i sar., 1974). Sa povećanim protokom albumina kroz kapilare, trebalo bi da dođe do povećanja dotoka limfe u intravaskularni odeljak. Međutim, istraživanja su pokazala da tokom APR to nije slučaj, već dolazi do smanjene stope protoka limfe i koncentracije albumina u njoj (Hoye i sar., 1972).

Paraoksonaza 1 (PON1) je glikoproteinski enzim, pronađen kod različitih vrsta sisara. Sadrži dva kalcijumova jona. Jedan je neophodan za katalitičku aktivnost i za njega je vezan fosfatni anjon. Drugi je značajan za stabilizaciju strukture enzima. Uklanjanje kalcijuma helatnim agensima [poput antikoagulanasa EDTA i EGTA (eng. *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)] nepovratno uništava aktivnost i stabilnost PON1 (Draganov i La Du, 2004; Kuo i La Du, 1998). Aldridge je 1953. godine PON1 okarakterisao kao A-esterazu, enzim koji hidrolizuje organofosfate i aromatične estre, dok su B esteraze bile inhibirane paraoksonom ili drugim organofosfatima (Aldridge, 1953). Kasnije je zbog svoje sposobnosti da detoksikuje paraokson, aktivni metabolit organofosfatnog insekticida, ovaj enzim postao poznat kao paraoksonaza (Mackness i Mackness, 2015).

Glavno mesto sinteze PON1 je jetra, odakle se izlučuje u cirkulaciju gde je najvećim delom vezan za HDL (Mackness i sar., 2010). Za razliku od većine proteina, PON1 zadržava hidrofobnu signalnu sekvencu na N- kraju koja ima ključnu ulogu u sekreciji (Martoglio i Dobberstein, 1998). Nakon sinteze PON1 se nakuplja na plazma membrani, zatim prebacuje na njenu spoljašnju stranu, gde se privremeno vezuje za HDL. Zatim se pomoću hidrofobnog N kraja PON1 vezuje za hidrofobni deo HDL i u toj formi se nalazi u cirkulaciji (Sorenson i sar., 1999). Pored HDL, manja količina PON1 vezana je sa VLDL i hilomikrone (Fuhrman i sar., 2005). Odvajanje od ćelijske membrane ćelije u kojoj je sintetisan PON1 podstaknuto je česticama HDL, VLDL i u mnogo manjem obimu postprandijalnim hilomikronima, ali ne i LDL (Fuhrman i sar., 2005). Većina PON1 vezana je za HDL koji sadrži ApoA-1, dok HDL koji sadrži klasterin (apolipoprotein J) vezuje približno 30 % ukupnog PON1. ApoA-1 nije neophodan za vezivanje PON1 na HDL, međutim važan je za stabilnost i aktivnost enzima (Blatter i sar., 1993; Deakin i James, 2004).

Imunohistohemijskim bojenjem tkiva pacova, pored jetre, prisustvo PON1 otkriveno je u bubrezima, plućima i mozgu (Rodrigo i sar., 2001). Istraživanja na miševima su osim, u hepatocitima, pokazala prisustvo PON1 u adipocitima, hondrocitima, spermatozoidima i epitelnim ćelijama kože, želuca, creva, traheje i bronhiola, odnosno ukazala na mogućnost postojanja lokalne sinteze (Marsillach i sar., 2008).

Funkcija paraoksonaze 1: PON1 ima organofosfataznu, arilesteraznu i laktonaznu aktivnost, pa hidrolizuje različite vrste supstrata. Antioksidativne osobine ovog enzima se ogledaju u „zaštiti“ HDL i LDL od oksidacije odnosno razgrađivanju biološki aktivnih, oksidovanih lipida na lipoproteinima i ćelijama arterija (Aviram, 2004; Draganov i La Du, 2004; Nguyen i sar., 2009). Takođe, suzbija diferencijaciju monocita u makrofage, čime ispoljava antiinflamatorno dejstvo i ograničava proces stvaranja penastih ćelija, te tako smanjuje stvaranje ateroskleroznih plakova (Berrougui i sar., 2012). Posедуje aktivnost sličnu fosfolipazi A₂ koja je odgovorna za hidrolizu oksidovanih fosfolipida (Ceron i sar., 2014).

Paraoksonaza 1 kao akutno fazni protein: PON1 je negativni APP. Kada je APR indukovna aplikacijom lipopolisaharida, količina iRNK za PON1 u jetri opada posle 4 časa, a aktivnost PON1 na periferiji se smanjuje nakon 24 časa. Delovanjem TNF- α , IL-1 i IL-6 koji se oslobađaju tokom APR, takođe dovodi do smanjene aktivnosti PON1 na periferiji i nivoa iRNK za PON1 u jetri (Feingold i sar., 1998; Van Lenten i sar., 2001). Do pada aktivnosti PON1 tokom APR, osim usled dejstva citokina, verovatno dolazi i zbog povećanog vezivanja slobodnih radikala za PON1 i njegove inaktivacije (Novak i sar., 2010).

Smanjenje aktivnosti PON1 zabeleženo je kod pasa inficiranih *Dirofilaria immitis*, pri čemu nije bilo razlike u aktivnosti PON1 između simptomatickih i asimptomatskih (Mendez i sar., 2014). Ispitivanje na psima sa lajšmaniozom pokazalo je da do promene aktivnosti ne dolazi kod svih obolelih, ali njen pad može ukazati na težinu oboljenja. Aktivnost PON1 normalizuje se pre drugih inflamatornih markera, pa se njenim određivanjem može pratiti odgovor na terapiju (Rossi i sar., 2014a). Tokom akutne babezioze pasa dolazi do značajnog pada aktivnosti PON1, koja šestog dana nakon terapije raste a sedmog dana se vraća u okvire referentnih vrednosti (Rossi i sar., 2014b).

2.3.2. Gvožđe kao negativni reaktant akutne faze

Gvožđe je metal neophodan za funkcionisanje većine živih organizama. Javlja se u različitim oksidacionim stanjima, od -2 do +7, a biološki su najvažniji fero (Fe²⁺) i feri (Fe³⁺) oblik. Redoks reakcije koje uključuju fero i feri oblik su neophodne za funkcionisanje mnogih ćelija (Smith, 1997).

Gvožđe ima nekoliko vitalnih funkcija u organizmu. Učestvuje u prenosu kiseonika iz pluća u tkiva pomoću hemoglobina u eritrocitima, skladištenju kiseonika u mioglobinu mišića, prenosu elektrona unutar ćelija, oksidativnoj fosforilaciji i regulaciji oksido-redukcionih reakcija. Sastavni je deo različitih enzima koji učestvuju u proizvodnji energije, oksidaciji amino-kiselina, desaturaciji masnih kiselina, sintezi steroidnih hormona i žučnih kiselina. Neophodno je za replikaciju i popravku DNK oštećenja, kao i limfocitnu odnosno makrofagnu diferencijaciju (Cronin i sar., 2019). Pošto lako prima ili donira elektrone, slobodno gvožđe veoma je reaktivno

i u velikim koncentracijama može biti toksično. Učestvuje u Fentonovoj reakciji u kojoj sa vodonik-peroksidom stvara slobodne radikale. Slobodni radikali oštećuju DNK, lipide i proteine, usled čega u ćelijama nastaje oksidativni stres usled prisustva slobodnog gvožđa. Održavanje homeostaze gvožđa od suštinskog je značaja za neometano funkcionisanje ćelija, i za sprečavanje oksidativnog oštećenja (Gozzelino i Arosio, 2016). Da bi se sprečila citotoksičnost izazvana akumulacijom gvožđa, ćelije su tokom evolucije razvile brojne kompleksne mehanizme koji precizno kontrolišu njegov nivo. Ovi mehanizmi uključuju regulisanje unosa gvožđa u ćelije, njegovo skladištenje u feritinu, ugradnju u proteine i regulisanje njegovog oslobađanja u međućelijski prostor (Geissler i Singh, 2011). Najveći procenat gvožđa nalazi se u eritrocitima (hemoglobin), a znatno manje u hepatocitima (feritin) i mišićima (mioglobin) (Neumann, 2003).

U homeostazi gvožđa učestvuju: enterociti duodenuma, koji apsorbuju gvožđe iz hrane, makrofagi, u kojima se reciklira gvožđe iz eritrocita i drugih ćelija, i hepatociti, koji skladište gvožđe i po potrebi ga mogu osloboditi u cirkulaciju. Organizam ne poseduje mehanizme za ekskreciju gvožđa, pa je njegov gubitak mali i odvija se preko deskvamisanih epitelnih ćelija i krvarenjem (Green i sar., 1968). Ishranom se unosi dovoljna količina gvožđa da se nadoknadi gubitak, odnosno zadovolje dodatne potrebe usled rasta ili hipoksije. U hrani, gvožđe je prisutno u organskom (hem-Fe) i neorganskom obliku. Kiselo okruženje u želucu i izloženost digestivnim enzimima delimično oslobađa gvožđe iz hrane (Silvestri i sar., 2008).

Apsorpcija hem-Fe odvija se preko HCP-1 (eng. *Hemecarrier Protein-1*) na enterocitima duodenuma i proksimalnog jejunuma. U enterocitima hem-Fe razgrađuje se delovanjem enzima HO-1 (eng. *Heme Oxygenase-1*) koji katabolizuje hem. Njegovim delovanjem oslobađa se ugljenmonoksid, bilirubin i fero gvožđe (Ryter i Tyrrell, 2000; Shayeghi i sar., 2005). Neorgansko gvožđe u enterocite duodenuma unosi DMT-1 (eng. *Divalent Metal Transporter-1*) u dvovalentnom obliku. Redukciju trovalentnog u dvovalentni oblik obavlja feroreduktaza Dcytb (eng. *Duodenal cytochrome-b*) vezana za membranu enterocita duodenuma (McKie i sar., 2001). Delimičnom povećanju apsorpcije doprinosi askorbinska kiselina kroz povećanje redukcionih aktivnosti Dcytb-a (McKie, 2008). Oslobođen fero oblik u enterocitima skladišti se vezivanjem za feritin. Kada se u organizmu javi potreba za gvožđem, njega iz enterocita u plazmu, preko bazolateralne membrane, iznosi ferroportin (FPN). Po napuštanju ćelije dolazi do oksidacije u feri oblik, delovanjem hefestina, nakon čega se vezuje za transferin (Tf) i prenosi do perifernih tkiva, gde ga ćelije mogu preuzeti posredstvom transferinskog receptora tip 1 (Ganz, 2005). Nakon unosa u ćeliju i odvajanja od Tf, transmembranska metaloreduktaza Steap3 redukuje feri u fero oblik i oslobađa ga u citoplazmu (Knutson, 2007). Količina gvožđa koja se iz hrane prenosi u cirkulaciju ne zavisi od apsorpcije koju obave enterociti, već od dostupnosti FPN. Gvožđe koje ne napusti enterocite, brzo se gubi iz organizma zamenom epitela (Creamer, 1967).

Količina gvožđa koja se unosi hranom je manja, od količine koju obezbeđuje recikliranje hemoglobina iz eritrocita u makrofagima (Finberg, 2011). U fagolizozomima makrofaga razaraju se fagocitovani eritrociti i njihov hemoglobin, oslobađajući hem koji se razgrađuje HO-1. Gvožđe se iz makrofaga iznosi na sličan način kao iz enterocita, posredstvom FPN-a. Po napuštanju makrofaga ceruloplazmin oksiduje fero u feri oblik koji se zatim vezuje za Tf (De Domenico i sar., 2007). Tako, nezavisno od izvora, cirkulišuće gvožđe vezano za Tf predstavlja

gvožđe dostupno za unos u ćelije. Gvožđe koje se ne iskoristi u ćelijama skladišti se u feritinu hepatocita, odakle se po potrebi oslobađa (Neumann, 2003).

Kretanje gvožđa kroz različita tkiva ključno je za njegovu homeostazu. U tom procesu centralnu ulogu ima FPN, jedini transporter koji omogućava ulaz gvožđa u cirkulaciju. Ekspresiju FPN-a reguliše peptidni hormon hepcidin (Ganz, 2005).

Hepcidin je zbog antimikrobnih svojstava prvobitno nazvan antimikrobni protein jetre 1 (Krause i sar., 2000). Pored jetre, koja je glavno mesto njegove sinteze, proizvodi se i u ćelijama imunološkog sistema (makrofagi, neutrofili) (Sow i sar., 2007; Theurl i sar., 2008). On smanjuje nivo cirkulišućeg gvožđa inhibirajući izlaz gvožđa iz enterocita, makrofaga i hepatocita (Ganz i Nemeth, 2012).

Promena nivoa transkripcije hepcidina, i njegove sinteze, javlja se kao odgovor na inflamatorne citokine i promenenu koncentraciju gvožđa (Lee i sar., 2005; Nemeth i sar., 2004a). Kada se u plazmi ili tkivu poveća koncentracija gvožđa, poveća se i sinteza hepcidina. Hepcidin se vezuje za ekstracelularni deo FPN-a, dovodeći do njegove internalizacije i razgradnje, smanjujući na taj način količinu gvožđa koja prelazi u plazmu. Suprotno ovome, kada se nivo gvožđa u plazmi ili tkivu smanji, ili se povećaju potrebe za njim, sinteza hepcidina je smanjena a posledično je povećan nivo FPN-a i veća količina gvožđa prelazi u cirkulaciju. Na ovaj način hepcidin-FPN održava koncentraciju gvožđa u cirkulaciji u uskom fiziološkom opsegu (Nemeth i sar., 2004b). Treba napomenuti da se kod mladunaca glodara i beba starih četiri do šest meseci intestinalna apsorpcija gvožđa ne može ograničiti hepcidinom, omogućavajući tako maksimalan unos iz majčinog mleka u periodu kada su povećane potrebe za gvožđem (Darshan i sar., 2011).

Metabolizam gvožđa tokom inflamacije: Infektivna i neinfektivna inflamatorna stanja povezana su sa značajnim promenama u metabolizmu gvožđa – dolazi do pada njegove koncentracije u cirkulaciji, pa se smatra negativnim reaktantom akutne faze (Feldman i sar., 1981). Na primer, tokom akutne faze erlihioze pasa, nivo gvožđa značajno opada (Bottari i sar., 2016). Takođe, zabeleženo je smanjenje koncentracije gvožđa kod 60 % pasa sa raznim inflamatornim oboljenjima (Neumann, 2003). Primećeno je da nivo gvožđa opada u roku od 3–6 časova nakon dejstva inflamatornih citokina (Northrop-Clewes, 2008).

Uzrok sniženja nivoa su promene u ćelijskom metabolizmu i tkivnoj distribuciji, u čijoj se osnovi nalazi povećana ekspresija hepcidina (Wessling-Resnick, 2010). IL-6 je jedan od glavnih regulatora ekspresije hepcidina. Vezivanjem za gp130 receptor na hepatocitima, IL-6 aktivira JAK (eng. *Janus Kinases*) koja fosforiliše transkripcijski faktor STAT3 (eng. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) koji se vezuje za promotor gena hepcidina i povećava njegovu ekspresiju (Wrighting i Andrews, 2006). Istraživanjima na kulturi ćelija pokazano je da i IL-1 i IL-22 pojačavaju ekspresiju hepcidina (Lee i sar., 2005; Smith i sar., 2013).

Interesantno je da TNF- α smanjuje koncentraciju cirkulišućeg gvožđa mehanizmima nezavisnim od hepcidina. On deluje na makrofage da pojačaju fagocitozu eritrocita (Kitagawa i sar., 1996), i na epitelne ćelije bronhija da pojačaju ekspresiju DMT1 (Kabyemela i sar., 2008). Posledica ovih efekata je povećanje koncentracije gvožđa u ćelijama, a smanjenje u cirkulaciji.

Tokom infekcije, postoji kompeticija za gvoždem između domaćina i mikroorganizama, pri čemu je mnogima gvožđe neophodno za preživljavanje i proliferaciju. Generalno, visoka količina gvožđa u organizmu stimuliše razvoj infekcije, a smanjenjem količine gvožđa, patogenima se ograničava dostupnost ovog značajnog faktora rasta, čime se obezbeđuje relativna rezistencija na infekciju. Ovaj način borbe sa infektivnim agensima nazvan je „nutritivni imunitet“ (Soares i Weiss, 2015).

2.3.3. Hemostaza i reakcija akutne faze

Inflamacija i hemostaza su međusobno povezani procesi sa ciljem odbrane organizma i obnove homeostaze. Iako je hemostatski sistem važan za pravilno funkcionisanje organizma, u slučaju jake i nedovoljno kontrolisane aktivnosti on može doprineti pogoršanju opšteg stanja. Teška inflamacija dovodi do poremećaja hemostaze koja se ispoljava u različitom stepenu. Može se ispoljiti u vidu tromboembolije, ozbiljnog poremećaja hemostaze usled masovnog stvaranja tromba i taloženja fibrina u mikrocirkulaciji. Najteži oblik predstavlja diseminovana intravaskularna koagulacija, u okviru koje dolazi do pojave raširene mikrovaskularne tromboze, trombocitopenije, potrošnje fibrina i drugih koagulacionih odnosno antikoagulacionih faktora, te obimne aktivacije fibrinolitičkih procesa i posledičnih nekontrolisanih krvarenja (Levi i sar., 2010; Semeraro i sar., 2010).

Mehanizam odgovoran za promenjen hemostatski odgovor tokom inflamacije posredovan je prekomernim i nekontrolisanim delovanjem inflamatornih medijatora, naročito proinflamatornih citokina, od kojih su najvažniji TNF- α , IL-1 i IL-6 (Levi i van der Poll, 2005). U takvim situacijama izmenjena je sinteza proteina uključenih u hemostazu. Ovi proteini još se nazivaju hemostatski APP, a najvažniji među njima čija se koncentracija povećava su: fibrinogen, faktor koagulacije VIII, protein S, PAI-1 (eng. *Plasminogen Activator Inhibitor*), C4b vezujući protein, urokinaza, α 1 antitripsin, α 2 makroglobulin, Fon Vilebrandov faktor, C1 inhibitor esteraze, C reaktivni protein i trombopoetin. Proteini čija se koncentracija smanjuje su: faktor XII, antitrombin, histidinom bogat glikoprotein, trombomodulin i EPCR (eng. *Endothelial Protein C Receptor*). Promena hemostaze nastaje na svim nivoima uključujući vaskularne endotelne ćelije (EĆ), trombocite, tkivni faktor (TF), fiziološke antikoagulacione puteve i fibrinoliznu aktivnost (Aird, 2003).

Prokoagulansi krvi: Pod fiziološkim uslovima EĆ imaju veoma važnu ulogu u održavanju balansa hemostaze. U EĆ se stvaraju brojni molekuli koji kao stimulatori ili inhibitori učestvuju u inflamaciji, koagulaciji i fibrinolizi. Tokom inflamacije, proinflamatorni citokini (TNF- α , IL-1 i IL-6), narušavaju funkciju EĆ, pa se pojačano izlučuju prokoagulantne i antifibrinolitičke supstance, a smanjeno antikoagulantne. Pored toga, EĆ na svojoj površini mogu da ispolje TF i adhezivne molekule. Adhezivni molekuli imaju važnu ulogu u interakciji neutrofila i trombocita sa endotelom, tako da stimulišu inflamaciju i koagulaciju (Levi i sar., 2002).

Pored aktivacije, i stvaranje trombocita može biti povećano posredstvom molekula sekretovanih iz EĆ, a aktivacija novonastalih trombocita se postiže pri nižim koncentracijama trombina (Burstein, 1997). Osim posredstvom EĆ, trombociti se mogu aktivirati i direktno proinflamatornim citokinima, nakon čega se adheriraju za zidove krvnih sudova formirajući primarni ugrušak (Zimmerman i sar., 2002). Aktivirani trombociti sekretuju IL-1, vezivanjem

za EĆ stimulišu izlučivanje IL-6, a interakcijom sa neutrofilima aktiviraju ih i dodatno učestvuju u inflamaciji (Gawaz i sar., 2000).

Tkivni faktor je transmembranski protein koji vezuje VII faktor koagulacije i prevodi ga u aktivni oblik VIIa. Kompleks TF-VIIa inicira koagulaciju i učestvuje u formiranju ugruška. TF glavni je pokretač normalne i patološke koagulacije. U fiziološkim uslovima je eksprimiran samo na ćelijama izvan cirkulacije, kao što je adventicijalni sloj krvnih sudova, gde ima važnu ulogu u hemostazi ograničavanjem krvarenja nakon povrede (Schouten i sar., 2008). Tokom narušenog integriteta krvnih sudova ili nakon dejstva citokina TNF- α i IL-1, TF se eksprimira na EĆ i ćelijama krvi, najviše monocitima i makrofagima. Njegovom ekspresijom pokreće se kaskada koagulacije, putem koje nastaje trombin čija je glavna funkcija pretvaranje fibrinogena u fibrin i posledično formiranje krvnog ugruška. Pored uloge u koagulaciji, trombin ima i proinflatornu aktivnost. Aktivira leukocite i EĆ sa posledičnim povećanjem proizvodnje medijatora inflamacije, adhezije leukocita i hemotakse (Margetic, 2012).

Antikoagulansi krvi: U regulaciji hemostaze važnu ulogu imaju tri proteina, čija je glavna funkcija sprečavanje koagulacije u fiziološkim uslovima: antitrombin III (AT), protein C (PC) i inhibitor tkivnog faktora (eng. *Tissue Factor Pathway Inhibitor* – TFPI). Tokom inflamacije aktivnost sva tri se smanjuje.

Antitrombin III je glavni inhibitor trombina, faktora koagulacije Xa, IXa i kompleksa TF-VIIa. Posедуje i antiinflatornu aktivnost. Vezujući trombin smanjuje adheziju, migraciju i aktivaciju leukocita, odnosno utiče na funkcionalnu aktivnost EĆ i trombocita (Ostrovsky i sar., 1997). Tokom inflamacije nivo AT se smanjuje usled povećane potrošnje i aktivirane koagulacije, a delom i zbog povećane razgradnje proteolitičkim enzimima oslobođenim iz aktiviranih neutrofila. *In vitro* je pokazano da se koncentracija AT smanjuje i nakon dejstva IL-6. Pored toga, proinflatorni citokini smanjuju sintezu glikozaminoglikana (koji promovišu antikoagulacijsku aktivnost AT) posledično smanjujući funkciju AT (Bourin i Lindahl, 1993; Niessen i sar., 1997).

Protein C sa kofaktorom proteinom S, inaktivira faktor Va i VIIIa. Deluje i antiinflatorno inhibicijom proizvodnje TNF- α , IL-1 i IL-6 u makrofagima (Okajima, 2001), odnosno sprečavanjem hemotakse i adhezije leukocita na endotel (Bernard i sar., 2001). Kao i u slučaju AT-a, tokom inflamacije, funkcija PC je oslabljena zbog smanjene sinteze, povećane potrošnje i degradacije (Levi i van der Poll, 2010).

TFPI sprečava koagulaciju inhibiranjem serin proteaze. Sekretuju ga EĆ, a za endotel je vezan preko glikozaminoglikana (Broze, 1995). Kao što je pomenuto, proinflatorni citokini smanjuju sintezu glikozaminoglikana, što može uticati na funkciju TFPI. Međutim, relativno malo se zna o uticaju inflamacije na funkciju TFPI (Levi i van der Poll, 2010).

Fibrinolitički sistem sastavni je deo regulacije hemostaze. U razgradnji krvnog ugruška glavnu ulogu ima plazmin koji nastaje aktivacijom plazminogena. Jedan od glavnih mehanizama inhibicije fibrinolize tokom inflamacije je povećana proizvodnja inhibitora aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) u EĆ, pod dejstvom TNF- α i IL-1 (van der Poll i sar., 2001). Molekuli

PAI-1 se nalaze i u alfa granulama trombocita iz kojih se oslobađaju nakon njihove aktivacije, što dodatno doprinosi inhibiciji fibrinolize (Levi i van der Poll, 2010).

2.4. Sepsa

Sepsa je jedan od najranije prepoznatih sindroma u medicini. Razumevanje patofizioloških mehanizama sepse kao i njena definicija godinama su se transformisali i prilagođavali kliničkim zapažanjima i otkrićima patogeneze ovog sindroma. Reč „sepsa” potiče od grčke reči „σηψις” koja označava raspadanje ili truljenje organske materije u prisustvu bakterija. Islamski filozof Ibn Sina, 1000 godina pre nove ere, opisao je sepsu kao truljenje tkiva i krvi sa povišenom temperaturom. Homer ju je pominjao u pesmama od pre oko 2700 godina (Majno, 1991). U svojim radovima sepsu su pominjali i Hipokrat i Galen. Učenje starih Grka nastavili su Rimljani koji su smatrali da je sepsa rezultat dejstva nevidljivih organizama. Teorija o ovim štetnim organizmima činila je temelje početka javnog zdravstva Rima (Funk i sar., 2009). Mnogo kasnije, sa otkrićem mikroorganizama, sepsa je smatrana sistemskom infekcijom, koja je opisivana kao trovanje krvi, i pretpostavljalo se da je ona rezultat invazije mikroorganizama koji se šire krvotokom. Međutim, uvođenje antibiotika u terapiju nije u potpunosti sprečavalo razvoj sepse—mnogi pacijenti umirali su uprkos uspešnoj eliminaciji patogena. Tako se došlo do zaključka da mikroorganizmi nisu jedini faktor važan za patogenezu sepse. Kasnije je pokazano da su i faktori vezani za domaćina važni za razvoj sepse (Cerra, 1985). Tokom 20. veka brojna istraživanja pokazala su važnost imunološkog sistema domaćina u ispoljavanju sepse. Međutim, zbog raznolikosti oboljenja, bilo je poteškoća u njenom dijagnostikovanju, lečenju i proučavanju.

Dijagnoza sepse dugo je bila zasnovana na dokazivanju bakterijemije. Sa boljim razumevanjem njene patogeneze, definicija je izmenjena 1992. godine te je sepsa povezana sa sistemskom inflamacijom. Tada je definisan i sindrom sistemskog inflamatornog odgovora, za koji se koristi engleska skraćenica SIRS (eng. *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). SIRS zapravo obuhvata sva stanja kod kojih oštećenje tkiva nastaje zbog preteranog inflamatornog odgovora, bez obzira na etiološki agens koji je doveo do primarnog oštećenja. Dakle, sepsa je deo šireg sindroma nazvanog SIRS. Sepsa je specifično izazvana mikroorganizmima i/ili njihovim toksinima. Podgrupe sepse su: teška sepsa, septični šok i MODS (eng. *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*) (Bone i sar., 1992). Lista dijagnostičkih kriterijuma na osnovu kojih je definisana sepsa proširena je 2001. godine (Levy i sar., 2003). Podela težine inflamatornih procesa na SIRS, sepsu, tešku sepsu, septični šok, kao i MODS, opšte je prihvaćena i u veterinarskoj medicini.

Kriterijumi za definisanje SIRS-a služe i za definisanje sepse. Da bi se kod pasa postavila dijagnoza SIRS, potrebno je da budu ispunjena najmanje dva od sledećih uslova (DeClue, 2017):

- telesna temperatura iznad 39,2 °C ili ispod 37,2 °C;
- tahikardija (više od 140 otkucaja srca u minutu);
- tahipneja (frekvencija veća od 40 u minutu);
- ukupan broj leukocita veći od $19,5 \cdot 10^9/L$ ili manji od $5 \cdot 10^9/L$ ili procenat mladih neutrofila veći od 5.

Sepsa se dijagnostikuje ako se uz infekciju javi SIRS, teška sepsa ako se tokom sepse uoči i disfunkcija organa, hipotenzija ili hipoperfuzija, a septični šok ako nastala hipotenzija ne reaguje na terapiju. Dalje pogoršanje, sa izmenjenom funkcijom dva ili više organa, dovodi do nastanka MODS-a (Martin, 2012).

Ovakva definicija sepse mogla je biti primenjena na velikom broju pacijenata sa nekomplikovanim infekcijama za koje se, sa kliničkog gledišta, činilo neodgovarajućim smatrati ih septičnim. Nova definicija, iz 2016. godine, posmatra sepsu kao životno ugrožavajuću disfunkciju organa, uzrokovanu neadekvatnim odgovorom domaćina na infekciju. Karakteriše je disfunkcija tkiva koja nisu direktno povezana sa infektivnim procesom. Ovakva definicija sepse čini termin teška sepsa suvišnim, pa je on isključen iz dalje primene. Termin septični šok i dalje je u upotrebi i definisan je kao sepsa sa poremećajem u cirkulaciji i ćelijskom metabolizmu takve težine da mogu značajno doprineti smrtnom ishodu (Singer i sar., 2016).

2.4.1. Promene u koncentraciji proteina akutne faze tokom sepse

Patofiziološki mehanizmi u razvoju sepse su složeni i uključuju sve mehanizme nastanka APR, a samim tim i promene u koncentracijama APP. Određivanje koncentracije SAA pomaže kod ranog dijagnostikovanja sepse, kao i u prognozi oboljenja (Raju i sar., 2016; Yahia i sar., 2019; Yu i sar., 2018; Yuan i sar., 2013). Drugi pozitivan APP, ceruloplazmin, korelira sa biohemijskim parametrima koji pokazuju oštećenje organa tokom sepse (Chiarla i sar., 2008). Albumin, kao negativan APP, pokazuje značajniji pad ukoliko je sepsa teža, odnosno ukoliko dođe do razvoja septičnog šoka (Garnet i sar., 2016). Takođe, pokazana je i povezanost njegovog pada sa povećanjem rizika od letalnog ishoda (Takegawa i sar., 2019; Yin i sar., 2018). Aktivnost PON1 niža je kod septičnih pacijenata, odražava težinu oboljenja i pokazuje rizik od smrtnog ishoda (Bojic i Kotur-Stevuljevic, 2014; Draganov i sar., 2010). Pored APP, i koncentracija gvožđa pokazuje povezanost sa sepsom, budući da dolazi do njegovog smanjenja (Missano Florido i sar., 2012).

2.4.2. Sepsa kod babezioze pasa

Babezioza pasa može se klasifikovati kao komplikovana i nekomplikovana, a komplikovana se može manifestovati kao SIRS i MODS (Lobetti, 1998). Promena broja leukocita karakteristika je SIRS-a i zabeležena je kod pasa sa babezozom koji često imaju leukopeniju, limfopeniju i neutropeniju sa pojavom mladih neutrofila. Iako veoma retko, opisani su i slučajevi sa leukocitozom. Sepsa, odnosno SIRS kao posledica infekcije babezijama se još karakteriše i promenom koncentracije citokina i APP. Istraživanja na teritoriji Zagreba, Republika Hrvatska, pokazala su da je 68 % pasa sa babezozom ispunilo kriterijume za SIRS, a 10 % kriterijume MODS (Matijatko i sar., 2010).

2.5. Klima i klimatske promene

Pod klimom se podrazumevaju prosečne vremenske prilike u određenoj oblasti tokom dužeg perioda. Prema uputstvu Svetske meteorološke organizacije, za izračunavanje prosečnih vrednosti koristi se period od 30 godina. Opis klime uključuje informacije o temperaturi, vlažnosti vazduha, vazдушnom pritisku, padavinama, oblačnosti i vetrovima. Primera radi,

klima Beograda u Kepen-Gajgerovoj klasifikaciji spada u umereno kontinentalnu vlažnu sa vrućim letom (Kottek i sar. 2006). Za period 1981–2010, srednja godišnja temperatura Beograda je 12,5 °C, prosečna relativna vlažnost vazduha 68 %, prosečna količina padavina 690,9 mm i prosečno je 33 dana u godini sa snegom (RHMZS, 2021a). Vetar u Beogradu najčešće duva iz pravca jugoistoka, a potom iz pravca severozapada. Najhladniji mesec u godini je januar sa prosečnom temperaturom od 1,4 °C, a najtopliji jul sa 23,0 °C (RHMZS, 2021a).

Geografska širina, kao pokazatelj ukupne energije koja sa Sunca stiže do posmatrane lokacije, jedan je od najznačajnijih faktora koji utiču na klimu. Energija sa Sunca zagreva površinu Zemlje, a atmosfera se zagreva od količine toplote koju prima od tla. Proces koji se odvijaju u atmosferi zavise od temperaturskog gradijenta, te su tako klima, kao i njene promene, pod dominantnim uticajem temperature vazduha. Karakteristike komponenti klimatskog sistema – atmosfere, hidrosfere, kriosfere, zemljinog tla i biosfere – takođe bitno utiču na klimu. Proces koji se u njima odvijaju, kao i međusobne interakcije između komponentata, kontinualno se menjaju, te se stoga i klima stalno menja.

Neki od faktora koji doprinose promeni klime su posledice prirodnih događaja na koje čovek nema uticaj. Na primer, erupcije vulkana ili udari meteora u prošlosti doprineli su klimatskim promenama tako što su brzo i drastično promenili uslove na Zemlji. Promene na Suncu i promene u Zemljinoj orbiti takođe dovode do promene klime. Međutim, posmatrano u kraćem vremenskom periodu, tokom prošlog veka došlo je do ubrzane promene klime. Obimna i detaljna naučna istraživanja pokazala su da je za to glavni uzrok ljudska aktivnost kojom je oslobođena velika količina gasova staklene bašte (CO₂, CH₄ i N₂O) u atmosferu (IPCC, 2014). Povećana koncentracija ovih gasova dovodi do efekta staklene bašte, čime se narušava energetska ravnoteža: deo energije koju bi Zemlja trebalo da emituje u svemir, zadržava se u atmosferi što dovodi do globalnog zagrevanja (Saklani i Khurana, 2019).

Istraživanja pokazuju da je od preindustrijskog perioda do perioda 2007–2016. godine prosečna temperatura na globalnom nivou porasla za (0,87–0,92) °C, dok je na nivou Evrope porasla za 1,6 °C. Procenjuje se da će na globalnom nivou temperatura u periodu 2046–2065. godine biti viša za (1,4–1,8) °C u odnosu na period 1986–2005. godine, dok će 2081–2100. godine biti viša za (2,0–4,4) °C od temperature tokom 1986–2005. godine. Srbija beleži porast temperature koji se posebno intenzivirao osamdesetih godina prošlog veka. Povećanje temperature u kombinaciji sa periodima suše i ekstremnim padavinama za posledicu ima češće i intenzivnije toplotne talase, poplave, šumske požare, poremećaj u proizvodnji hrane i opšteg zdravlja. Predviđa se da će globalno zagrevanje u Srbiji do 2100. godine, dovesti do povećanja prosečne temperature od 2,5 °C do 5 °C, koje će u centralnim i južnim delovima biti izraženije (Vukovic i sar., 2018).

Posledice globalnog zagrevanja su vidljive – dolazi do topljenja lednika, podizanja nivoa mora i promene rasprostranjenosti biljnog i životinjskog sveta. Istraživanja u Evropi i Severnoj Americi otkrila su promene u fenološkim događajima. Primećeno je da se izleganje ptica, dolazak ptica selica, pojava leptira, mrest vodozemaca i cvetanje biljaka javljaju ranije. Neki podaci ukazuju na kasniji početak jesenjih fenoloških događaja (Walther i sar., 2002).

Promena temperature i vlažnosti vazduha dovodi do promene geografske rasprostranjenosti vrsta. Svaka promena temperature od 1 °C, pomera ekološku zonu za približno 160 km. Stoga, ako se tokom sledećeg veka temperatura poveća za 4 °C, moguće je da će vrste na severnoj hemisferi morati da se pomere severno za približno 500 km (ili u predele koji se nalaze na 500 m većoj nadmorskoj visini), u potrazi za pogodnim klimatskim uslovima. Sposobnost vrste da odgovori na klimatske promene u velikoj meri zavisi od njihove sposobnosti da prate promenu klime kolonizacijom novih teritorija ili promenom sezone aktivnosti (Thuiller, 2007).

Poslednjih decenija *D. reticulatus* proširio je granice geografske rasprostranjenosti, a kao jedan od uzroka navode se klimatske promene, sa dominantnom ulogom promene temperature (Estrada-Peña i sar., 2012). Rasprostranjenost *D. reticulatus* bila je relativno nepromenljiva sve do 1980-tih. Međutim, od 1990-tih, *D. reticulatus* se pojavljuje u oblastima u kojima ranije nije zabeleženo njegovo prisustvo. U tom periodu pronađen je na novim lokacijama u Poljskoj (Karbowski, 2014), a novija istraživanja pokazuju nastavak širenja duž rečnih tokova (Mierzejewska i sar., 2016). Na teritoriji Nemačke 2003. godine zabeleženo je 26 novih lokacija pojave *D. reticulatus* na kojima ga nije bilo 1976. godine. U drugom istraživanju zabeleženo je još 12 takvih lokacija (Dautel i sar., 2006). U Slovačkoj je pomerio granice rasprostranjenosti 200 km severno (Bullová i sar., 2009), a u Češkoj se proširenje rasprostranjenosti beleži duž rečnih slivova (Široký i sar., 2011). Pedesetih godina u Mađarskoj pronađen je na samo dve lokacije, dok se danas pronalazi širom cele zemlje (Karbowski, 2014).

3. CILJEVI I ZADACI

Babezioza pasa na području grada Beograda prisutna je tokom cele godine, ali ne postoje jasno definisani podaci o njenoj učestalosti u pojedinim sezonama. Zbog toga je prvi cilj ove doktorske disertacije da utvrdi broj slučajeva babezioze pasa sa kliničkom slikom akutnog oboljenja u različitim sezonama tokom godine, kao i da ispita povezanost učestalosti pojave babezioze i meteoroloških parametara.

Takođe, aktivnost krpelja koji prenose *Babesia* spp. razlikuje se između sezona. Osim toga, zabeleženo je da se težina inflamatornog odgovora razlikuje između pojedinih pasa (Matijatko i sar., 2009). Stoga je drugi cilj ove doktorske disertacije da kod pasa obolelih od akutne babezioze izazvane infekcijom *B. canis*, ispita težinu odgovora akutne faze pasa na osnovu koncentracije APP i reaktanata akutne faze tokom različitih sezona, kao i da pokaže da li su promene hematoloških i biohemijskih parametara koje se javljaju povezane sa intenzitetom inflamacije.

Da bi se ostvario prvi cilj, prikupljene su informacije o broju slučajeva babezioze kod pasa i postavljeni su sledeći zadaci:

1. Formiranje jedinstvene baze dijagnostikovanih slučajeva akutne babezioze pasa tokom četiri godine (2013–2016) u dve veterinarske ustanove na teritoriji Beograda.
2. Prikupljanje meteoroloških parametara u Beogradu za period 2012–2016. godine.
3. Statistička obrada podataka.

Da bi se ostvario drugi cilj, prilikom pregleda pasa kod kojih se sumnja na akutnu infekciju protozom *B. canis*, postavljeni su sledeći zadaci:

1. Registrovanje kliničkih znakova bolesti kod pasa kod kojih se sumnja da imaju akutnu babeziozu.
2. Pregled krvnih razmaza svetlosnom mikroskopijom i evidentiranje prisustva velikih babezija.
3. Registrovanje rezultata rutinskih hematoloških i biohemijskih analiza.
4. Korišćenje viška pune krvi za molekularnu detekciju vrste babezije koja se sprovodi u komercijalnoj laboratoriji.
5. Upotreba viška seruma za određivanje proteina akutne faze, proteinskih frakcija elektroforezom na agaroznom gelu i ispitivanje prisustva IgG antitela protiv *B. canis* u serumu ispitivanih pasa uz pomoć komercijalnih seroloških testova.
6. Statistička obrada podataka.

4. MATERIJAL I METODE

Ispitivanje je rađeno na teritoriji Beograda (44°49' N; 20°28' E), glavnog i najvećeg grada Republike Srbije. Sa populacijom od oko 1,7 miliona, u njemu živi približno četvrtina stanovništva Republike Srbije (RZS, 2021). Prosečna nadmorska visina Beograda je 116 m; nalazi se jednim delom u Panonskoj niziji, drugim na Balkanskom poluostrvu. Kroz Beograd protiču dve velike reke, Sava i Dunav. Na osnovu podataka Republičkog Hidrometeorološkog zavoda Srbije za period 1981–2010. godine, prosečna godišnja temperatura iznosi 12,5 °C. Najhladniji mesec je januar sa prosečnom temperaturom od 1,4 °C, a najtopliji jul sa prosečnom temperaturom od 23 °C. Prosečna godišnja relativna vlažnost vazduha iznosi 68 %, prosečne godišnje padavine 690,9 mm (RHMZS, 2021a). Godišnji prosek je 58 mraznih dana, 39 sa snežnim pokrivačem i 36 tropskih dana.

4.1. Psi

4.1.1. Evidencija o dijagnostikovanoj babeziozi

Podaci o dijagnostikovanim kliničkim slučajevima babezioze pasa prikupljeni su za period od četiri godine, od 1.1.2013. do 31.12.2016. Prikupljanje je obavljeno uvidom u evidencione kartone dve veterinarske ustanove: Veterinarska stanica Petrovac, koja se nalazi u urbanom gradskom naselju Borča, opština Palilula, grad Beograd, i Klinika za male životinje pri Katedri za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, opština Savski venac, Beograd. Podaci su inicijalno zabeleženi kao broj dijagnostikovanih slučajeva na dnevnom nivou, a u kasnijoj analizi grupisani su na nedeljni nivo.

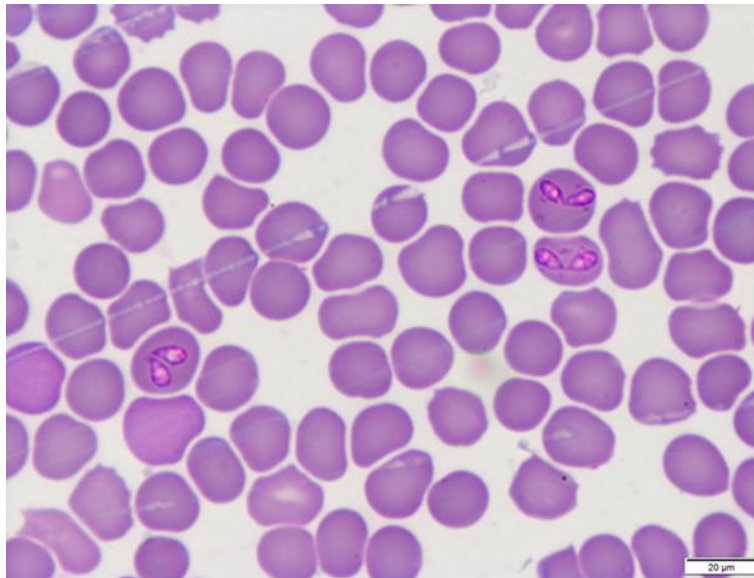
4.1.2. Uzorci krvi pasa uključenih u laboratorijsko ispitivanje

U istraživanje su uključeni podaci vezani za 66 pasa obolelih od babezioze u periodu od oktobra 2017. do maja 2019. godine (zbog malog broja slučajeva napravljen je prekid u periodu jun–septembar), odnosno višak krvi preostao posle dijagnostike. Svi psi su bili pacijenti Veterinarske stanice Petrovac u Beogradu.

Na osnovu sezona određenih u prethodnom poglavlju, rezultati ispitivanja pune krvi i seruma pasa prirodno inficiranih *B. canis* od jeseni 2017. do proleća 2019. godine, podeljeni su u tri grupe, koje su međusobno poređene.

Kriterijumi za postavljanje dijagnoze bili su sledeći: 1) akutna pojava kliničkih znakova karakterističnih za babeziozu (blede ili ikterične sluznice, povišena temperatura, letargija, anoreksija tokom 24–48 h); 2) prisustvo razvojnih oblika velikih babezija u eritrocitima na krvnom razmazu obojenom Romanowsky tehnikom (BioDiff, BioGnost, Zagreb, Hrvatska) (Slika 1); 3) hematološke promene karakteristične za pse obolele od babezioze (trombocitopenija, leukopenija i/ili anemija); i 4) pozitivan odgovor na tretman imidokarb-dipropionatom (6,6 mg/kg telesne mase). U istraživanje nisu uključeni psi kod kojih je dijagnostikovano ili je postojala sumnja na postojanje pridruženog oboljenja (neoplazija,

alergija ili endokrinopatija), kao ni oni sa pozitivnim Knott testom ili vidljivim ozledama. Vlasnici svih pasa uključenih u ovo istraživanje dali su pisanu saglasnost da se rezultati ispitivanja krvi i seruma mogu koristiti za naučno istraživanje. Etička komisija Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu odobrila je ovo istraživanje, a dozvola za ogled (broj 323-07-03455) dobijena je od Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije.



Slika 1: Prisustvo velikih babezija u eritrocitima pasa na krvnom razmazu obojenom Romanowsky tehnikom (imerzioni objektiv, uveličanje 100 ×).

Uzorkovanje krvi: Od pasa kod kojih je postavljena sumnja na babeziozu, uzeta je krv radi dalje analize i postavljanje dijagnoze. Krv je dobijena aseptičnom punkcijom *Vena cephalica* i prikupljena je u dve vakuum epruvete (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA), jednu sa etilendiamintetrasirćetnom kiselinom (EDTA) kao antikoagulansom i jednu bez aditiva. Za pravljenje krvnog razmaza i hematološke analize krv je prikupljena u epruvetu sa EDTA. Višak krvi iz epruvete sa EDTA iskorišćen je da se metodama molekularne dijagnostike potvrdi identitet uočene intraeritocitne protozoe *B. canis*. Plazma koja je dobijena centrifugovanjem krvi sa EDTA poslužila je za određivanje koncentracije fibrinogena. Sve analize osim molekularne dijagnostike, urađene su u roku od dva sata po uzimanju krvi. Puna krv za molekularnu dijagnostiku zaleđena je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i transportovana u komercijalnu veterinarsku laboratoriju (IDEXX Laboratories, Inc.). Za rutinske biohemijske analize krv je prikupljena u epruvetu bez aditiva, ostavljena je na sobnoj temperaturi da koaguliše tokom 30 minuta, a zatim centrifugovana 15 minuta na $1500\text{ }g$ da bi se izdvojio serum. Po završenim biohemijskim analizama višak seruma zaleđen je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kako bi poslužio za dodatna ispitivanja. U nekim slučajevima, krvi i seruma nije bilo dovoljno da se sprovedu sve analize, pa je u predstavljanju rezultata, na svakom grafikonu, slovom „n“ označen broj analiziranih uzoraka.

Formiranje grupa za ispitivanje: Prvi kriterijum za formiranje grupa je zasnovan na delu/periodu godine kada je klinička babezioza dijagnostikovana. S obzirom na to da učestalost slučajeva babezioze pasa fluktuirala tokom godine (Janjić i sar., 2019), formirane su tri sezone: januar–februar (Jan–Feb), februar–maj (Feb–Maj) i oktobar–decembar (Okt–Dec). Osam pasa je dijagnostikovano u sezoni Jan–Feb, 45 tokom Feb–Maj sezone i 13 u Okt–Dec sezoni.

Drugi kriterijum je bilo prisustvo SIRS-a, koje je potvrđeno ukoliko su bila ispunjena najmanje dva od sledećih kriterijuma: 1) telesna temperatura iznad 39,2 °C ili ispod 37,2 °C; 2) tahikardija (više od 140 otkucaja srca u minutu); 3) tahipneja (frekvencija veća od 40 u minutu); 4) ukupan broj leukocita veći od $19,5 \cdot 10^9/L$ ili manji od $5 \cdot 10^9/L$ ili procenat mladih neutrofila veći od 5 (DeClue, 2017). Za 54 psa (29 mužjaka i 25 ženki, 41 rasnih i 13 mešanaca, starosti 2 do 132 meseca) bilo je dovoljno podataka za potvrđivanje ili isključivanje SIRS-a, pa je grupu sa SIRS-om činilo 32 psa, dok je u grupi bez SIRS-a bilo 22 psa.

Treći kriterijum za grupisanje je bilo prisustvo IgG antitela protiv *B. canis*. Psi sa prisustvom IgG antitela protiv *B. canis* činili su grupu seroreaktivnih pasa, dok su psi bez prisustva antitela protiv *B. canis* činili grupu seronegativnih. Testirano je 48 pasa.

Izvršena su još dva grupisanja, na osnovu pola (36 mužjaka i 28 ženki, za dva psa nije zabeležen pol) i rase (48 rasnih i 18 mešanaca).

4.2. Meteorološki podaci

Meteorološki parametri za Beograd prikupljeni su za period 2012–2016. godine. Vrednosti srednje dnevne temperature, relativne vlažnosti vazduha, atmosferskog pritiska, količine padavina i oblačnosti preuzete su od Republičkog Hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZS, 2021b). Iz prikupljenih dnevnih vrednosti izračunate su srednje nedeljne vrednosti svih navedenih meteoroloških parametara koje su potom korelirane sa nedeljnim brojem slučajeva babezioze.

4.3. Hematološke analize

Hematološke analize su urađene na automatskom hematološkom analizatoru Abacus Junior Vet (Diatron, Beč, Austrija). Dobijene su vrednosti o broju leukocita, eritrocita i trombocita, vrednosti hematokrita, koncentracije hemoglobina, prosečne zapremine eritrocita i prosečne koncentracije hemoglobina po litri eritrocita. Leukocitarna formula je određivana pregledom krvnog razmaza obojenog Romanovski tipom bojenja. U ukupnom broju od 100 leukocita, određena je procentualna zastupljenost neutrofilnih granulocita, mladih neutrofilnih granulocita, monocita, limfocita i eozinofilnih granulocita. Referentni intervali hematoloških parametara su preuzeti od kliničke laboratorije Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Psi su smatrani anemičnim ako je hematokrit bio manji od 37 % (Quigley i sar., 2001). Takođe, analizom krvnog razmaza obojenog Romanovski tipom bojenja određena je i parazitemija, kao procenat eritrocita zaraženih babezijama zabeležen pregledom 2000 eritrocita (Beletić i sar., 2021).

4.4. Biohemijske analize

Biohemijske analize su urađene na biohemijskom analizatoru Technicon RA-XT (Bayer, Dublin, Irska). Analizirano je 17 parametara: ukupni proteini, albumin, kreatinin, urea, neorganski fosfat, glukoza, holesterol, trigliceridi, ukupni bilirubin, gvožđe, alanin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, gama-glutamil transferaza, alkalna fosfataza, α -amilaza, lipaza i kreatinin kinaza. Koncentracija globulina je izračunata kao razlika koncentracije ukupnih proteina i albumina. Referentni intervali su preuzeti od kliničke laboratorije Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

4.5. Elektroforeza proteina

Elektroforeza je rađena na 1 % agaroznom gelu, u SAS-MX horizontalnoj kadi za elektroforezu (Helena Laboratories, Beaumont, Texas) sa barbituratnim puferom (pH = 8,6), tokom 45 min na 80 V. Nakon toga gel je sušen 20 min na 60 °C, obojen sa 0,1 % Comassie brilliant blue bojom, i višak boje uklonjen vodenim rastvorom sa 10 % sirćetne kiseline i 30 % metanola. Skeniranje gelova rađeno je Epson V800 skenerom, a denzitometrijska analiza upotrebom TotalLab TL120 programa. Na ovaj način određena je koncentracija α , β i γ globulina.

4.6. Određivanje koncentracije proteina akutne faze i indeksa reaktanata akutne faze

4.6.1. Proteini akutne faze

Koncentracija Serum amiloida A određena je komercijalnim ELISA testom (Tridelta Development Ltd). Test je rađen prema uputstvu proizvođača. Absorbanca uzoraka u mikrotitracionoj ploči očitana je na ELISA čitaču (Elx800, Biotek) na 450 nm.

Koncentracija ceruloplazmina određena je spektrofotometrijski na aparatu Cecil-e 2021 2000 series (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija). Metoda se zasniva na merenju oksidativne aktivnosti ceruloplazmina upotrebom p-fenilendiamina kao supstrata (Cerón i Martínez-Subiela, 2004).

Aktivnost paraoksonaze 1 određena je spektrofotometrijski na Cecil ce 2021 2000 series (Cecil Instrumentation Services Limited, Velika Britanija). Metodu su opisali Dantoine i sar. (1998) i zasniva se na upotrebi 4-nitrofenil acetata kao supstrata za hidrolizu.

Koncentracija fibrinogena određivana je metodom zagrevanja uz precipitaciju. Dve mikrohematokritske cevčice ispunjene su sveže uzetom krvi sa EDTA antikoagulansom nakon čega su centrifugovane. Jedna je prelomljena neposredno iznad granice eritrocita i plazme, plazma je istisnuta na prizmu refraktometra i pročitana je vrednost koncentracije plazma proteina (P1). Druga cevčica je inkubirana tokom 3 minuta na 56 °C u vodenom kupatilu. U ovom procesu fibrinogen se precipitovao u vidu belog prstena iznad sloja eritrocita. Nakon inkubacije cevčica je ponovo centrifugovana, pa je prelomljena neposredno iznad granice plazme i fibrinogena. Plazma je istisnuta na prizmu refraktometra i ponovo je izmerena

koncentracija proteina (P2). Koncentracija fibrinogena izračunata je oduzimanjem P2 od P1 (Schalm, 1980).

4.6.2. Indeksi reaktanata akutne faze

Indeksi reaktanata akutne faze (IRAF) izračunati su prema preporuci Gruys i sar. (2006):

$$\text{IRAF} = \frac{(\text{brz pozitivni RAF}) \cdot (\text{spor pozitivni RAF})}{(\text{brz negativni RAF}) \cdot (\text{spor negativni RAF})}$$

gde je RAF reaktant akutne faze.

U cilju izračinavanja IRAF svi pozitivni i negativni APP kao i gvožđe, svrstani su reaktante akutne faze (RAF). Izračunata su dva IRAF, koristeći SAA i CER kao brz odnosno spor pozitivni reaktant akutne faze (Gabay i Kushner, 1999; Cray i sar., 2009), gvožđe kao brz negativni reaktant akutne faze (Spottiswoode i sar., 2014) i albumin i PON1 kao spori negativni reaktanti akutne faze (Gabay i Kushner, 1999; Tvarijonaviciute i sar., 2012).

4.7. Serološke analize

Serumi pasa ispitani su na prisustvo IgG antitela protiv *B. canis*. Testiranje je rađeno komercijalnim MegaFLUO® BABESIA canis (MEGACOR Diagnostik GmbH, Hörbranz, Austrija) testom, prema uputstvu proizvođača. Test se zasniva na principu „sendvič“ ELISA-e.

4.8. Molekularna dijagnostika

U cilju određivanja vrste i kvantifikacije uzročnika babezioze, primenjena je tehnika *real-time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Kao „target“ izabran je hsp70 gen *B. canis*. Ovo ispitivanje urađeno je u komercijalnoj veterinarskoj referentnoj laboratoriji - IDEXX Reference Lab, West Sacramento, California, USA. Količina *B. canis* u perifernoj krvi je obrnuto proporcionalna „crossing point value“ dobijenoj u RT-PCR analizi.

4.9. Statistička analiza

Povezanost meteoroloških parametara i broja dijagnostikovanih slučajeva ispitana je preko Spirmanovog koeficijenta korelacije. U ovu analizu uvedeno je vremensko kašnjenje dato kao broj nedelja, čime se korelacioni parovi pomeraju. Kada je vremensko kašnjenje jednako nuli, korelacijski parovi se sastoje od vrednosti zabeleženih u istoj nedelji. Kada je vremensko kašnjenje jedna nedelja, broj zabeleženih slučajeva korelira sa meteorološkim parametrima zabeleženim nedelju dana ranije, itd. Vremensko kašnjenje je u opsegu od nula do 52 nedelje, odnosno pokriva period od godinu dana.

Postojanje razlike u vrednostima laboratorijskih rezultata između pasa obolelih od babezioze u tri različite sezone ispitana je Kruskal-Wallis testom, uz *post-hoc* analizu po Conover-u. Mann-Whitney U test je korišćen za ispitivanje statističke značajnosti pomenutih razlika između pasa sa i bez SIRS-a, pasa seronegativnih i seroreaktivnih prema *B. canis*, mužjaka i ženki odnosno rasnih pasa i mešanaca. Razlika u distribuciji kategoričkih varijabli ispitana je hi-kvadrat testom, a povezanost starosti pasa sa promenama pojedinih parametara ispitana je

Spirmanovom korelacionom analizom. Univarijantna i multivarijantna logistička regresija korišćena je za identifikovanje parametara koji su nezavisno povezani sa određenom grupom pasa. Za statističke analize korišćenjen je softver MedCalc® verzija 16.2.1.

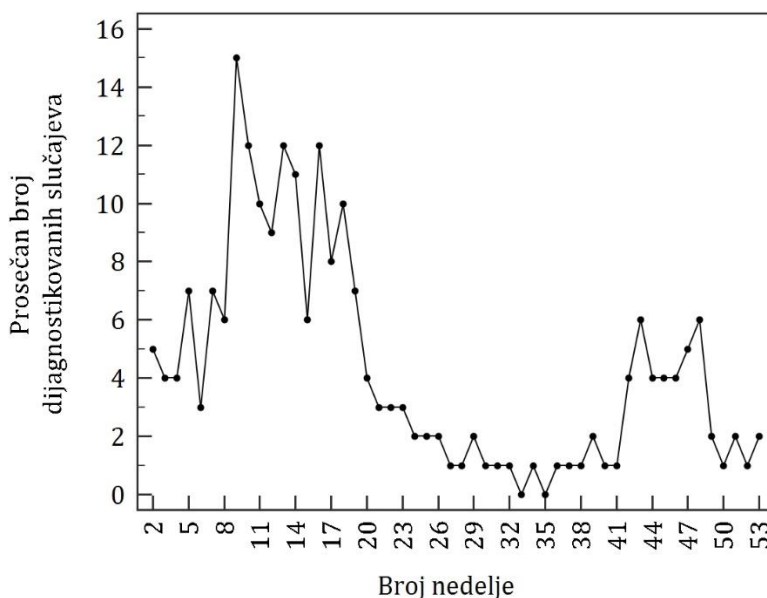
5. REZULTATI

Rezultati prvog dela studije, u kome je ispitivana povezanost pojave oboljenja i meteoroloških parametara, dobijeni su retrospektivnom analizom 872 slučaja babezioze pasa, registrovanih u periodu 2013–2016. godine. U drugi deo studije uključeno je 66 pasa obolelih tokom 2017–2019. godine. Krv ovih pasa korišćena je za laboratorijske analize.

5.1. Veza pojave akutne babezioze pasa sa meteorološkim parametrima

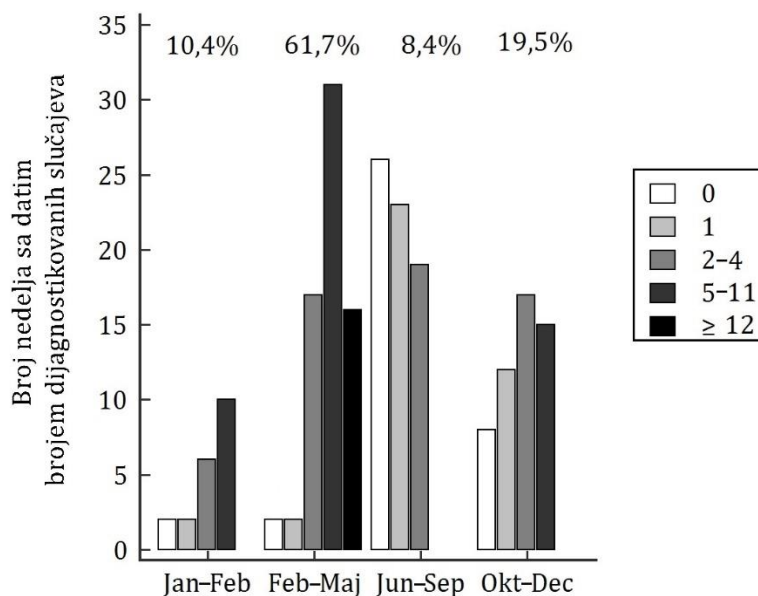
5.1.1. Sezonalnost pojave babezioze pasa

Tokom četiri godine (2013–2016) u dve veterinarske ustanove na teritoriji Beograda zabeležena su 872 slučaja babezioze pasa. Na grafikonu 1 je za svaku nedelju tokom godine dat prosečan četvorogodišnji (2013–2016) broj slučajeva. Na grafikonu 1 vide se dva godišnja maksimuma, od kojih je zimsko-prolećni (između 1. i 18. nedelje) izraženiji od jesenjeg (između 41. i 47. nedelje). Između njih su dva perioda sa manjim broja slučajeva, jedan dugi tokom letnje sezone i jedan kratki krajem jeseni.



Grafikon 1. Prosečan broj dijagnostikovanih slučajeva nedeljno, tokom 2013–2016. godine.

U toku navedene četiri godine, bilo je 38 nedelja bez zabeleženih slučajeva babezioze, 39 nedelja sa jednim slučajem, 59 nedelja sa dva do četiri slučaja, 56 nedelja sa pet do 11 slučajeva i 16 nedelja sa 12 do 28 slučajeva. Na osnovu nedeljnog broja slučajeva, godina je podeljena na četiri sezone: Jan–Feb, Feb–Maj, Jun–Sep i Okt–Dec (Grafikon 2).



Grafikon 2. Broj nedelja sa određenim brojem dijagnostikovanih slučajeva raspoređen po sezonama. Brojevi u gornjem delu grafikona predstavljaju procenat ukupnog broja slučajeva u pojedinim sezonama. Legenda sa desne strane: Boja stubića odgovara broju slučajeva u jednoj nedelji.

Od sredine februara do kraja maja (godišnji period od 17 nedelja), zabeleženo je 61,7 % (538/872) slučajeva i to je period u kome se nalazi svih 16 nedelja sa 12 i više slučajeva. Ovaj deo godine označen je kao sezona Feb–Maj ili produženi prolećni period. Od početka juna do kraja septembra nije bilo nedelja u kojima je zabeleženo više od četiri slučaja. Taj godišnji period od 17 nedelja nazvan je sezona Jun–Sep, tokom koje je zabeleženo 8,4 % (73/872) slučajeva. Od početka oktobra do kraja decembra učestale su nedelje sa 2–4 i 5–11 slučajeva. Tada je dijagnostikovano 19,5 % (170/872) slučajeva; sezona je nazvana Okt–Dec i obuhvata 13 nedelja. Jan–Feb sezona koja obuhvata pet nedelja sa 10,4 % (91/872) dijagnostikovanih slučajeva (Grafikon 2), odvojena je od decembra u kome je zabeležen jedan od dva minimuma učestalosti pojave oboljenja, dok je od druge polovine februara odvojena zbog pojave nedeljnog broja slučajeva od 12 i više, na osnovu kojih je formirana sezona Feb–Maj.

5.1.2. Kratkoročna veza pojave babezioze i meteoroloških parametara

Prosečni period inkubacije posle uboda krpelja i infekcije *Babesia* spp. je dve nedelje. Na aktivnost krpelja utiču vremenski uslovi pa je s obzirom na to, ispitana povezanost meteoroloških parametara i broja slučajeva babezioze pasa sa vremenskim kašnjenjem od dve nedelje (drugim rečima, broj slučajeva babezioze pasa je koreliran sa meteorološkim parametrima zabeleženim dve nedelje ranije). Od meteoroloških parametara su uzeti u obzir: temperatura (TG), relativna vlažnost vazduha (HU), atmosferski pritisak (PP), oblačnost (CC) i količina padavina (RR). Dobijeni rezultati su razvrstani na osnovu sezona i broja slučajeva babezioze tokom svake nedelje (Tabela 1), što omogućava ispitivanje povezanosti promene meteoroloških parametara i promene broja dijagnostikovanih slučajeva.

Iz tabele 1 vidi se da u sezoni Feb–Maj, kada ima najviše dijagnostikovanih slučajeva, pojava babezioze (prelazak sa 0 na 1 slučaj nedeljno) odgovara povećanju temperature sa 9,2 °C na

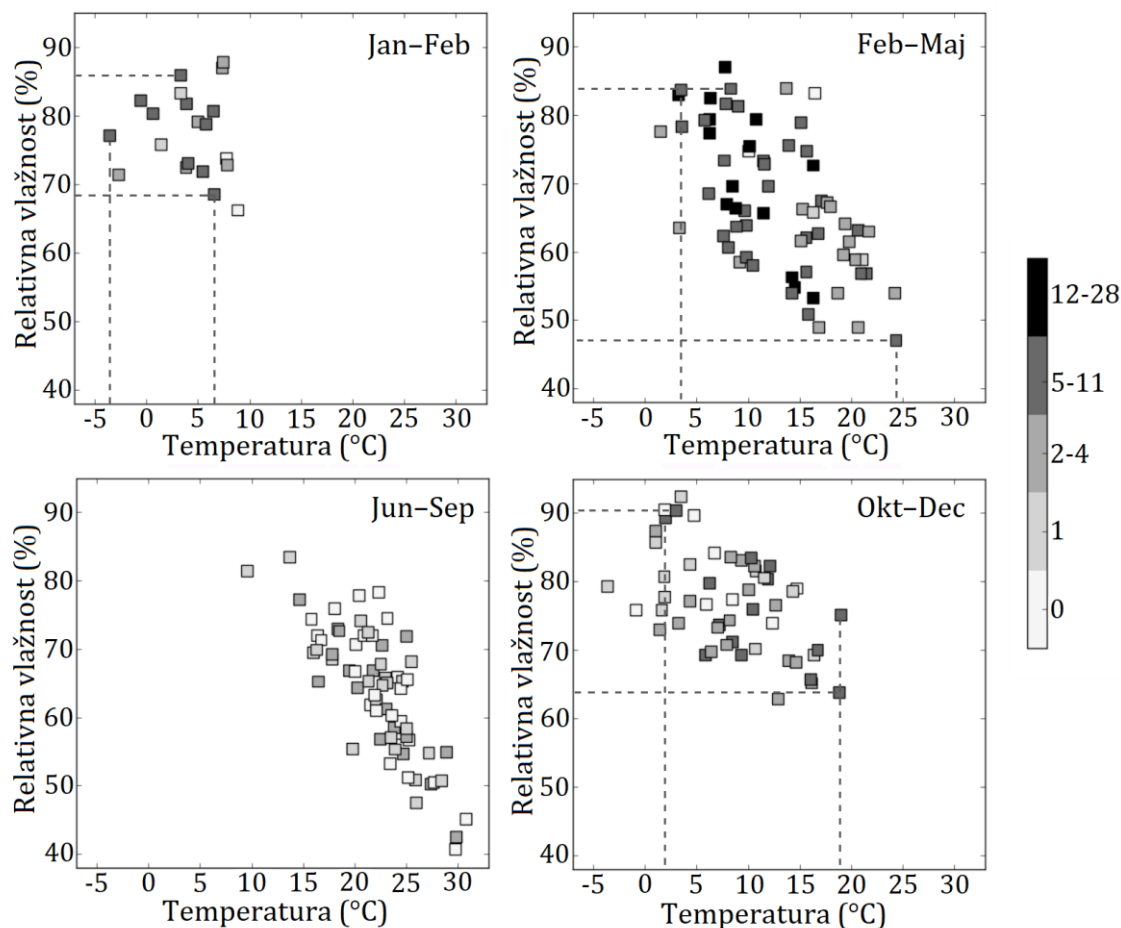
16,2 °C. Međutim, dalji porast broja slučajeva babezioze u ovom periodu praćen je padom temperature, tako da je u nedeljama sa 12 i više slučajeva prosečna nedeljna temperatura bila 9,2 °C. Ni ostali meteorološki parametri u ovoj sezoni nisu pokazali pravilnost promena koje bi pratile promenu broja slučajeva babezioze. Sa druge strane, tokom sezone Jun–Sep, kada se babezioza samo sporadično dijagnostikuje, porast broja slučajeva prate pad temperature, povećanje relativne vlažnosti i pad atmosferskog pritiska (Tabela 1).

Tabela 1. Vrednosti meteoroloških parametara zabeležene dve nedelje pre dijagnostikovanja babezioze. Podaci su podeljeni u grupe na osnovu sezona i broja slučajeva nedeljno. Skraćenice: TG – srednja nedeljna temperatura; HU – srednja nedeljna vlažnost vazduha; CC – srednja nedeljna oblačnost; RR – srednja nedeljna količina padavina; PP – srednji nedeljni vazdušni pritisak.

Broj dijagnostikovanih slučajeva nedeljno	Sezona	Broj nedelja	TG (°C)	HU (%)	PP (mbar)	RR (mm)	CC (okta)
0	Jan–Feb	2	-2,3	78	1016,3	0,9	4,7
	Feb–Maj	2	9,2	72	1003,4	2,2	5,8
	Jun–Sep	26	23,6	62	1005,4	3,0	3,4
	Okt–Dec	8	7,0	77	1015,6	1,0	4,7
1	Jan–Feb	2	6,4	75	1000,0	1,5	5,5
	Feb–Maj	2	16,2	67	1005,0	6,8	4,2
	Jun–Sep	23	22,9	62	1004,0	1,7	3,2
	Okt–Dec	12	8,6	80	1007,7	2,6	5,2
2–4	Jan–Feb	6	1,7	79	1008,3	1,6	5,2
	Feb–Maj	17	14,1	68	1000,0	3,9	4,8
	Jun–Sep	19	21,3	64	999,3	2,3	3,6
	Okt–Dec	17	9,5	77	1010,1	1,7	4,4
5–11	Jan–Feb	10	6,4	77	1002,7	1,2	4,9
	Feb–Maj	31	10,2	69	1000,6	2,4	5,0
	Okt–Dec	15	13,6	74	1005,0	1,4	3,7
12–28	Feb–Maj	16	9,2	67	1008,8	0,8	4,3

Kako se temperatura i relativna vlažnost smatraju glavnim faktorima koji utiču na aktivnost krpelja, ispitana je zavisnost pojave oboljenja od kombinacije ova dva faktora (Grafikon 3). Tokom sezona Feb–Maj i Okt–Dec, dva perioda sa najvećim brojem zabeleženih slučajeva, opseg temperatura i relativne vlažnosti vazduha je sličan, ali sa nešto nižim temperaturama i većom relativnom vlažnošću vazduha u Okt–Dec nego u Feb–Maj. U nedeljama sa najvećim brojem slučajeva (12–28), temperatura se kretala u opsegu (3–16) °C, a relativna vlažnost vazduha (53–87) % (Grafikon 3). Tokom ovog perioda prosečna temperatura bila je 9,2 °C, relativna vlažnost vazduha 67 % sa prosečnim padavinama od 0,8 mm (Tabela 1).

U sezoni Jan–Feb 5–11 i jedan slučaj nedeljno beleženi su u nedeljama kojima odgovara ista prosečna temperatura (6,4 °C).

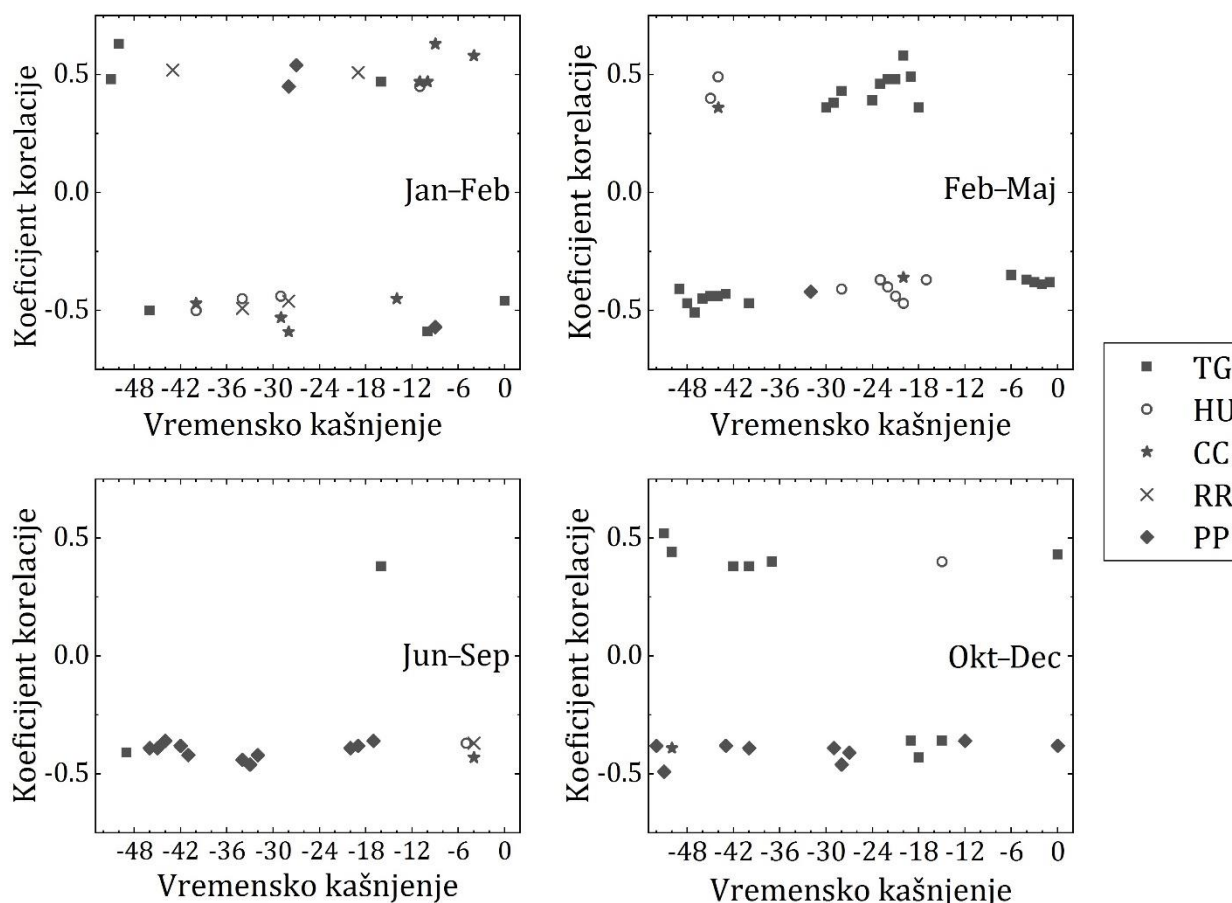


Grafikon 3. Broj dijagnostikovanih slučajeva u zavisnosti od temperature i relativne vlažnosti vazduha zabeleženih dve nedelje pre pojave kliničke babezioze. Svaka sezona je pokazana zasebnim grafikonom. Boja simbola predstavlja broj slučajeva nedeljno. Isprekidana linija predstavlja opseg „povoljnih“ temperatura i relativne vlažnosti vazduha u svakoj sezoni.

U sezoni Jun-Sep sa najmanje slučajeva, većina slučajeva je dijagnostikovana pri temperaturi od 15 °C do 25 °C i relativnoj vlažnosti vazduha od 55 % do 77 %. Međutim, zabeleženo je 0,7 % (6/872) slučajeva pri temperaturi iznad 26 °C i relativnom vlažnošću vazduha od 43 % do 55 % (Grafikon 3).

5.1.3. Dugoročna veza pojave babezioze i meteoroloških parametara

S obzirom na to da su krpelji vektori koji prenose protozoe roda *Babesia* spp., brojnost krpelja i njihova aktivnost jedan su od važnih faktora učestalosti nastanka oboljenja. Meteorološki uslovi imaju veliki uticaj na sve razvojne faze krpelja, tokom cele godine, pa je shodno tome, za svaku sezonu posebno, korelacionom analizom ispitana veza broja dijagnostikovanih slučajeva babezioze i meteoroloških parametara sa vremenskim kašnjenjem od 0 do 52 nedelje (godinu dana). Na ovaj način, „pogledom u prošlost“ ispitan je uticaj vremenskih uslova na populaciju krpelja, a posledično i na pojavu babezioze (Grafikon 4).



Grafikon 4. Spirmanov koeficijent korelacije broja dijagnostikovanih slučajeva nedeljno i meteoroloških parametara, sa vremenskim kašnjenjem prikazanim kao broj nedelja. Prikazane su samo one vrednosti gde je apsolutna vrednost koeficijenta korelacije veća od 0,35. Skraćenice: TG – srednja nedeljna temperatura; HU – srednja nedeljna vlažnost vazduha; CC – srednja nedeljna oblačnost; RR – srednja nedeljna količina padavina; PP – srednji nedeljni vazdušni pritisak.

Tokom sezone Jan–Feb bez vremenskog kašnjenja, povećanje broja slučajeva je u korelaciji sa smanjenjem temperature ($\rho_s = -0,46$). Za sezonu Jan–Feb je takođe pokazano da što je oblačnost veća u periodu od jednog do tri meseca pre pojave babezioze to je broj slučajeva bolesti veći (Grafikon 4).

Za sezonu Feb–Maj je pokazano da što je temperatura niža u periodu do četiri nedelje pre pojave oboljenja to je broj slučajeva babezioze viši (ρ_s od -0,35 do -0,39). Takođe je pokazano da što je temperatura viša, a vlažnost niža u periodu od četiri do osam meseci pre navedene sezone (što odgovara jesenjem i zimskom periodu) broj slučajeva babezioze je viši (temperatura $\rho_s = 0,36$ –0,58; relativna vlažnost ρ_s od -0,37 do -47). Na kraju, u istoj sezoni je broj slučajeva babezioze bio viši što su temperature bile niže u prethodnoj godini, a u periodu od 40. do 50. nedelje ranije (kasno proleće i rano leto), i što je relativna vlažnost bila viša u 44. i 45. nedelji (Grafikon 4).

Rezultati za sezonu Jun–Sep pokazuju da je vazdušni pritisak u negativnoj korelaciji sa brojem slučajeva 17 do 20 nedelja pre (ρ_s od -0,36 do -0,39), 32 do 34 nedelje pre (ρ_s od 0,42 do -0,46) i 41 do 46 nedelja pre (ρ_s od -0,36 do 0,42) nastanka oboljenja.

Za sezonu Okt–Dec pokazano je da je broj slučajeva babezioze u pozitivnoj korelaciji sa temperaturom u nedelji pojave oboljenja ($\rho_s = 0,43$) kao i u periodu tokom prethodne jeseni i zime, odnosno od 37. do 42. nedelje ranije ($\rho_s = 0,38 - 0,40$). Osim toga, broj slučajeva u toj sezoni je bio manji što je temperatura bila niža 14 do 19 nedelja ranije, što odgovara kraju letnjeg perioda (Grafikon 4).

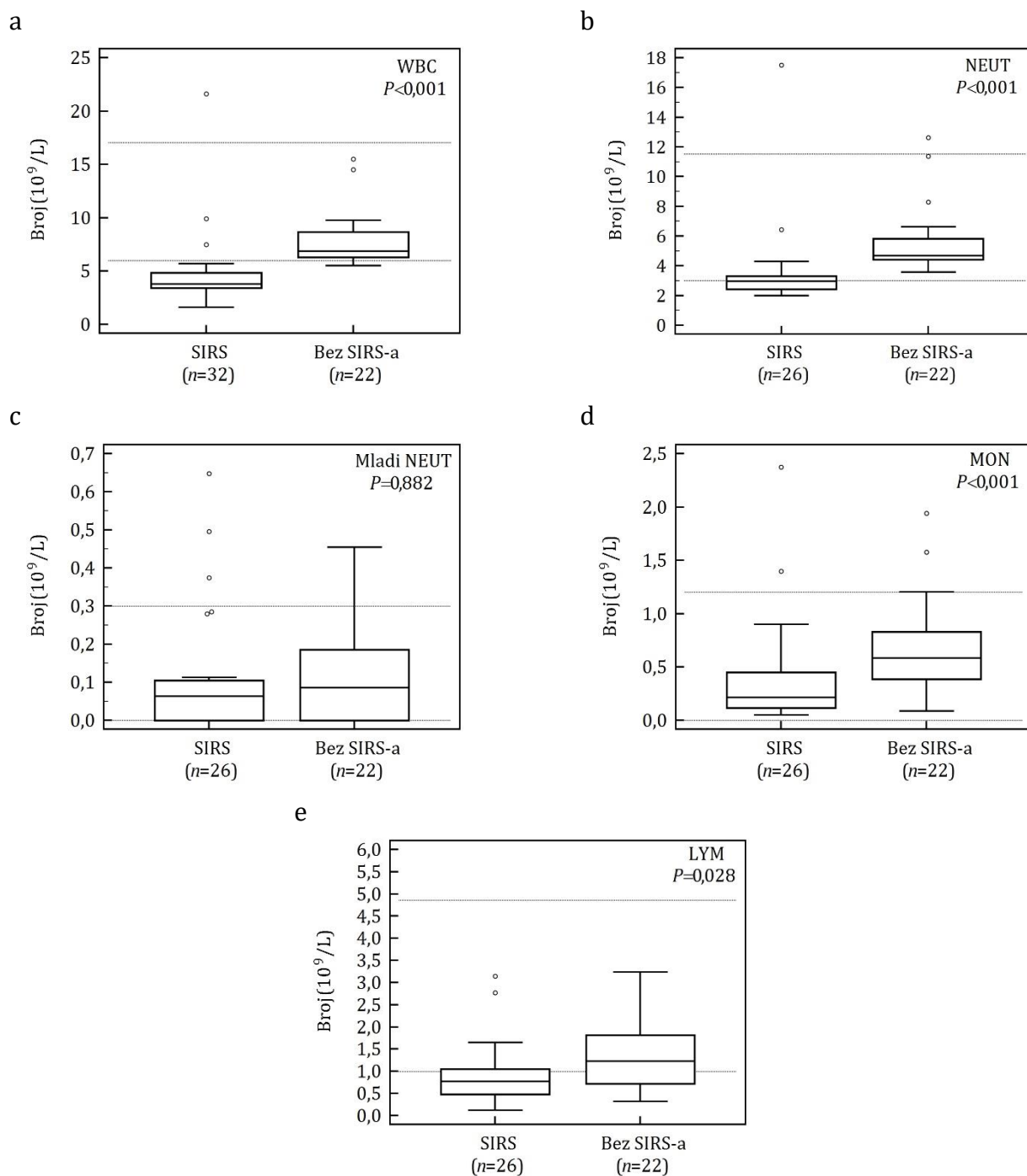
5.2. Laboratorijske analize

5.2.1. Hematološki i biohemijski parametri kod SIRS pozitivnih pasa i pasa bez SIRS-a

U našoj studiji su analizirane vrednosti kliničkih i laboratorijskih parametara 54 psa na osnovu kojih je potvrđen ili isključen SIRS. Međutim, nije bilo dovoljno krvi i seruma za sve testove. Iz tog razloga pojedini parametri su ispitivani na manjem broju pasa, što na grafikonima ukazuje broj „n“.

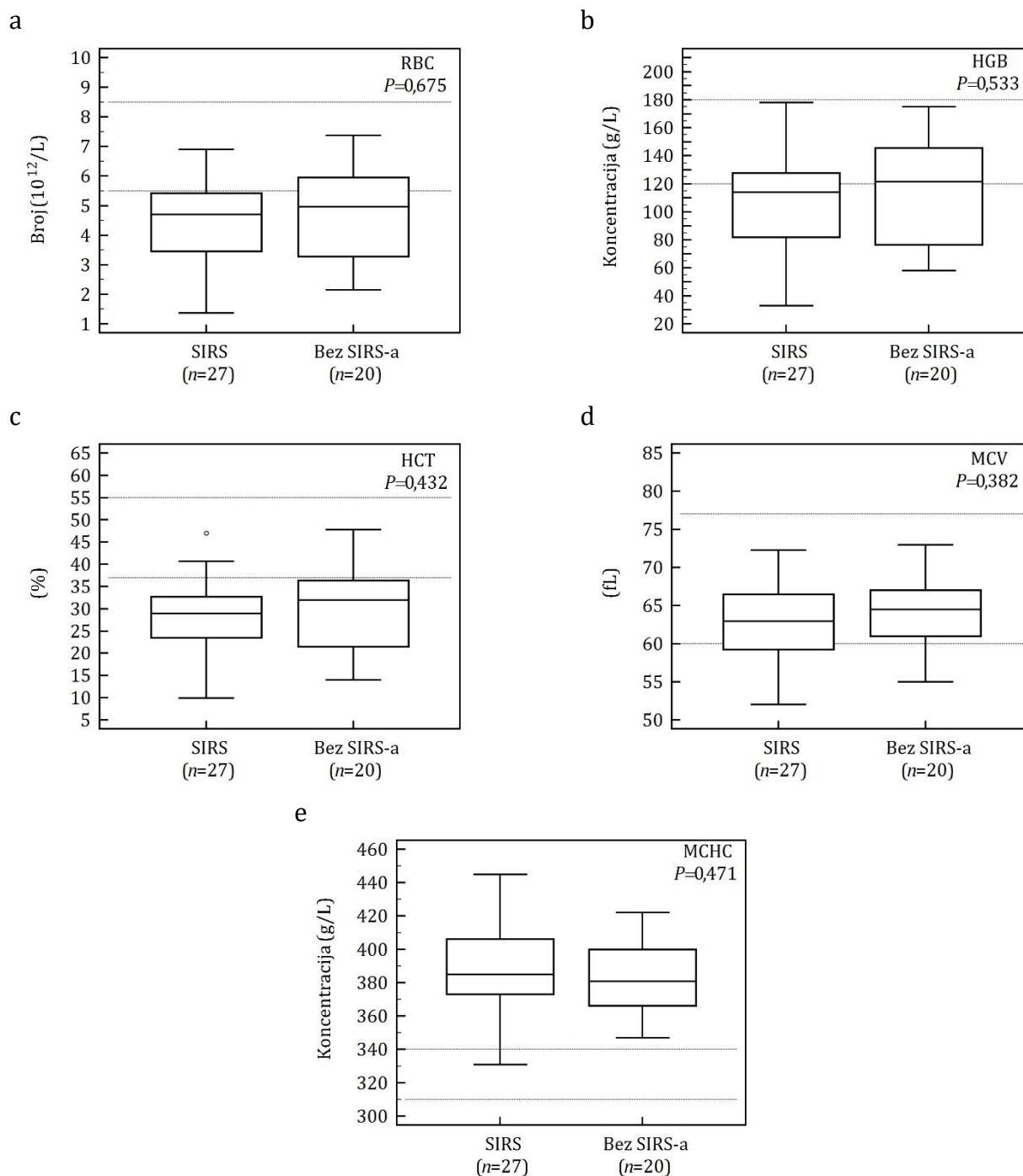
Među ispitivanim psima, njih 32 (59 %) je ispunjavalo kriterijume da budu svrstani u grupu nazvanu „SIRS“, dok 22 (41 %) nije ispunjavalo SIRS kriterijume i svrstani su u grupu nazvanu „bez SIRS-a“. U SIRS grupi, svi su imali povišenu temperaturu, leukopeniju njih 26 (81 %), povećanje broja mladih neutrofila njih 12 (38 %), a leukocitozu jedan pas (3 %). Mužjaka je bilo više ($P = 0,028$) u SIRS grupi (69 %) nego u grupi bez SIRS-a (31 %). Razlike u starosti pasa između SIRS grupe [12 (2–123) meseci] i grupe bez SIRS-a [15 (5–132) meseci] nije bilo ($P = 0,411$).

SIRS grupa imala je manje leukocita, neutrofila, monocita i limfocita (Grafikon 5). Postoji razlika i u pojavi leukopenije ($P < 0,001$) između SIRS grupe (kod kojih je učestalost leukopenije 91 %) i onih bez SIRS-a (14 %), neutropenije ($P < 0,001$) (SIRS psi 50 %, psi bez SIRS-a 0,04 %), monocitopenije $P < 0,001$ (SIRS psi 42 %, psi bez SIRS-a 4 %) i limfopenije $P = 0,028$ (SIRS psi 69 %, psi bez SIRS-a 36 %).



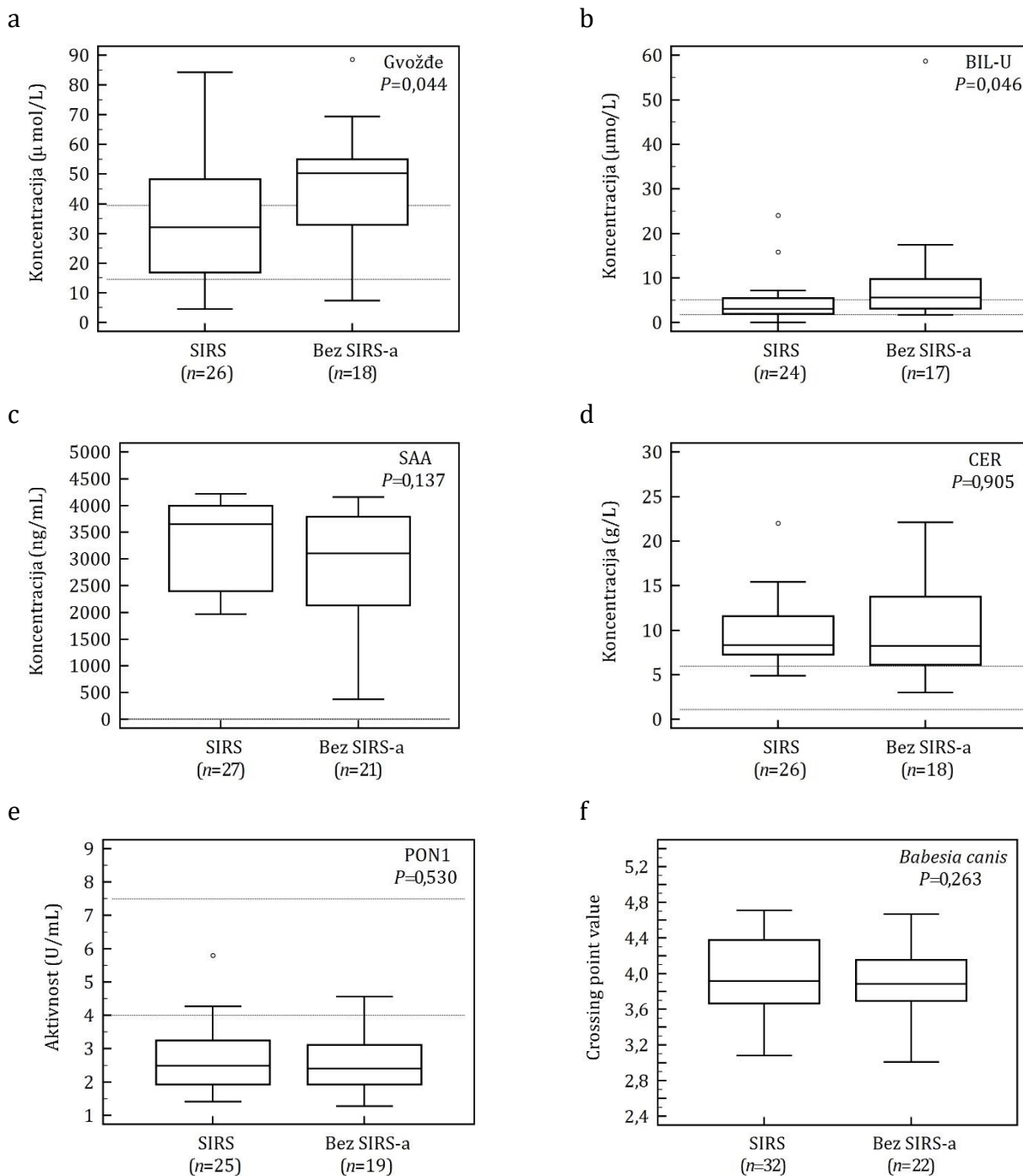
Grafikon 5: Broj (a) leukocita (WBC), (b) neutrofila (NEUT), (c) mladih neutrofila (Mladi NEUT), (d) monocita (MON) i (e) limfocita (LYM). Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. „Box” predstavlja vrednosti od donjeg do gornjeg kvartila. Srednja linija u „box”-u predstavlja medijanu. Linija je produžena od najmanje do najveće vrednosti. Krugovi predstavljaju ekstremne vrednosti. Tačkaste linije predstavljaju granice referentnih intervala kliničke laboratorije Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

Suprotno rezultatima dobijenim za belu krvnu sliku, u crvenoj krvnoj slici nije bilo razlika povezanih sa SIRS-om (Grafikon 6). Broj trombocita se takođe nije razlikovao između pasa sa i bez SIRS-a. Teška trombocitopenija bila je učestala u obe grupe (SIRS psi 88 %, psi bez SIRS-a 84 %), a samo jedan pas imao je broj trombocita unutar referentnih intervala i nalazio se u grupi bez SIRS-a.



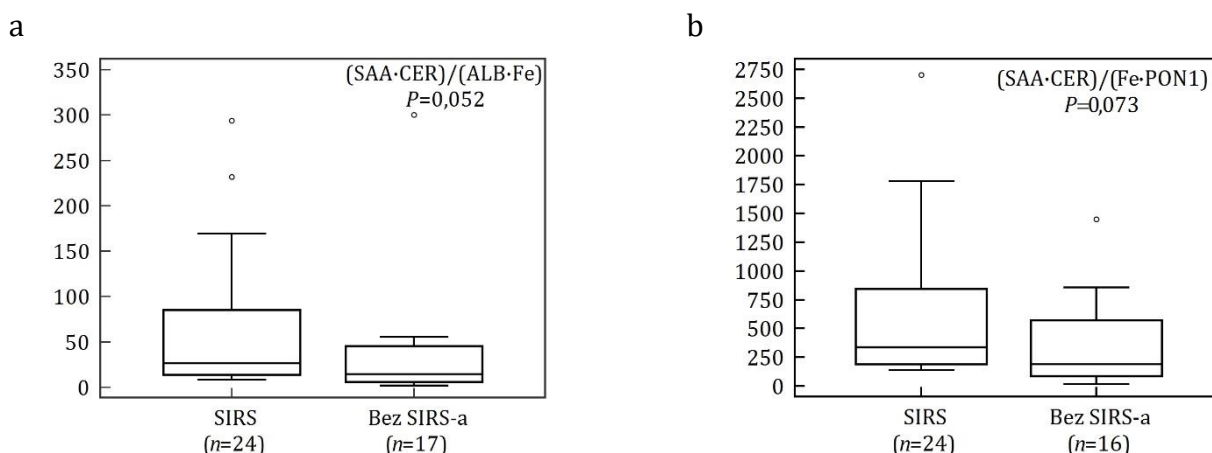
Grafikon 6: (a) broj eritrocita (RBC), (b) koncentracije hemoglobina (HGB), (c) vrednosti hematokrita (HCT), (d) prosečna zapremina eritrocita (MCV) i (e) prosečna koncentracija hemoglobina po litri eritrocita (MCHC). Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Kada se analiziraju biohemijski parametri, uočava se da su samo koncentracija gvožđa i ukupnog bilirubina pokazali postojanje razlike vezano za prisustvo SIRS-a (Grafikon 7a, b). Oba parametra su imala veću koncentraciju kod pasa bez SIRS-a, a samo je pet pasa iz SIRS grupe i jedan iz grupe bez SIRS-a imao koncentraciju gvožđa ispod referentnih intervala. Vrednosti pozitivnih APP (SAA i CER) bile su daleko iznad (Grafikon 7c,d), dok su vrednosti PON1 bile ispod referentnog intervala (Grafikon 7e) kod svih izuzev tri psa (dva sa SIRS-om i jednog bez SIRS-a). Međutim, razlike za APP kao i količinu DNK parazita u cirkulaciji (Grafikon 7f), vezane za SIRS nije bilo. Dodatno, statistički značajna korelacija ($\rho_s = -0,697$ sa 95% intervalom pouzdanosti od -0,819 do -0,516; $P < 0,001$) potvrdila je slaganje rezultata parazitemije određene mikroskopski i RT-PCR metodom (Beletić i sar., 2021). Iz ovog razloga, prilikom ispitivanja razlike u parazitemiji između seropozitivnih i seronegativnih pasa, odnosno između sezona prikazivani su samo rezultati RT-PCR metode. Između ove dve grupe bilo je razlike u prisustvu IgG antitela protiv *B. canis* ($P = 0,041$). U SIRS grupi bilo je 44 % seroreaktivnih pasa, dok je u grupi bez SIRS-a bilo 70 %.



Grafikon 7: Koncentracija (a) gvožđa (Gvožđe), (b) ukupnog bilirubina (BIL-U), (c) serum amiloida A (SAA) i (d) ceruloplazmina (CER), (e) aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) i (f) nivo paraziternije izražen kao „crossing point value“ u RT-PCR analizi za *B. canis*. Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Između pasa sa i bez prisutnog SIRS-a nije bilo statistički značajne razlike u vrednostima IRAF (Grafikon 8).



Grafikon 8: Indeksi reaktanata akutne faze (IRAF): (a) (SAA·CER)/(ALB·Fe) i (b) (SAA·CER)/(Fe·PON1). Gde su: SAA – serum amiloid A, CER – ceruloplazmin, ALB – albumin, Fe – gvožđe, i PON1 – paraoksonaza 1. Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Vrednosti drugih biohemijskih parametara i APP nisu se razlikovale između ove dve grupe pasa (Tabela 2).

Tabela 2. Rezultati biohemijskih parametara i proteina akutne faze (medijana, prvi i treći kvartil).

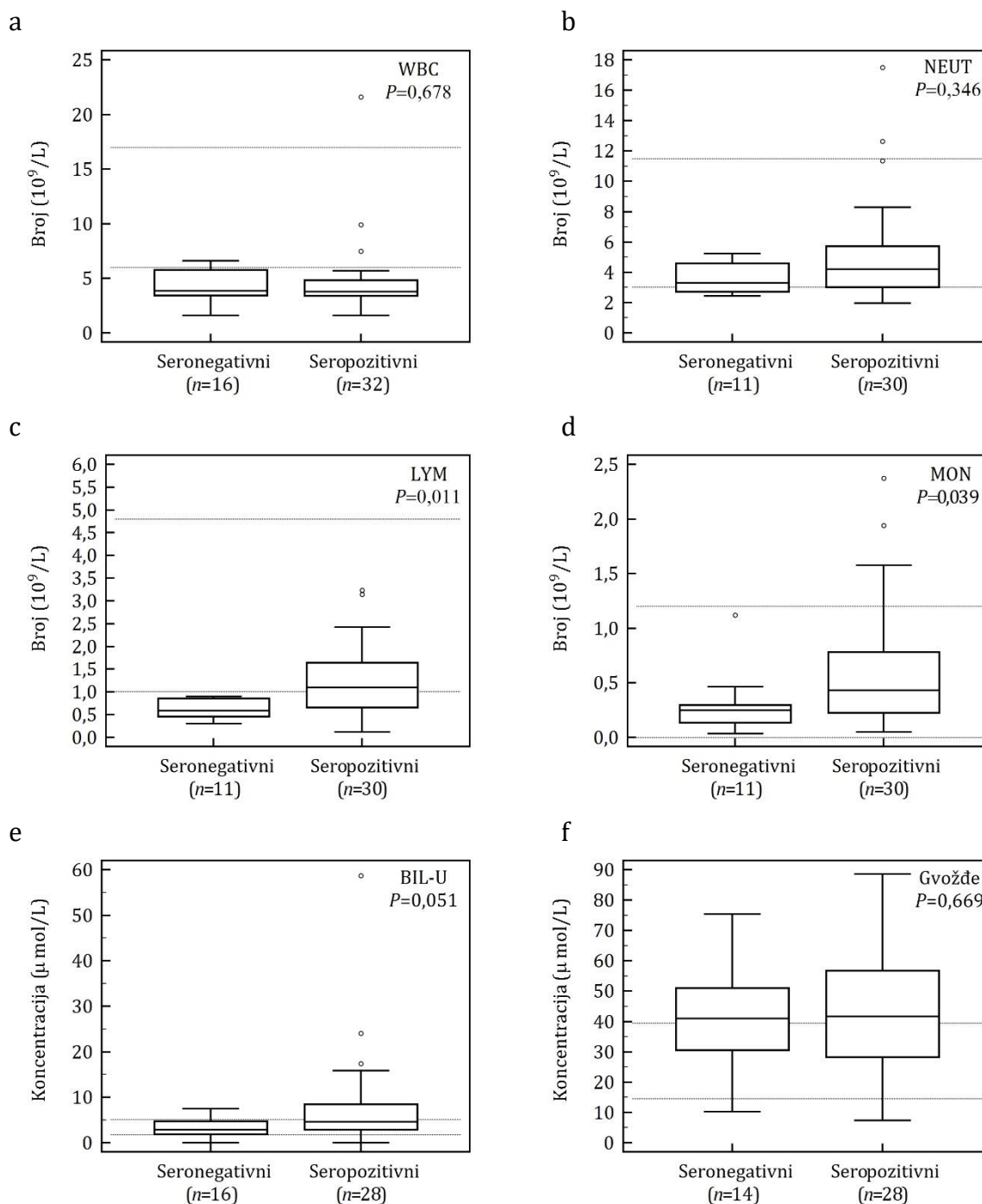
Parametar (jedinica)	SIRS	Bez SIRS-a	Referentni interval ^a	P^b
Ukupni proteini (g/L)	58,3 (41,3; 124,1)	62,5 (41,5; 92,1)	(54; 75)	0,279
Albumin (g/L)	30,4 (17,0; 41,6)	32,2 (20,0; 46,6)	(13; 31)	0,343
Globulini (g/L)	27 (20,3; 48,8)	28,3 (20,9; 45,5)	(16; 36)	0,378
Odnos albumin/globulini	1,18 (0,51; 1,77)	1,16 (0,52; 1,87)	(0,8; 2,0)	0,772
Kreatinin Jaffé (μmol/L)	92 (46; 205)	99 (24; 184)	(54; 150)	0,449
Urea (mmol/L)	5,55 (0; 24,59)	5,40 (2,63; 32,48)	(2,9; 10)	0,455
Neorganski fosfat (mmol/L)	1,61 (0,70; 2,77)	1,57 (0,65; 3,43)	(0,81; 1,90)	0,973
Glukoza (mmol/L)	5,48 (1,72; 7,98)	5,55 (2,76; 9,56)	(4,2; 6,6)	0,798
Holesterol (mmol/L)	4,7 (2,8; 7,4)	5,2 (3,1; 8,6)	(3,5; 7,5)	0,592
Trigliceridi (mmol/L)	0,82 (0,04; 1,46)	0,72 (0,37; 4,32)	(0,30; 1,50)	0,947
Alanin aminotransferaza (U/L)	26 (11; 130)	31 (0; 198)	(10; 109)	0,806
Aspartat aminotransferaza (U/L)	43 (3; 135)	29 (9; 158)	(13; 60)	0,181
Alkalna fosfataza (U/L)	239 (86; 999)	267 (140; 1413)	(11; 114)	0,321
Gama glutamil transferaza (U/L)	5 (0; 15)	6 (0; 13)	(1; 12)	0,331
Kreatin kinaza (U/L)	102 (25; 266)	85 (5; 218)	(50; 400)	0,057
Amilaza (U/L)	921 (406; 2283)	1120 (288; 6555)	(219; 1215)	0,403
Lipaza (U/L)	32,5 (12,4; 262,8)	49,6 (12,7; 1091)	(25; 250)	0,136
Fibrinogen (g/L)	6 (4; 10)	6 (1; 10)	(1,3; 4,8)	0,840

^a Referentni interval kliničke laboratorije Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

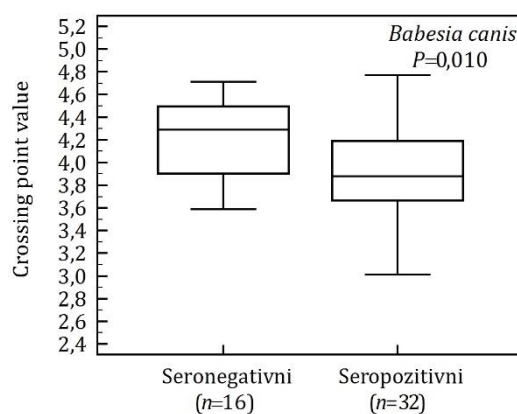
^b Nivo statistički značajne razlike ($P < 0,05$ smatra se značajnim) između grupa septičnih i neseptičnih pasa (Mann-Whitney U test).

5.2.2. Hematološki i biohemijski parametri kod *B. canis* seronegativnih i seropozitivnih pasa

Daljom analizom rezultata, parametri čije su se vrednosti razlikovale između pasa sa i bez SIRS-a, ispitani su i kod seroreaktivnih i seronegativnih pasa. Seroreaktivni psi imali su veći broj limfocita i monocita (Grafikon 9c, d). Iako se količina DNK parazita između septičnih i neseptičnih nije razlikovala (Grafikon 7f), bila je manja kod seropozitivnih u poređenju sa seronegativnim psima (Grafikon 10).



Grafikon 9: Broj (a) leukocita (WBC), (b) neutrofila (NEUT), (c) limfocita (LYM), (d) monocita (MON), koncentracije (e) ukupnog bilirubina (BIL-U) i (f) gvožđa (Gvožđe). Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

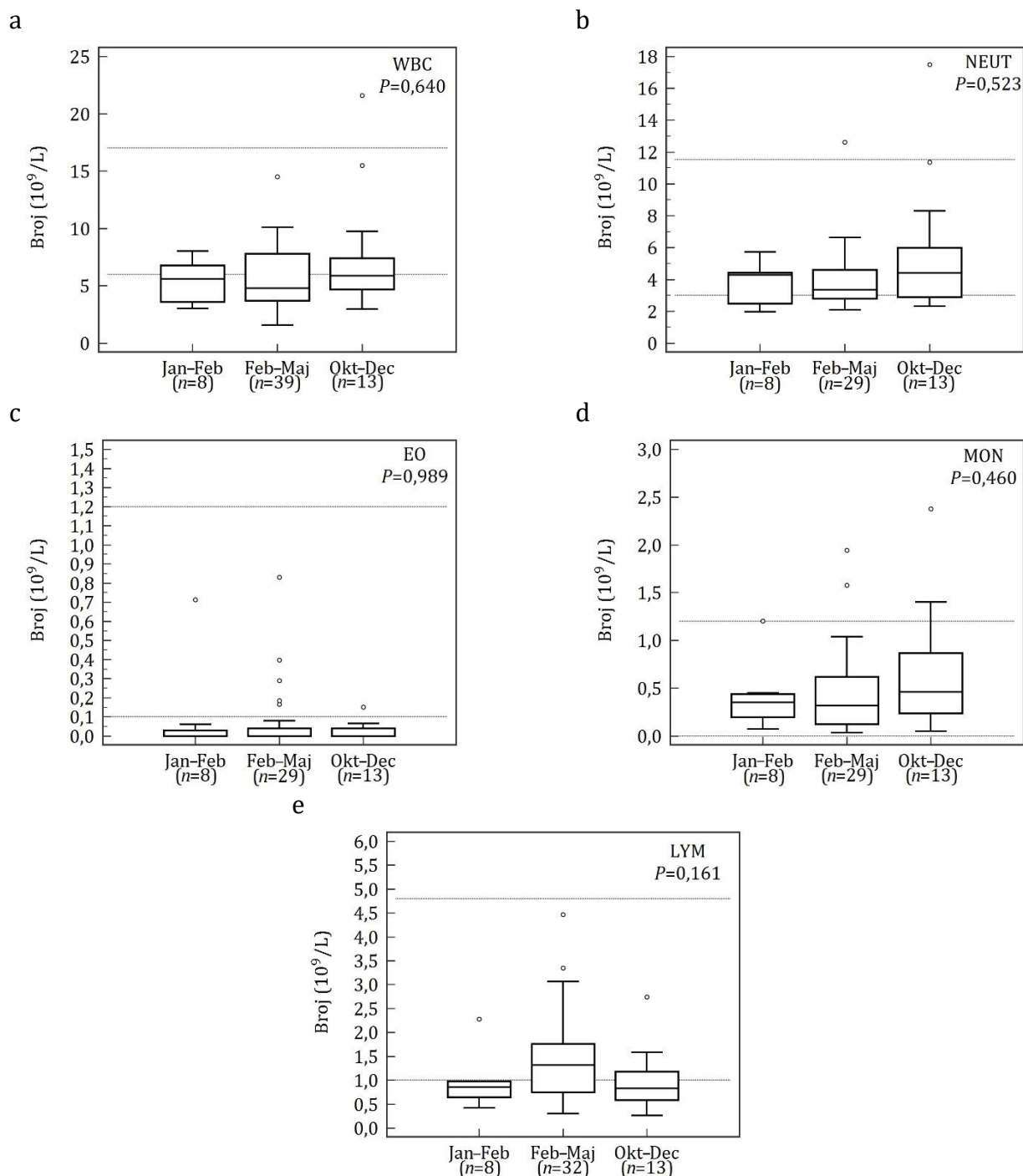


Grafikon 10: Nivo parazitemije izražen kao „crossing point value“ u RT-PCR analizi za *B. canis*. Mann-Whitney U test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

5.2.3. Promene laboratorijskih parametara vezane za sezone

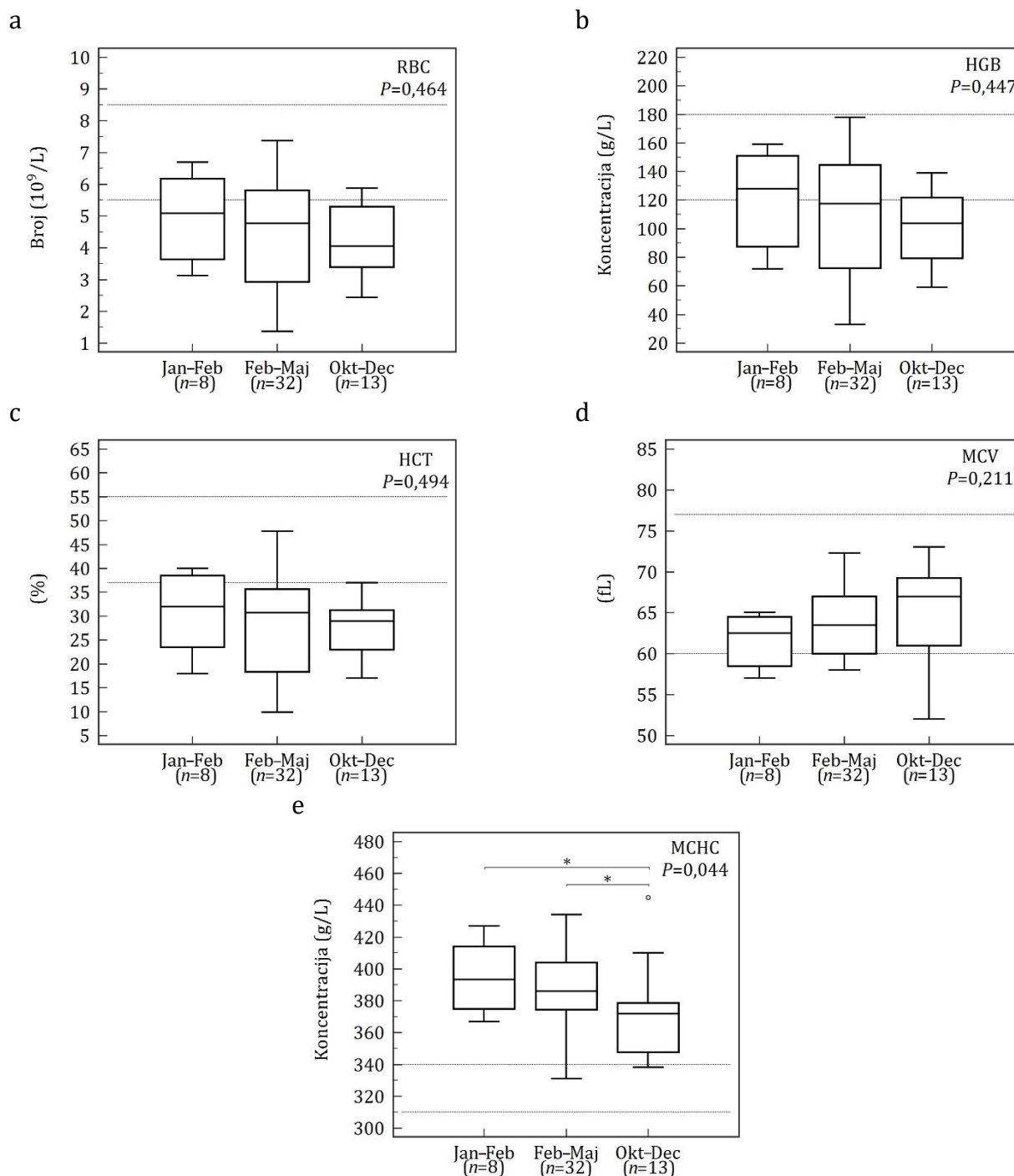
Psi kod kojih je u periodu 2017–2019. godine dijagnostikovana akutna babezioza uzrokovana infekcijom *B. canis*, podeljeni su u sezone, definisane na osnovu rezultata prvog dela studije, te su poređeni rezultati ispitivanja pune krvi i seruma. Neophodno je napomenuti da tokom 2017–2019. godine nije bilo pasa obolelih tokom sezone jun–septembar.

Analizom parametara bele krvne slike nije uočena njihova povezanost sa sezonom oboljenja (Grafikon 11). Međutim, primećeno je da je više od polovine svih ispitivanih pasa imalo leukopeniju (56 %) dok je 86 % bilo eozinopenično. Procenat zastupljenosti leukopenije i eozinopenije se nije razlikovao između grupa.



Grafikon 11: Broj (a) leukocita (WBC), (b) neutrofila (NEUT), (c) eozinofila (EO), (d) monocita (MON) i (e) limfocita (LYM). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Ispitivanjem crvene krvne slike uočeno je prisustvo anemije u sve tri grupe. Naime, anemiju je imalo 63 % pasa u sezoni Jan–Feb, 78 % pasa u sezoni Feb–Maj i 92 % pasa u sezoni Okt–Dec. Njena pojava nije bila uslovljena sezonom u kojoj se javilo oboljenje. Psi oboleli u sezoni Okt–Dec su imali manju prosečnu koncentraciju hemoglobina po litri eritrocita (Grafikon 12e) od pasa obolelih u druge dve sezone.



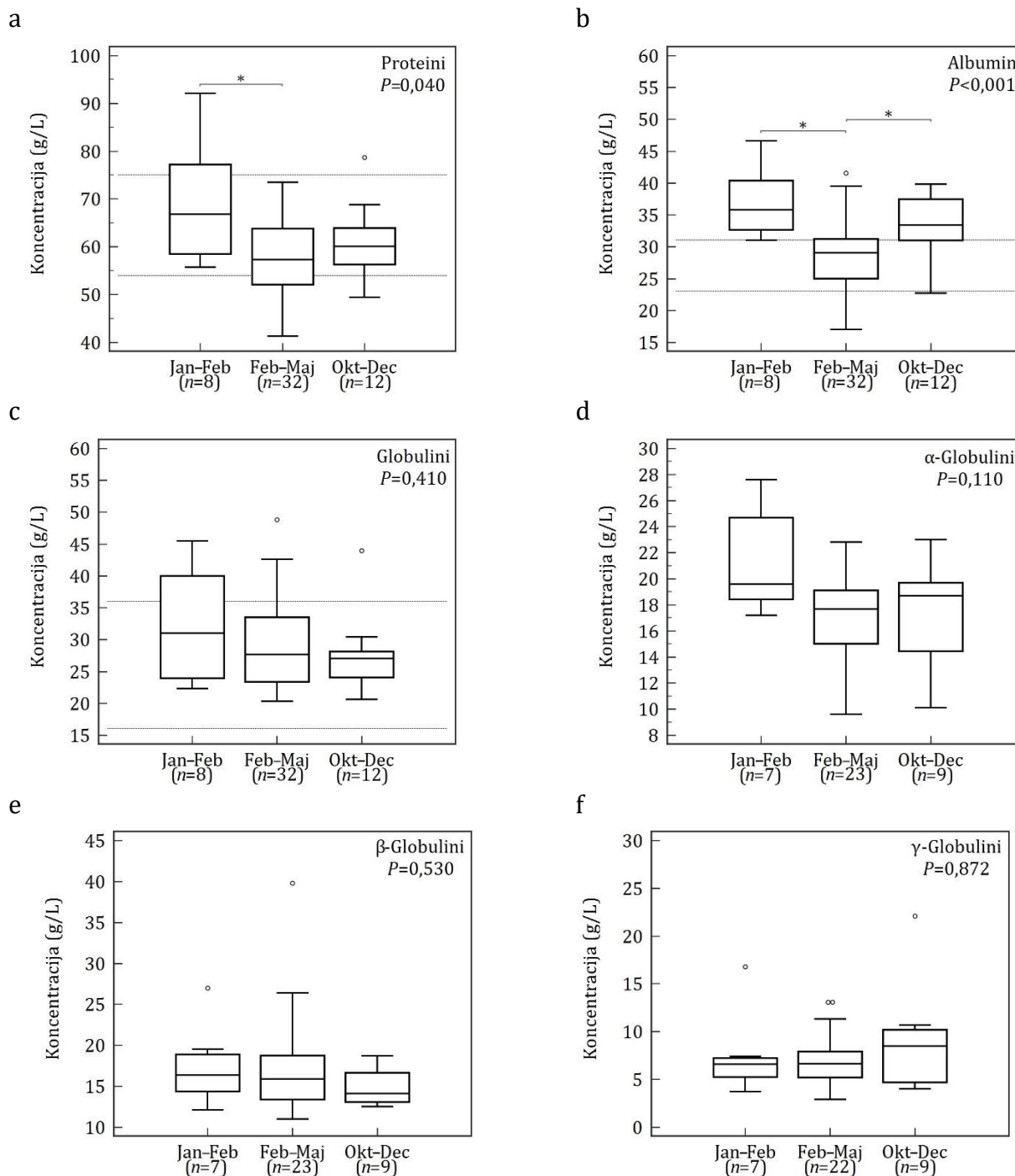
Grafikon 12: (a) broj eritrocita (RBC), (b) koncentracije hemoglobina (HGB), (c) vrednosti hematokrita (HCT), (d) prosečna zapremina eritrocita (MCV) i (e) prosečna koncentracija hemoglobina po litri eritrocita (MCHC). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Od 56 pasa, samo kod jednog u sezoni Jan–Feb, broj trombocita bio je u okviru referentnih intervala svi ostali su bili tromocitopenični (Tabela 3).

Tabela 3. Medijana, minimalan i maksimalan broj trombocita kod pasa obolelih od babezioze u sezoni Jan–Feb, Feb–Maj, Okt–Dec.

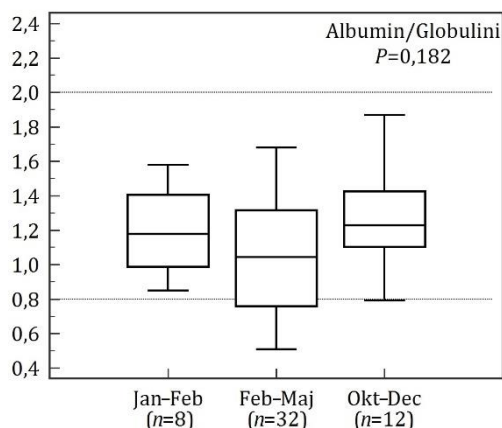
PLT ($P = 0,254$)	
Sezona	Medijana (minimum–maksimum)
Jan–Feb ($n = 10$)	0 (0; 237)
Feb–Maj ($n = 33$)	0 (0; 137)
Okt–Dec ($n = 13$)	2 (0; 118)

U sezoni Feb–Maj koncentracija albumina kod obolelih pasa bila je manja u odnosu na druge dve sezone (Grafikon 13b). Kod većine pasa koncentracija albumina u sezoni Feb–Maj bila je u okviru, dok je u druge dve sezone bila veća od referentnog intervala. Za razliku od albumina, koncentracija ukupnih proteina se razlikovala samo između Jan–Feb i Feb–Maj sezone (Grafikon 13a). Kod većine pasa proteini su bili u okviru referentnog intervala dok je manji broj pasa u sezoni Jan–Feb imao vrednosti ukupnih proteina iznad, a u sezoni Feb–Maj ispod referentnog intervala.



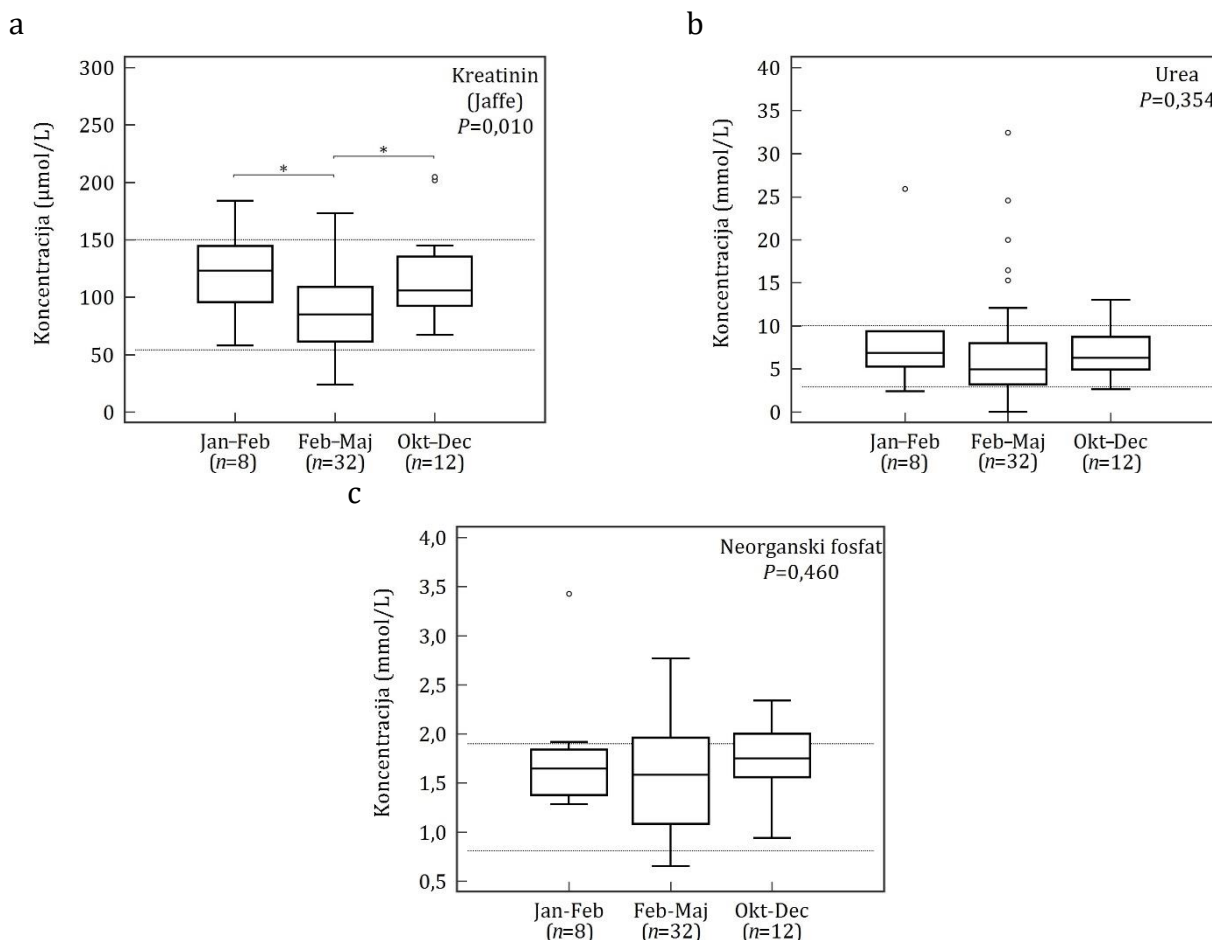
Grafikon 13: Koncentracija (a) ukupnih proteina (Proteini), (b) albumina (Albumin), (c) ukupnih globulina (Globulini), (d) α -globulina (α -Globulini), (e) β -globulina (β -Globulini) i (f) γ - globulina (γ -Globulini). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Odnos albumin/globulini nije se razlikovao između sezona i sa malim brojem izuzetaka u sezoni Feb–Maj, bio je u okviru referentnih intervala (Grafikon 14).



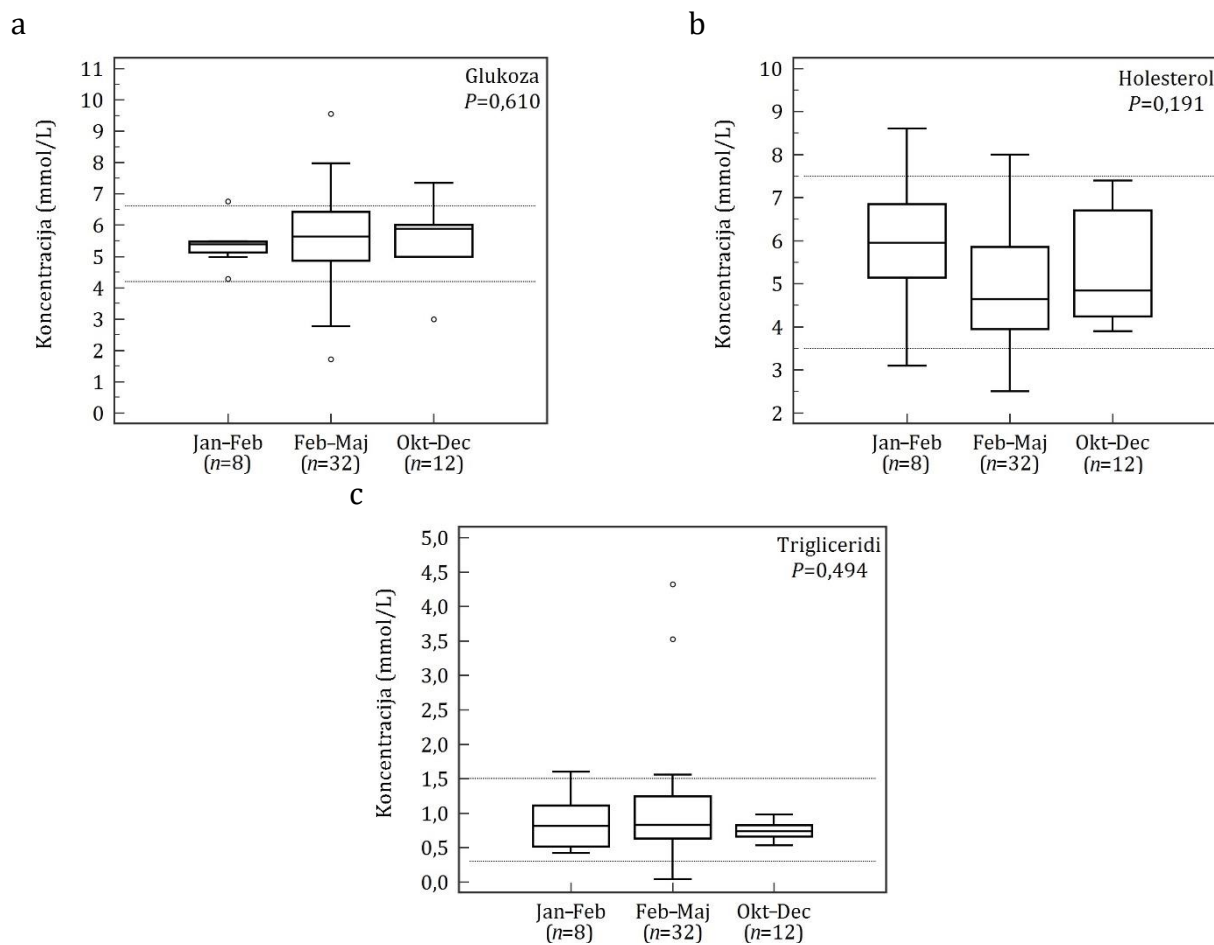
Grafikon 14: Odnos albumin/globulini (Albumin/Globulini). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Koncentracija kreatinina je bila niža u sezoni Feb–Maj od koncentracije u druge dve sezone (Grafikon 15a).



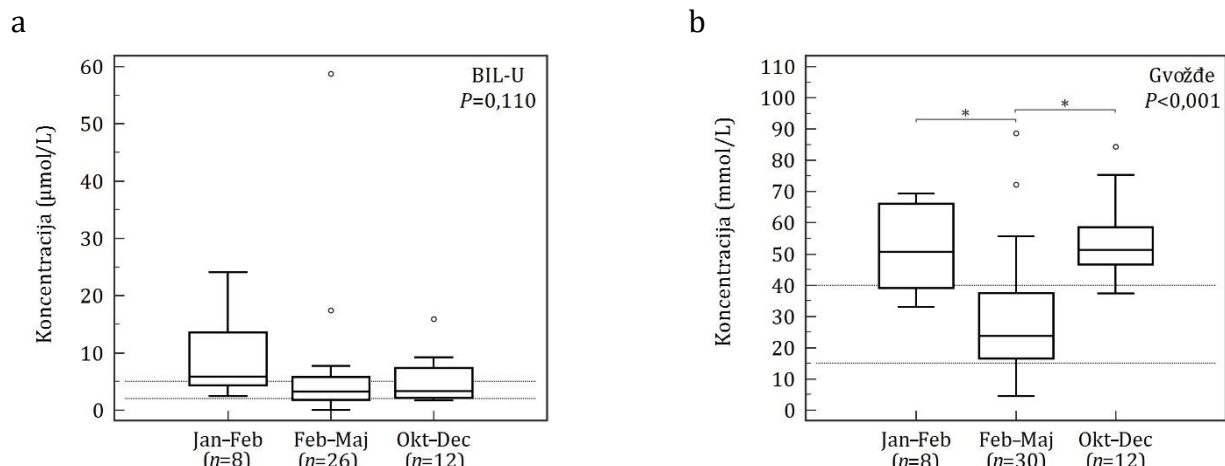
Grafikon 15: Koncentracija (a) kreatinina, određena Jaffé metodom (Kreatinin (Jaffé)), (b) uree (Urea) i (c) neorganskog fosfata (Neorganski fosfat). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Koncentracije glukoze, holesterola i triglicerida nisu se razlikovale između sezona i sa malim brojem izuzetaka bile su u okviru referentnih intervala (Grafikon 16).



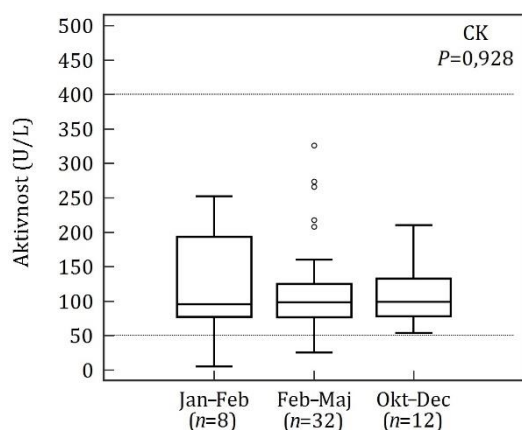
Grafikon 16: Koncentracija (a) glukoze (Glukoza), (b) holesterola (Holesterol) i (c) triglicerida (Trigliceridi). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Koncentracija gvožđa bila je manja u sezoni Feb–Maj u odnosu na druge dve (Grafikon 17b). Polovina pasa u sezoni Feb–Maj imala je koncentraciju gvožđa u okviru referentnih intervala, dok je kod polovine preostalih iz ove sezone bila iznad i isto toliko ispod referentnog intervala. Dva psa iz sezone Jan–Feb i jedan iz Okt–Dec imali su koncentraciju gvožđa u okviru, a svi ostali su imali veću koncentraciju od referentnih intervala.



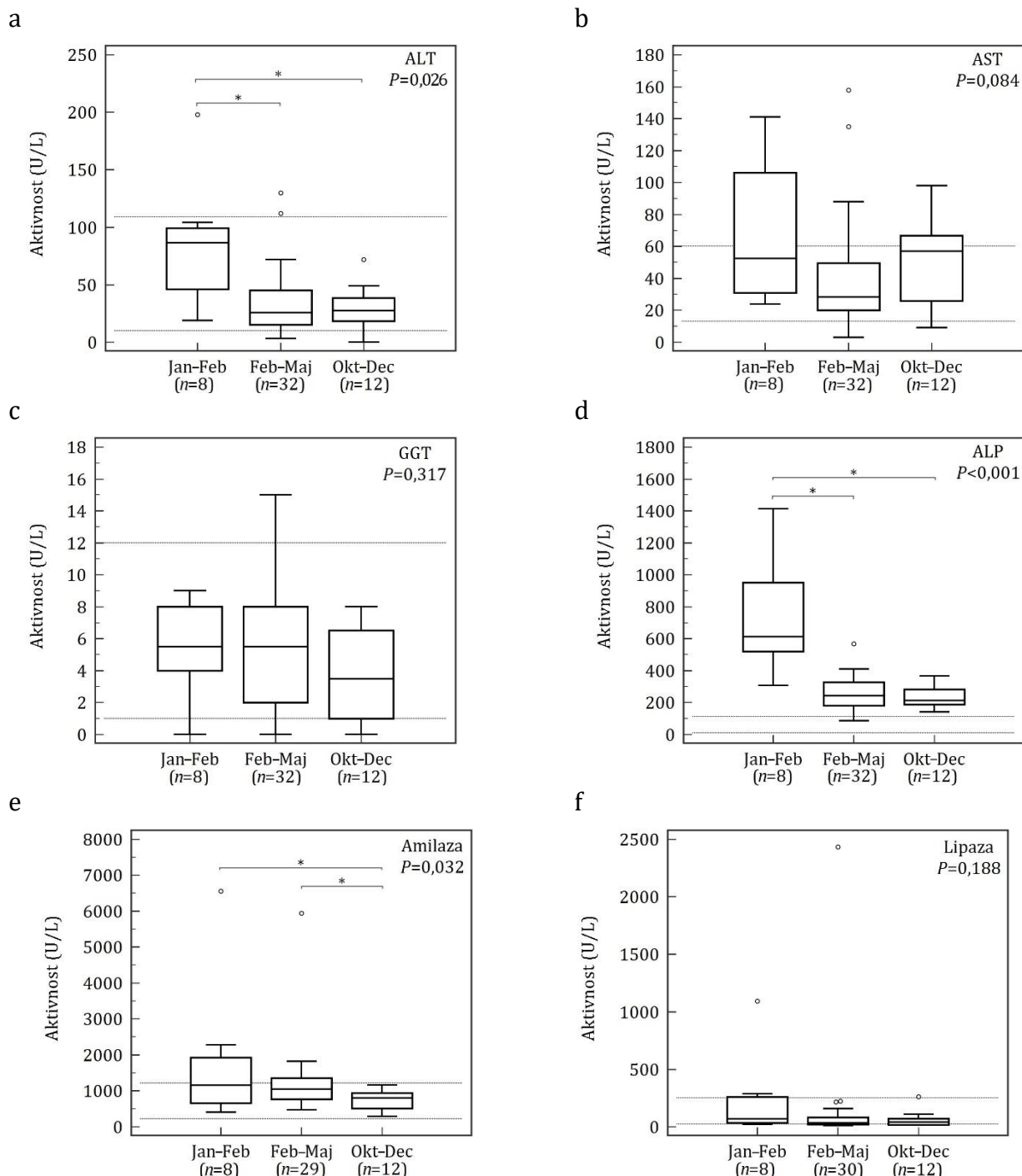
Grafikon 17: Koncentracija (a) ukupnog bilirubina (BIL-U) i (b) gvožđa (Gvožđe). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Aktivnost kreatinin kinaze nije se razlikovala između sezona i sa malim brojem izuzetaka bila je u okviru referentnih intervala (Grafikon 18).



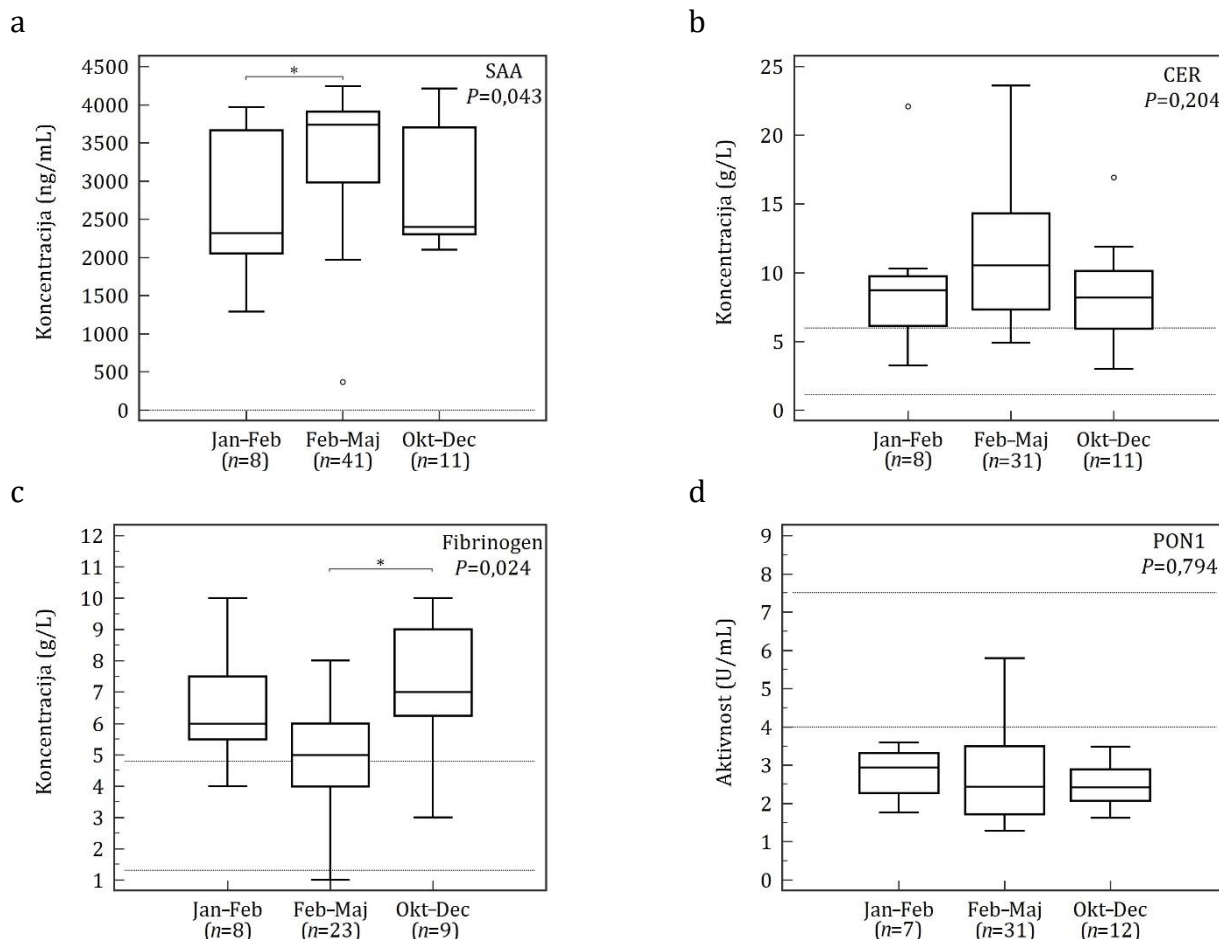
Grafikon 18: Aktivnost kreatinin kinaze (CK). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Aktivnost enzima jetre se razlikova među sezonama, pa su tako ALT i ALP bili veći u sezoni Jan-Feb od druge dve (Grafikon 19a,d). Međutim, dok su vrednosti za ALP veće od referentnih, za ALT su u referentnom intervalu. Aktivnost amilaze je bila visoka u sezonama Jan-Feb i Feb-Maj i razlikovala se od sezona Okt-Dec u kojoj je bila u okviru referentnih intervala (Grafikon 19e).



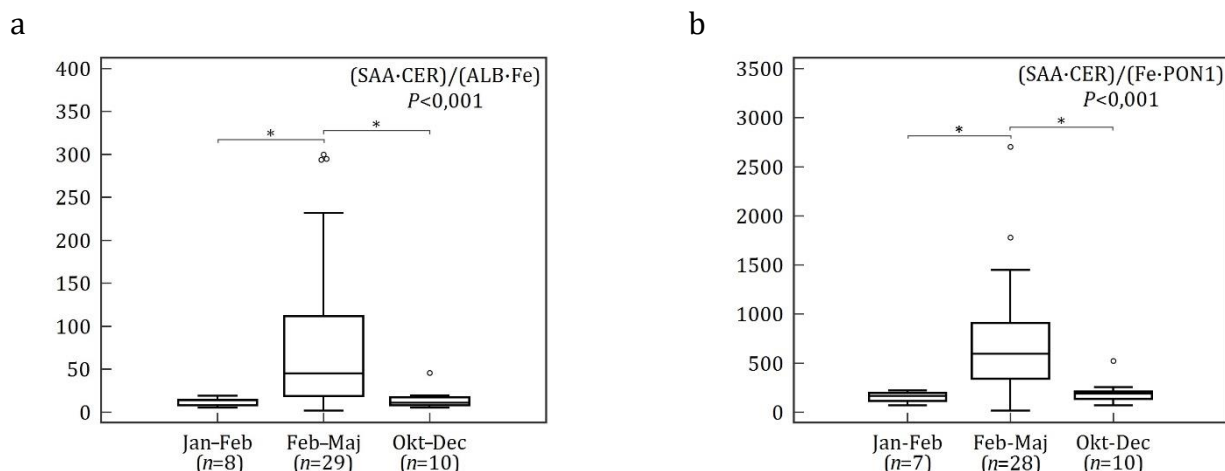
Grafikon 19: Aktivnost (a) alanin aminotransferaze (ALT), (b) aspartat aminotransferaze (AST), (c) gama glutamil transferaze (GGT), (d) alkalne fosfataze (ALP), (e) amilaze (Amilaza) i (f) lipaze (Lipaza). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Ispitivanjem APP kod pasa obolelih od babezioze, pokazano je da je koncentracija pozitivnih APP (SAA, CER i fibrinogen) bila iznad referentnog intervala, dok je negativnog APP, paraoksonaze 1, bila snižena (Grafikon 20). Psi oboleli u sezoni Feb–Maj su imali veću koncentraciju SAA od obolelih u sezoni Jan–Feb (Grafikon 20a). Koncentracija se još razlikovala za fibrinogen, i bila je veća u sezoni Okt–Dec u poređenju sa sezonom Feb–Maj (Grafikon 20c).



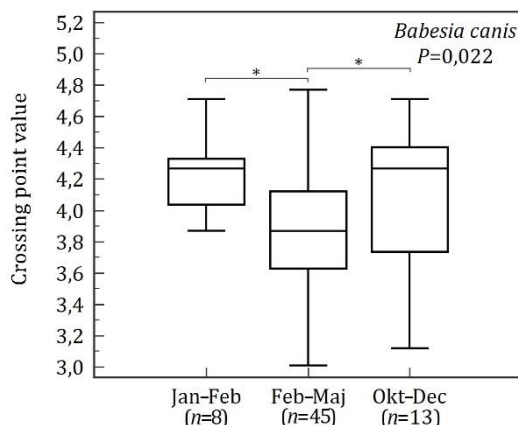
Grafikon 20: Koncentracija (a) serum amiloida A (SAA), (b) ceruloplazmina (CER) i (c) fibrinogena (Fibrinogen) i (d) aktivnost paraoksonaze 1 (PON1). Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

Radi dobijanja preciznijeg pokazatelja odgovora organizma na oštećenje tkiva, kombinovanjem više markera inflamacije izračunati su indeksi reaktanata akutne faze. Oba indeksa pokazuju veću vrednost u sezoni Feb–Maj od druge dve sezone (Grafikon 21).



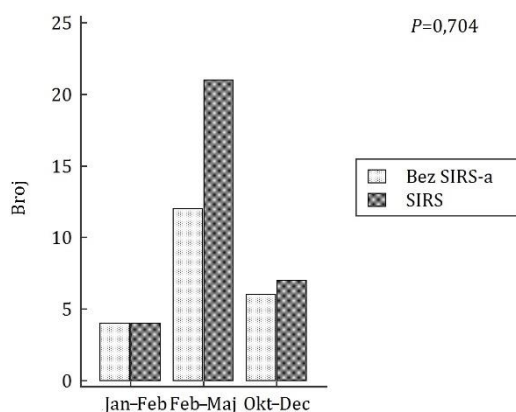
Grafikon 21: Indeksi reaktanata akutne faze (a) $(SAA \cdot CER) / (ALB \cdot Fe)$ i (b) $(SAA \cdot CER) / (Fe \cdot PON1)$. Gde su: SAA – serum amiloid A, CER – ceruloplazmin, ALB – albumin, Fe – gvožđe, i PON1 – paraoksonaza 1. Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

U cirkulaciji pasa obolelih u sezoni Feb–Maj bila je detektovana manja količina DNK *B. canis* u poređenju sa druge dve sezone (Grafikon 22).



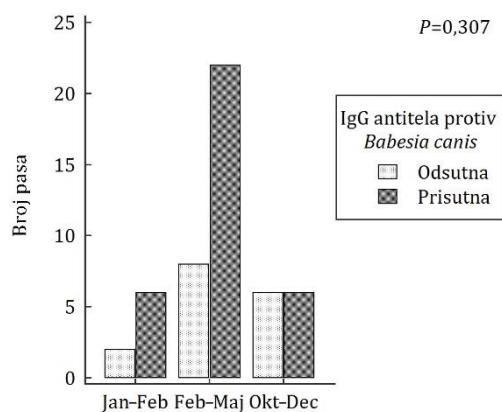
Grafikon 22: Nivo parazitemije izražen kao „crossing point value“ u RT-PCR analizi za *B. canis*. Kruskal-Wallis test, $P < 0,05$ smatra se značajnim. Zvezdica iznad konektora predstavlja $P < 0,05$. Oznake i simboli kao na grafikonu 5.

SIRS je bio potvrđena kod 59 % pasa, a razlike u njenoj zastupljenosti po sezonama nije bilo (Grafikon 23).



Grafikon 23: Broj pasa sa i bez SIRS-a. Hi-kvadrat test, $P < 0,05$ smatra se značajnim.

Na prisustvo IgG antitela protiv *B. canis* ispitano je 48 pasa, od kojih je 68 % bilo seropozitivno. Nije bilo razlike u njihovoj zastupljenosti po sezonama (Grafikon 24).



Grafikon 24: Broj pasa sa i bez IgG antitela protiv *B. canis*. Hi-kvadrat test, $P < 0,05$ smatra se značajnim.

5.2.4. Logistička regresiona analiza laboratorijskih promena vezane za sezone

Logistička regresiona analiza primenjena je na parametre koji su se razlikovali u sezoni Feb–Maj u odnosu na druge dve sezone. Cilj analize bila je procena jačine povezanosti sa promenama njihovih nivoa u odnosu na granične vrednosti, koje su definisane kao medijana svih dobijenih vrednosti.

Rezultati za pojedinačne parametre prikazani su u Tabeli 4. Univarijantna tehnika je pokazala da je za svaki od njih verovatnoća njihovog sniženja ispod graničnih vrednosti višestruko povećana u sezoni Feb–Maj. Ovaj efekat sniženja je bio najizraženiji za koncentraciju gvožđa, kada je verovatnoća za sniženje bila približno 25 puta veća nego u drugim sezonama. O značaju ove povezanosti dodatno govori činjenica da je i za količinu DNK parazita, parameter kod koga je efekat bio najmanje izražen, verovatnoća za pojavu manje vrednosti od granične, bila približno četiri puta. Dodatna analiza multivarijantnom tehnikom pokazala je da su sniženje koncentracije gvožđa i albumina nezavisno povezani sa sezonom Feb–Maj, dok za količinu parazita i koncentraciju kreatinina to nije bio slučaj.

Tabela 4. Logistička regresiona analiza pojedinačnih parametara koji se razlikuju u sezoni Feb–Maj u odnosu na ostale sezone.

Parametar	OR (95 % IP)	P
Univarijantna analiza		
Količina parazita < 3,9 cr. p. v.	3,79 (1,16; 12,30)	0,020
Albumin < 31 g/L	17,00 (3,93; 73,58)	< 0,001
Kreatinin < 94 µmol/L	5,73 (1,64; 19,94)	0,006
Gvožđe < 37 µmol/L	24,75 (4,66; 131,48)	< 0,001
Multivarijantna analiza		
Količina parazita < 3,9 cr. p. v.	1,69 (0,21; 13,67)	0,622
Albumin < 31 g/L	22,85 (1,80; 290,46)	0,016
Kreatinin < 94 µmol/L	3,14 (0,41; 24,15)	0,272
Gvožđe < 37 µmol/L	50,69 (4,03; 637,24)	0,002

OR – Odds ratio; IP – interval pouzdanosti

Univarijantna tehnika takođe je pokazala analogne efekte i za indekse reaktanata akutne faze: verovatnoća povišenja njihovih vrednosti je višestruko povećana u sezoni Feb–Maj (Tabela 5). Povećanje je bilo izraženije nego kod pojedinačnih parametara tj. približni opseg u kome se kretalo je 25–60 puta. Međutim, s obzirom na to da su izračunati kombinovanjem različitih parametara, na njih nije bilo moguće pouzdano primeniti multivarijantnu tehniku.

Tabela 5. Logistička regresiona analiza za indekse reaktanata akutne faze i sezonu Feb–Maj.

Parametar	OR (95 % IP)	P
(SAA·Cer)/(Alb·Fe)	25,14 (4,60;137,40)	< 0,001
(SAA·Cer)/(Fe·PON1)	58,67 (6,42; 536,30)	< 0,001

OR – Odds ratio; IP – interval pouzdanosti; SAA – serum amiloid A; Cer – ceruloplazmin; Alb – albumin; Fe – gvožđe; PON1 – paraoksonaza 1

5.2.5. Korelacije hematoloških i biohemijskih parametara sa količinom DNK *B. canis*, sezonom i starošću pasa

Parametri koji su bili u značajnoj korelaciji sa količinom DNK parazita prikazani su u Tabeli 6. Korelacija sa aktivnošću AST, odnosom koncentracija albumina i globulina, kao i koncentracijom holesterola, gvožđa i fosfata bila je pozitivna. Kada su u pitanju starost, ukupan broj leukocita, broj limfocita i aktivnost GGT uočena je negativna korelacija.

Tabela 6. Parametri u značajnoj korelaciji sa količinom DNK kod pasa prirodno inficiranih protozom *B. canis*.

Parametar	ρ_s (95 % IP)	P
Starost	-0,43 (-0,62; -0,21)	< 0,001
WBC (10 ⁹ /L)	-0,28 (-0,50; -0,02)	0,038
LYM (10 ⁹ /L)	-0,41 (-0,62; -0,13)	0,005
AST (U/L)	0,51 (0,27; 0,69)	< 0,001
GGT (U/L)	-0,31 (-0,54; -0,03)	0,033
Albumin/Globulini	0,29 (0,01; 0,53)	0,045
Holesterol (mmol/L)	0,55 (0,32; 0,72)	< 0,001
Gvožđe (μmol/L)	0,34 (0,06; 0,57)	0,018
Fosfati (mmol/L)	0,53 (0,29; 0,71)	< 0,001

ρ_s – Spirmanov koeficijent korelacije; IP – interval pouzdanosti; WBC – leukociti; AST – aspartat aminotransferaza; GGT – gama glutamil transferaza; LYM – limfociti

Tabela 7 sadrži parametre koji su bili u značajnoj korelaciji sa sezonama, tj. kod kojih je prisutno sniženje tokom godine.

Tabela 7. Hematološki i biohemijski parametri u značajnoj korelaciji sa sezonama kod pasa prirodno inficiranih protozom *B. canis*.

Parametar	ρ_s (95 % IP)	P
ALT (U/L)	-0,28 (-0,52; -0,01)	0,042
AMY (U/L)	-0,34 (-0,57; -0,06)	0,017
ALP (U/L)	-0,47 (-0,66; -0,22)	0,001
MCHC (g/L)	-0,33 (-0,55; -0,07)	0,015

ρ_s – Spirmanov koeficijent korelacije; IP – interval pouzdanosti; AMY – amilaza; ALP – alkalna fosfataza; ALT – alanin aminotransferaza; MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina po litri eritrocita

U tabeli 8 su prikazane korelacije između starosti pasa obolelih od babezioze i različitih hematoloških i biohemijskih parametara. Broj eritrocita, leukocita, nivo hemoglobina i vrednost hematokrita, koncentracija kreatinina, ukupnih proteina i globulina, kao i aktivnost amilaze i lipaze pokazivali su veće vrednosti kod starijih pasa. Obrnuta veza dobijena je za koncentraciju glukoze, fosfata, holesterola kao i odnos koncentracija albumina i globulina. Ostali hematološki i biohemijski parametri nisu pokazivali značajnu korelaciju sa starošću pasa.

Tabela 8. Korelacija hematoloških i biohemijskih parametara sa starošću pasa kod pasa prirodno inficiranih protozoozom *B. canis*.

Parametar	ρ_s (95 % IP)	P
RBC ($10^{12}/L$)	0,53 (0,29; 0,70)	< 0,001
HGB (g/L)	0,55 (0,31; 0,72)	< 0,001
HCT (%)	0,53 (0,29; 0,71)	< 0,001
WBC ($10^9/L$)	0,30 (0,04; 0,52)	0,025
Glukoza (mmol/L)	-0,38 (-0,60; -0,11)	0,007
Kreatinin ($\mu\text{mol}/L$)	0,34 (0,06; 0,57)	0,018
Fosfati (mmol/L)	-0,47 (-0,66; -0,21)	< 0,001
Ukupni protein (g/L)	0,32 (0,04; 0,55)	0,025
Globulini (g/L)	0,54 (0,30; 0,71)	< 0,001
Albumin/Globulini	-0,45 (-0,65; -0,20)	0,001
Holesterol (mmol/L)	-0,47 (-0,66; -0,21)	< 0,001
Amilaza (U/L)	0,36 (0,08; 0,59)	0,014
Lipaza (U/L)	0,41 (0,13; 0,62)	0,005

ρ_s – Spirmanov koeficijent korelacije; IP – interval pouzdanosti; RBC – eritrociti; HGB – koncentracija hemoglobina; HCT – hematokrit; WBC – leukociti

5.2.6. Promene hematoloških i biohemijskih parametara vezanih za pol i rasu pasa inficiranih protozoozom *B. canis*

Promene pojedinih hematoloških i biohemijskih parametara kod pasa inficiranih protozoozom *B. canis* su bile povezane sa njihovim polom i rasom. Mužjaci su imali niže vrednosti MCV i broj neutrofila u odnosu na ženke, dok je odnos bio obrnut za MCHC i aktivnost ALP (Tabela 9). Logističkom regresionom analizom (Tabela 10) testirana je jačina povezanosti između muškog pola i promena vrednosti pomenutih parametara u odnosu na granične vrednosti, definisane kao medijana svih vrednosti u studiji. Univarijantnom tehnikom pokazano je da je povezanost značajna za MCV, gde je verovatnoća pojave nižih vrednosti prosečno šest puta veća kod mužjaka, i ALP, za koju je uočeno da je verovatnoća pojave povišene koncentracije u proseku četiri puta veća. Multivarijantna tehnika je pokazala da je samo povećanje aktivnosti alkalne fosfataze nezavisno povezano sa muškim polom.

Tabela 9. Parametri čije se vrednosti statistički značajno razlikuju između mužjaka i ženki kod pasa prirodno inficiranih protozoozom *B. canis*. Vrednosti su izražene kao medijana sa interkvartilnim rasponom.

Parametar	Mušjaci	Ženke	P
MCV (fL)	62 (59; 65)	67 (63; 68)	< 0,001
MCHC (g/L)	386 (377; 409)	374 (350; 387)	0,010
Neutrofil (10 ⁹ /L)	3,2 (2,4; 4,4)	4,4 (3,3; 6,5)	0,035
ALP (U/L)	317 (233; 376)	220 (182; 270)	0,037

MCV – prosečna zapremina eritrocita; MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina po litri eritrocita; ALP – alkalna fosfataza

Tabela 10. Logistička regresiona analiza parametara koji se razlikuju između mužjaka i ženki kod pasa prirodno inficiranih protozooom *B. canis*.

Parametar	OR (95 % IP)	P
Univarijantna analiza		
MCV < 64 fL	6,00 (1,77; 20,37)	0,002
MCHC > 382 g/L	2,91 (0,93; 9,14)	0,062
Neutrofili < 3,8·10 ⁹ /L	3,00 (0,84; 10,73)	0,085
ALP > 252 U/L	4,00 (1,11; 14,43)	0,029
Multivarijantna analiza		
MCV < 64 fL	4,52 (1,15; 17,78)	0,031
MCHC > 382 g/L	/	/
Neutrofili < 3,8·10 ⁹ /L	/	/
ALP > 252 U/L	3,55 (0,91; 13,94)	0,069

OR – Odds ratio; IP – interval pouzdanosti; MCV – prosečna zapremina eritrocita; MCHC – prosečna koncentracija hemoglobina po litri eritrocita; ALP – alkalna fosfataza

Rasni psi su u poređenju sa mešancima imali veći broj mladih neutrofila, odnosno nižu koncentraciju glukoze i aktivnost GGT (Tabela 11). Logistička regresiona analiza (Tabela 12) pokazala je da je kod rasnih pasa skoro sedam puta povećana verovatnoća prisustva mladih neutrofila u broju većem od graničnih vrednosti, definisan kao medijana svih vrednosti u studiji.

Tabela 11. Parametri čije se vrednosti statistički značajno razlikuju između rasnih pasa i mešanaca prirodno inficiranih protozooom *B. canis*. Vrednosti su izražene kao medijana sa interkvartilnim rasponom.

Parametar	Rasni	Mešanci	P
Mladi neutrofili (10 ⁹ /L)	0,09 (0,00; 0,19)	0,00 (0,00; 0,00)	0,004
Glukoza (mmol/L)	5,5 (4,8; 6,0)	6,2 (5,4; 7,4)	0,025
GGT (U/L)	4,5 (1,0; 7,0)	7,0 (5,5; 9,0)	0,046

GGT – gama glutamil transferaza

Tabela 12. Logistička regresiona analiza parametara koji se razlikuju između rasnih pasa i mešanaca prirodno inficiranih protozooom *B. canis*.

Parametar	Univarijantna analiza	
	OR (95 % IP)	P
Mladi neutrofili > 0,06·10 ⁹ /L	6,87 (1,32; 35,77)	0,009
Glukoza > 5,5 mmol/L	3,67 (0,86; 15,62)	0,063
GGT > 5 U/L	3,70 (0,83; 16,67)	0,085

OR – Odds ratio; IP – interval pouzdanosti; GGT – gama glutamil transferaza

6. DISKUSIJA

6.1. Veza pojave akutne babezioze sa meteorološkim parametrima

6.1.1. Sezonalnost babezioze pasa

Nedeljni broj dijagnostikovanih slučajeva babezioze pasa na teritoriji Beograda ukazuje na sezonalnost njene pojave u kojoj se izdvajaju dva godišnja maksimuma, veći u zimsko-prolećnom periodu i manji tokom jeseni. Ovakav nalaz u skladu je sa aktivnošću *D. reticulatus* (Földvári i sar., 2016). Čak i pojava babezioze tokom zimskih meseci može se dovesti u vezu sa ponašanjem *D. reticulatus*, koji tokom toplijih dana u ovom periodu mogu relativno brzo postati aktivni (Földvári i sar., 2016).

Sezonalnost babezioze sa dva godišnja maksimuma, zimsko-prolećnim i jesenjim, zabeležena je i u drugim delovima Evrope, kao što su severni delovi Francuske, istočni delovi Austrije, delovi Mađarske u blizini granice sa Austrijom, istočnim i centralnim delovima Poljske, u Hrvatskoj (Leschnik i sar., 2008; Matijatko i sar., 2012; René-Martellet i sar., 2013; Welc-Falęciak i sar., 2009). Ovi regioni, kao i Srbija, imaju četiri godišnja doba. Međutim, u Austriji i Poljskoj pojava babezioze pasa učestalija je u jesen (Leschnik i sar., 2008; Welc-Falęciak i sar., 2009) što bi se moglo povezati sa hladnijim letima i dužim preživljavanjem krpelja koji nastavljaju svoju aktivnost u jesenjoj sezoni. U drugim oblastima Evrope sa toplijom klimom i blažom zimom, kao što su pojedini delovi Francuske, slučajevi se beleže tokom cele godine izuzev toplih letnjih perioda (René-Martellet i sar., 2013).

6.1.2. Kratkoročna veza pojave babezioze pasa i meteoroloških parametara

Visoke temperature ograničavaju aktivnost krpelja pa je i broj dijagnostikovanih slučajeva u najtoplijem delu godine najmanji. Međutim, čak i pri temperaturama iznad 26 °C, zabeleženo je 0,7 % slučajeva babezioze. Ipak, najveći broj dijagnostikovanih slučajeva u najtoplijoj sezoni Jun–Sep odgovara temperaturama (15–25) °C. U ovoj sezoni, porast broja slučajeva prate pad temperature, povećanje relativne vlažnosti i pad atmosferskog pritiska. Ovde je interesantno napomenuti da je u Mađarskoj sredinom leta, na psima, zabeleženo prisustvo larvi i nimfi vrsta roda *Dermacentor* (Hornok i sar., 2013) zbog čega se može postaviti pitanje njihove uloge u prenosu *B. canis*.

Niske temperature takođe ograničavaju aktivnost krpelja, pa je u najhladnijem mesecu, decembru, zabeležen mali broj slučajeva, dok je sa porastom temperature koji je usledio u januaru, došlo i do porasta broja slučajeva. Tokom četiri ispitane godine, zabeleženo je šest slučajeva kojima odgovara temperatura od -4 °C do 0 °C, dok se u literaturi kao granične donje temperature na kojima je zabeležena aktivnost *D. reticulatus* pominju 2,5 °C (Buczek i sar., 2014), 1 °C (Nosek, 1972), i -0,1 °C (Hubálek i sar., 2004).

Jedno od mogućih objašnjenja za pojavu babezioze na niskim temperaturama je što srednje nedeljne temperature ne daju potpunu informaciju o dnevnim varijacijama temperature. Naime, *D. reticulatus* može postati aktivan relativno brzo tokom toplih zimskih dana (Földvári

i sar., 2016), a možda i tokom nekoliko sati ukoliko su maksimalne dnevne temperature dovoljno visoke. Drugo moguće objašnjenje je da sa hladnim danima dolazi do aktiviranja oboljenja kod asimptomatskih nosioca *B. canis*. Asimptomatska infekcija pasa uzročnikom *B. canis*, zabeležena je u više slučajeva (Bajer i sar., 2013; Beck i sar., 2009; Kovačević Filipović i sar., 2018; Welc-Falęciak i sar., 2009), a pojedini autori smatraju da slabljenje imunološkog sistema može dovesti do aktiviranja oboljenja (Bajer i sar., 2013; Bourdoiseau, 2006). U skladu sa tim, hladno vreme bi moglo biti uzrok stresa i narušavanja imuniteta.

U sezoni Feb–Maj, nedeljama sa najvećim brojem slučajeva i nedeljama sa jednim slučajem nedeljno odgovara ista temperatura. Međutim, treba napomenuti da je u ovoj sezoni bilo samo dve nedelje u kojima je zabeležen po jedan slučaj, što je broj nedovoljan za donošenje zaključka. Porast broja slučajeva u sezoni Okt–Dec prati i povećanje temperature.

Ako se „povoljnim“ meteorološkim parametrima za aktivnost krpelja mogu smatrati oni koji odgovaraju nedeljama sa dijagnostikovanih 5–11 slučajeva babezioze, onda u svakoj sezoni, izuzev Jun–Sep, postoji specifična kombinacija povoljnih parametara. Tako i u najhladnijoj sezoni Jan–Feb postoji kombinacija pri kojoj su krpelji aktivni: temperatura između -4°C i $6,5^{\circ}\text{C}$ pri relativnoj vlažnosti od približno (68–87) %. Dalje, meteorološki parametri povezani sa nedeljnim brojem slučajeva od 12 i više mogli bi se smatrati „optimalnim“. U tom slučaju optimalni uslovi se javljaju samo u sezoni Feb–Maj i čini ih temperatura ($3\text{--}16^{\circ}\text{C}$) pri relativnoj vlažnosti (53–87) %. Prosečna temperatura u nedeljama sa „optimalnim“ uslovima iznosila je $9,2^{\circ}\text{C}$, a prosečna relativna vlažnost 67 %. Ove vrednosti su vrlo bliske temperaturi od 10°C i relativnoj vlažnosti od 73 % pri kojima je u aprilu tokom 1998–2000. godine na teritoriji Srbije zabeležena najveća aktivnost *D. reticulatus* (Milutinović i Radulovic, 2002). Dijagnostikovanje velikog broja slučajeva babezioze ne samo u aprilu, nego i u februaru i martu 2013–2016. godine, može se objasniti klimatskim promenama koje su dovele do relativno visokih temperatura tokom kasne zime, što posledično može uticati i na povećanje aktivnosti krpelja u ovim mesecima.

Može se postaviti pitanje da li je za povećanu aktivnost krpelja dovoljna samo optimalna temperatura. Na primer, u južnom delu Italije najveća aktivnost *D. reticulatus* zabeležena je u mesecu aprilu pri relativnoj vlažnosti vazduha (45–60) %, koja se ne smatra povoljnom. Autori su ovu činjenicu objasnili relativnom vlažnošću vazduha tokom meseca marta koja je bila veća od 70 %, što je povoljno uticalo na hidriranost krpelja i omogućilo njihovu maksimalnu aktivnost u aprilu (Olivieri i sar., 2017). Produženo povoljno dejstvo relativne vlažnosti na aktivnost krpelja može biti objašnjenje i za veliki broj slučajeva u pojedinim nedeljama u sezoni Feb–Maj u kojima je vlažnost bila ispod 60 %.

Postoji nekoliko ograničavajućih faktora u tumačenju rezultata ove doktorske disertacije dobijenih retrospektivnom analizom. Jedan od njih je sam dijagnostički postupak koji se sastojao od pregleda krvnog razmaza i potvrde prisustva velikih babezija u eritrocitima, bez određivanja vrste. Od babezija u Srbiji, *B. canis* je najrasprostranjenija (Davitkov i sar., 2015) ali je zabeleženo i prisustvo *B. vogeli* (Gabrielli i sar., 2015) čiji je vektor *Ripicephalus sanguineus*, krpelj aktivan tokom toplih sezona (Dantas-Torres, 2010). Stoga se neki od naših zabeleženih slučajeva, naročito oni iz letnje sezone, mogu pripisati infekciji pasa *B. vogeli*. Još jedno ograničenje u tumačenju rezultata je nedostatak informacija o aktivnosti domaćina,

odnosno ponašanju vlasnika pasa, što u značajnoj meri može uticati na dijagnostikovan broj slučajeva babezioze.

6.1.3. Dugoročna veza pojave babezioze pasa i meteoroloških parametara

Na pojavu babezioze pasa utiče brojnost inficiranih vektora, a posredno i uslovi staništa tokom razvoja vektora. Meteorološki parametri u velikoj meri određuju uslove staništa u kom se odvija razvoj krpelja. Stoga je korelacionom analizom meteoroloških parametara i broja slučajeva babezioze, ispitan dugoročni uticaj meteoroloških parametara na pojavu babezioze i indirektno na populaciju krpelja. Međutim, potrebno je naglasiti da su meteorološki parametri samo jedan od faktora koji utiče na populaciju krpelja.

U rezultatima korelacione analize dati su samo koeficijenti korelacije koji se pojavljuju u grupama i tako ukazuju na konzistentnu povezanost meteoroloških parametara sa brojem dijagnostikovanih slučajeva babezioze, a sporadični slučajevi korelacije su isključeni. Ispitivanjem je utvrđeno da u sezoni Jan–Feb, koja je najhladnija sezona, do povećanja broja slučajeva dolazi sa istovremenim padom temperature, odnosno da su nedelje u kojima se povećava broj slučajeva hladnije od prethodne. Jedno od mogućih, već pomenutih objašnjenja, je da pad već niske temperature dovodi i do pada imuniteta pasa asimptomatskih nosioca uzročnika i do aktiviranja oboljenja. Povećanje oblačnosti od jednog do tri meseca pre dijagnoze bolesti u Jan–Feb sezoni, što odgovara periodu kasne jeseni, doprinosi porastu broja slučajeva babezioze. Povećanje oblačnosti može se povezati sa dužinom fotoperioda koji je jedan od glavnih stimulusa za početak dijapauze (Belozarov i sar., 2002). Početak dijapauze u kasnu jesen omogućava većem broju krpelja da prežive hladne zimske dane (decembar je bio najhladniji mesec), koji bi sa prolaskom nepovoljnih uslova mogli da se aktiviraju.

Koeficijenti korelacije za sezonu Feb–Maj pokazuju da u prve četiri nedelje pre dijagnostikovanja babezioze jedini uticaj ima temperatura. Njeno smanjenje tokom ove četiri nedelje povezano je sa povećanjem broja slučajeva. Ona ima uticaj i pri vremenskom kašnjenju od četiri do osam meseci, što odgovara periodu jeseni i zime, kada je u pozitivnoj korelaciji sa brojem slučajeva, dok za isti period relativna vlažnost pokazuje negativnu korelaciju. Ovo ukazuje na to da su topliji i manje vlažni uslovi u tom periodu povoljniji za preživljavanje krpelja. Nasuprot ovome, temperatura pokazuje negativnu korelaciju tokom kasnog proleća i ranog leta (vremensko kašnjenje od 40 do 50 nedelja). To je period polaganja jaja, razvoja larvi i nimfi (Földvári i sar., 2016), a njihovom većem preživljavanju mogle bi doprineti niže temperature, kao i povećana vlažnost vazduha (vremensko kašnjenje 44 i 45 nedelja).

O rezultatima sezone Jun–Sep nije diskutovano, jer je tada dijagnostikovan mali broj slučajeva. Naime, u više od 70 % nedelja, nije zabeležen nijedan ili je zabeležen samo po jedan slučaj babezioze.

U sezoni Okt–Dec uočava se negativna korelacija temperature tokom leta (vremensko kašnjenje 14 do 19 nedelja), sugerišući da hladniji letnji dani omogućavaju preživljavanje nimfi koje se tada hrane. Porast temperature i smanjenje vlažnosti tokom prethodne jeseni i zime (vremensko kašnjenje od 37 do 42 nedelja) omogućava veći broj prezimelih inficiranih krpelja koji se potom razmnožavaju i doprinose brojnijoj populaciji inficiranih krpelja.

6.2. Kliničko-patološke promene i karakteristike inflamatornog odgovora vezane za prisustvo SIRS-a

U ovom ispitivanju, oko 60 % pasa je zadovoljavalo dva kriterijuma po kojima se moglo definisati prisustvo SIRS-a nakon infekcije *B. canis*. Ti rezultati su vrlo slični rezultatima u regionu. Tako je u Zagrebu zabeleženo da je oko 70 % pasa obolelih od babezioze imalo sepsu, odnosno zadovoljavalo kriterijume SIRS-a (Matijatko i sar., 2010). Međutim, svih 32 SIRS psa u ovom istraživanju ispunjavali su samo dva SIRS kriterijuma, dok je u istraživanju koje su sprovedeli Matijatko i sar. (2010), 67 % pasa ispunjavalo dva, 29 % tri, a 4 % četiri SIRS kriterijuma. Rezultati ove doktorske disertacije takođe pokazuju da će mužjaci sa babezozom verovatno razviti SIRS, što nije slučaj sa ženkama. Ovo se može objasniti supresivnim delovanjem muških polnih hormona na imunološki odgovor, dok ženski polni hormoni pokazuju zaštitno dejstvo (Angele i sar., 2014). Međutim, potrebno je biti oprezan pri tumačenju ovih rezultata, jer druga istraživanja (Goddard i sar., 2016; Matijatko i sar., 2009) nisu utvrdila vezu između pojave SIRS-a i pola pasa.

SIRS se dalje može komplikovati i dovesti do septičnog šoka ili otkazivanja funkcije brojnih organa, što povećava opasnost od smrtnog ishoda. Da ne bi došlo do toga, bitno je rano prepoznati SIRS i odmah početi sa adekvatnom terapijom. Jedan od parametara na osnovu koga se dijagnostikuje SIRS i na osnovu koga su formirane grupe u ovom istraživanju je broj leukocita, koji kod SIRS pozitivnih pasa može biti povećan ili smanjen u odnosu na referentni interval. Međutim, kod SIRS pozitivnih pasa obolelih od babezioze leukopenija je zabeležena kod 91 % pasa dok je kod pasa bez SIRS-a zabeležena u 14 % slučajeva što opravdava načinjenu podelu. Učestalija limfopenija kod SIRS pasa može nastati zbog povećane apoptoze ili preraspodele limfocita (Rautenbach i sar., 2017). Kao posledica može se javiti slabljenje imunološkog sistema. Neutropenija je čest nalaz kod pasa inficiranih *B. canis* (Davitkov i sar., 2015; Milanović i sar., 2017; Milanović i sar., 2019), dok je kod SIRS pasa češća nego kod pasa bez SIRS-a. Nepostojanje razlike u broju mladih neutrofila između pasa sa i bez SIRS-a može ukazati na balans između sazrevanja neutrofila i njihove moguće razgradnje u slezini (Máthé i sar., 2006). Psi u ovom istraživanju, bez obzira da li su bili označeni kao SIRS pozitivni ili psi bez SIRS-a, imali su mali broj mladih neutrofila. Taj broj je čak bio manji nego kod onih pasa koji su bili prirodno inficirani *B. rossi* (Goddard i sar., 2016). Interesantno je naglasiti da je smrtnost pasa inficiranih *B. rossi* značajno viša u odnosu na pse inficirane *B. canis* (Goddard i sar., 2016), a da je uginuće kao ishod bolesti, bilo povezano sa povećanjem broja mladih neutrofila (Leisewitz i sar., 2019a). Ova razlika se može objasniti većom virulencijom *B. rossi* (Böhm i sar., 2006), a takođe je potrebno naglasiti da se ni kod jednog psa u ovom istraživanju nije razvio šok niti je došlo do uginuća, što implicira da je nalaz manjeg broja mladih neutrofila prognostički povoljan znak. Broj monocita bio je značajno smanjen (ispod $0,2 \cdot 10^9/L$) kod približno polovine SIRS pozitivnih pasa, dok je kod pasa bez SIRS-a to bio redak slučaj. Među brojnim kliničkim i laboratorijskim parametrima, u istraživanju sprovedenom na više od 2000 ljudi koji su imali sepsu, monocitopenija je bila jedini nezavisni prediktor mortaliteta. U istom istraživanju, broj monocita ispod $0,25 \cdot 10^9/L$ bio je povezan sa većim mortalitetom, stopom bakterijemije i otkazivanjem funkcija organa (Chung i sar., 2019). Međutim, treba ponovo naglasiti da su se svi psi čiji su rezultati analizirani u ovoj studiji, posle terapije, uspešno oporavili, tako da se značaj utvrđene monocitopenije ne može u potpunosti objasniti.

Svi navedeni rezultati, kao rezultati studije u kojoj su analizirani hematološki parametri asimptomatskih pasa prirodno inficiranih *B. canis* (Milanović i sar., 2020), ukazuju da se napredovanje kliničkog oblika babezioze može pratiti promenom broja različitih vrsta leukocita. Tako na primer, kod asimptomatskih slučajeva babezioze, broj ukupnih leukocita i limfocita u okviru je referentnih intervala dok je broj neutrofila na gornjoj granici referentnih intervala (Milanović i sar., 2020). Slični su nalazi i kod klinički zdravih pasa izloženih krpeljski prenosivim patogenima (Janjić i sar., 2020). Većina pasa bez SIRS-a u ovom istraživanju ima ukupan broj leukocita kao i broj pojedinačnih vrsta leukocita u okviru referentnih intervala, dok se među SIRS psima nalazi značajan broj neutropeničnih i limfopeničnih. Osim toga, pad broja monocita može se smatrati nezavisnim prediktorom razvoja SIRS-a.

Obe grupe pasa, odnosno i psi sa i bez SIRS-a, imali su blagu, normocitnu, normohromnu anemiju. Ovaj tip anemije indirektno ukazuje na neregenerativni odgovor koštane srži, što je verovatno posledica brzog toka bolesti. Utvrđeno je da se 15 dana posle terapije babezioze pasa imidazol-dipropionatom (6 mg/kg) broj eritrocita vraća u okvire fizioloških vrednosti, a broj retikulocita pokazuje da je postojao regenerativni odgovor koštane srži (neobjavljeni rezultati). Takođe postoji mogućnost da je u periodu akutne faze bolesti usled infekcije *B. canis*, analogno psima inficiranim *B. rossi* eritropoeza suprimirana (Goddard i sar., 2016).

Većina pasa u obe ispitivane grupe imala je tešku trombocitopeniju, nezavisno od promena u broju leukocita, odnosno nezavisno od SIRS-a. Još uvek nije jasno opisano koji mehanizam dovodi do pada u broju trombocita. Nepoznato je da li se radi o smanjenom stvaranju, povećanoj razgradnji, povećanoj potrošnji ili sekvestraciji u malim krvnim sudovima.

Kod većine pasa, koncentracija gvožđa u cirkulaciji bila je u okviru referentnih intervala ili je bila blago povećana. Gvožđe je element neophodan za rast većine mikroorganizama, u koje spada i *B. canis*. Njegovo povećanje u cirkulaciji se može objasniti izlaskom iz eritrocita sa ciljem smanjenja njegove dostupnosti protozoama, odnosno *B. canis* (Ross, 2017). Ovaj mehanizam je opisan kod infekcija unutraćelijskim patogenima (Ross, 2017). Koncentracija gvožđa manja je kod SIRS pasa, što može biti posledica povećane koncentracije hepcidina, APP koji se sintetiše u jetri tokom zapaljenske reakcije. Porast koncentracije hepcidina je pokazan kod malarije (Spottiswoode i sar., 2014).

Kod SIRS pasa u ovoj studiji, koncentracija bilirubina bila je nešto niža u odnosu na pse bez SIRS-a. Blaga hiperbilirubinemija koja je prisutna kod pojedinih pasa inficiranih *B. canis* nije neuobičajena (Davitkov i sar., 2015; Milanović i sar., 2017). Takođe, kod teških komplikacija babezioze, kada je dijagnostikovano septični šok, vrednosti bilirubina bile su višestruko povećane (Matijatko i sar., 2009). Tako, nije moguće objasniti zašto je kod pasa u ovoj studiji koncentracija bilirubina bila viša kod pasa sa manje izraženim laboratorijskim parametrima oboljenja, nego kod onih koji su po tim parametrima imali teži oblik inflamacije.

Iako su koncentracije brzog pozitivnog APP (SAA) i sporog pozitivnog APP (CER) bile povećane kod svih pasa, one nisu ukazivale na veći stepen zapaljenja kod SIRS pasa. Slično, razlika u koncentraciji C-reaktivnog proteina, nije bila diskriminatorna za lakše i teže oblike babezioze pasa (Kuleš i sar., 2016). Ni aktivnost negativnog APP (PON1), antioksidativnog enzima, nije bila različita između SIRS pasa i pasa bez SIRS-a iako je u obe grupe bila manja od referentnih

intervala. Dobijene aktivnosti PON1 u ovom istraživanju odgovaraju izmerenoj aktivnosti PON1 kod pasa sa asimptomatskom babeziozom (Milanović i sar., 2020). Kuleš i sar. (2016) pokazali su da je aktivnost PON1 kod pasa obolelih od babezioze niža u poređenju sa zdravim psima, ali se na osnovu tog smanjenja nije mogla razlikovati težina kliničke slike babezioze. Interesantno je objašnjenje da PON1 učestvuje u antioksidativnoj zaštiti organizma, ali da se prilikom neutralizacije slobodnih kiseonikovih radikala i on sam inaktivira, te se svakako može smatrati da svi klinički tokovi babezioze izazivaju oksidativni stres.

Odsustvo razlike u nivou parazitemije između pasa sa i bez SIRS-a, u skladu je sa rezultatima pasa eksperimentalno inficiranih *B. canis*, koji su pokazali da „doza“ parazita kojom su inficirani psi određuje vreme početka zapaljenskog odgovora, ali ne i njegov intenzitet (Schetters i sar., 2009). Sa druge strane, navedena studija je izvedena na tri psa, tako da se neki od rezultata moraju uzeti sa rezervom. Osim toga, pokazano je da se *B. canis* nalazi u eritrocitima koji su u sastavu fibrinskog ugruška formiranog u kapilarima (Schetters, 2019), ostavljajući mogućnost da određena količina parazita, verovatno veća kod SIRS pasa, ostane skrivena. Kod pasa prirodno inficiranih *B. canis* koji su razvili septički šok, zabeležena je veća parazitemija od parazitemije u ovom istraživanju, ali njen nivo nije bio povezan sa ishodom oboljenja (svi psi su uginuli) ili brojem organa koji su oštećeni (Matijatko i sar., 2009). Nasuprot tome, istraživanja babezioze uzrokovane infekcijom pasa *B. rossi*, pokazuju da su teže kliničke manifestacije oboljenja i lošija prognoza praćeni većim opterećenjem parazitima (Böhm i sar., 2006; Leisewitz i sar., 2019b).

Među psima bez SIRS-a bilo je više seroreaktivnih, što ukazuje na zaštitni efekat antitela protiv *B. canis* (Schetters, 2005). Takođe, prisustvo antitela može biti glavni faktor koji utiče na nivo parazitemije, jer je kod seronegativnih pasa parazitemija bila veća. Odsustvo ovakve razlike između SIRS pasa i pasa bez SIRS-a naglašava važnost faktora povezanih sa domaćinom tokom razvoja SIRS-a. Manji broj monocita kod seronegativnih pasa inficiranih *B. canis* mogao bi biti od velike važnosti. Može se pretpostaviti da je broj makrofaga slezine koji učestvuju u klirensu *B. canis* bar delimično povezan sa brojem monocita u cirkulaciji (Chung i sar., 2019), pa bi zbog smanjenog broja monocita bio smanjen i klirens *B. canis*. Ovome u prilog ide veća parazitemija kod seronegativnih pasa kod kojih je i nivo monocita manji.

Nedostatak anamnestičkih podataka o periodu pojave kliničkih znakova babezioze pre odlaska veterinaru predstavlja ograničenje ovog istraživanja. Takođe, eventualne prethodne infekcije *B. canis*, supklinička oboljenja koja mogu biti prisutna uz babeziozu, kao i individualne specifičnosti imunološkog sistema mogli bi uticati na dobijene rezultate.

6.3. Procena težine zapaljenske reakcije kod pasa prirodno inficiranih *B. canis* u različitim sezonama

Pojava akutne babezioze pasa pokazuje sezonalnost u svom pojavljivanju, pa je u ovom poglavlju prodiskutovana povezanost promene laboratorijskih parametara koji mogu ukazati na narušenu homeostazu uzrokovanu babeziozom i nivoa parazitemije sa sezonom oboljenja.

Rezultati pokazuju da je broj parazita u venskoj cirkulaciji pasa obolelih u sezoni Feb–Maj manji od onog kod obolelih u druge dve sezone. Nasuprot tome, u ovoj sezoni najveća je aktivnost

vektora (Milutinović i Radulovic, 2002), pa se može očekivati da će se tada naći najveći broj inficiranih krpelja na psima, a posledično i inficiranje pasa najvećim brojem parazita. Inficiranje većim brojem parazita dovodi do bržeg razvoja oboljenja, koje ne mora biti većeg inteziteta (Schetters i sar., 2009). Na osnovu ovoga može se zaključiti da je period inkubacije u sezoni Feb–Maj kraći, zbog čega bi od infekcije do odlaska veterinaru u ovoj sezoni prošao kraći vremenski period od onog u druge dve sezone. U druge dve sezone inicijalni broj parazita bio je manji, ali bi se moglo pretpostaviti da su zbog dužeg perioda inkubacije, paraziti imali više ciklusa umnožavanja. Ovo može biti jedno od objašnjenja zbog čega je broj parazita veći u ispitivanoj krvi pasa inficiranih u sezonama Jan–Feb i Okt–Dec od pasa inficiranih u sezoni Feb–Maj.

Aktivnost *D. reticulatus* najveća je u proleće, manja tokom jeseni, a najmanja zimi, dok leti u oblastima sa umereno kontinentalnom klimom gotovo da nema aktivnih vektora (Martinod i Gilot, 1991; Olivieri i sar., 2017). Zbog toga se može očekivati da će se psi u sezoni Jan–Feb inficirati najmanjom dozom parazita, koja bi uslovlila najduži period inkubacije. Ovo bi značilo dužu izloženost patogenu zbog čega bi se možda mogle očekivati promene na hepatocitima i žučnim kanalčićima ovih pasa, te i povećanje aktivnosti ALT i ALP u sezoni Jan–Feb.

Koncentracija SAA najveća je u sezoni Feb–Maj, a najniža u Jan–Feb sezoni. Veća koncentracija SAA ukazuje na veći stepen zapaljenja (Dąbrowski i sar., 2013), pa se može zaključiti da je zapaljenje najintenzivnije u sezoni Feb–Maj. SAA je brz, „glavni“ APP čiji poluživot iznosi 90 minuta (Tape i Kisilevsky, 1990), što znači da je za održavanje koncentracije potrebna njegova konstantna sinteza. Moguće je pretpostaviti da se pri dužoj inkubaciji odnos između sinteze i razgradnje SAA menja tako da se njegova ukupna koncentracija smanjuje, što je i vidljivo u sezoni Jan–Feb.

Rezultati koncentracije fibrinogena pokazuju razliku između sezone Feb–Maj, kada je ona najmanja, i sezone Okt–Dec, kada je najveća. Jedno od mogućih objašnjenja je brz početak oboljenja u sezoni Feb–Maj. Kako je fibrinogen „umeren“, spor APP koji najveću koncentraciju dostiže četvrtog dana nakon primene stimulusa (Colley i sar., 1983), u sezoni Feb–Maj njegova koncentracija tek je u fazi rasta, dok je u sezoni Okt–Dec dostigla vrhunac. Ukoliko se pretpostavi da je u sezoni Jan–Feb najduži period inkubacije, u trenutku uzimanja krvi za analizu koncentracija fibrinogena najverovatnije već počinje da opada. Razlog tome može biti poluživot fibrinogena od četiri dana (Kamath i Lip, 2003). Drugo moguće objašnjenje je povećana potrošnja fibrinogena u sezoni Feb–Maj. Sve navedene mogućnosti otvaraju dalja polja istraživanja koja treba da obezbede sveobuhvatnu sliku o promenama u organizmu koje nastaju kao posledica infekcije pasa *B. canis*.

Veća koncentracija ukupnih proteina u sezoni Jan–Feb od sezone Feb–Maj može se objasniti „kompenzatornom hipotenzijom“ u sezoni Feb–Maj, koja dovodi do hemodilucije, a primećena je tokom eksperimentalne infekcije pasa *B. canis*, u ranim fazama oboljenja (Schetters i sar., 2009). Ovo takođe ukazuje na kraći period inkubacije u sezoni Feb–Maj.

Koncentracija albumina u cirkulaciji rezultat je sinteze, razgradnje i njegove distribucije u tkivima. Smatra se da osim dehidracije ne postoji stanje koje se karakteriše hiperalbuminemijom (Levitt i Levitt, 2016). Hiperalbuminemija koja je bila prisutna u

sezonomama Jan–Feb i Okt–Dec, može biti posledica dehidracije pasa. U sezoni Feb–Maj, koncentracija albumina, ali i kreatinina, niža je nego u druge dve sezone. Zbog toga se može smatrati da je u toj sezoni došlo do hemodilucije koja je povezana sa ranim fazama nastanka bolesti, odnosno i ovi parametri, analogno manjoj koncentraciji ukupnih proteina, najverovatnije ukazuju na kraću inkubaciju i akutniji tok bolesti u sezoni Feb–Maj. Osim toga, regresionom analizom je pokazano da je niska koncentracija albumina nezavisno povezana sa sezonom Feb–Maj.

Koncentracija kreatinina manja je u sezoni Feb–Maj nego u druge dve sezone. Kao što je već navedeno, jedno od mogućih objašnjenja je pad koncentracije u ovoj sezoni zbog hemodilucije u ranoj fazi oboljenja. S druge strane, zbog eventualne dehidracije u Jan–Feb i Okt–Dec sezoni koja se vidi kroz hiperalbuminemiju, moguće je pretpostaviti da su nešto veće vrednosti kreatinina u tim sezonama takođe posledica dehidracije pacijenata.

Vrednosti MCHC pasa u svim sezonama, bile su iznad referentnih intervala ukazujući na određeni stepen hemolize koja najverovatnije nastaje tokom samog procesa vađenja krvi. Naime, ako se pretpostavi da je zbog prisustva intraeritrocitnih parazita i aktivacije sistema komplementa, osmotska rezistencija eritrocita narušena, može se takođe smatrati da prilikom vađenja krvi dolazi do izvesnog stepena hemolize. U sezoni Okt–Dec su vrednosti MCHC najmanje i razlikovale su se od druge dve sezone. Ista razlika primećena je za aktivnost amilaze. Može se pretpostaviti da veća aktivnost amilaze ukazuje na blaži poremećaj funkcije pankreasa ili bubrega, a disfunkcija oba organa može takođe doprineti smanjenoj osmotskoj rezistenciji eritrocita. Čest nalaz u svim sezonama bila je anemija, a najdramatičnije su bili pogođeni trombociti. Samo jedan pas imao je broj trombocita u okviru referentnih intervala, dok su svi ostali bili trombocitopenični.

Eozinopenija, sa pojavom u 86 % slučajeva, izdvaja se kao najčešća promena u beloj krvnoj slici. Već je zabeležena kod pasa inficiranih *B. canis* (Camacho, 2005) kao i *B. rossi* (Scheepers i sar., 2011). Autori su kao moguć uzrok njenom nastanku naveli endogeno oslobađanje kortikosteroida -stresni leukogram (Scheepers i sar., 2011). Može se očekivati da će se stres javiti kod svih obolelih pasa, nevezano sa sezonom, što može biti objašnjenje za ujednačenu pojavu eozinopenije u svim sezonama. Limfopenija koja je takođe karakteristika stresnog leukograma javila se kod 57 % pasa, dok je kod ostalih u većini slučajeva bila blizu donje granice referentnog intervala. Stresni leukogram karakteriše se povećanom koncentracijom cirkulišućih neutrofila i ukupnih leukocita. Međutim, babezioza pasa dovodi do neutropenije i leukopenije (Solano-Gallego i sar., 2016). Razlike u njihovoj zastupljenosti po sezonama nije bilo.

Tokom infekcije, koncentracija gvožđa kao negativnog akutno faznog reaktanta trebalo bi da bude smanjena. Međutim, u sezonama Jan–Feb i Okt–Dec ona je iznad referentnih intervala, dok je kod većine pasa u sezoni Feb–Maj u okviru referentnih intervala. Već je objašnjeno da je visoka koncentracija gvožđa možda posledica eksporta ovog elementa van ćelija, u sklopu zaštitnog mehanizma od intracelularnih patogena (Ross, 2017). U sezoni Feb–Maj, koncentracija Fe niža je nego u druge dve sezone što može biti posledica većeg intenziteta inflamacije u ovoj sezoni. S druge strane, ukoliko je u istoj sezoni period inkubacije kraći, a

bolest akutnija, moguće je da eksport gvožđa nije dostigao svoj maksimum. Moguća je i kombinacija ova dva mehanizma.

Nivo CER je u svim sezonama bio iznad, dok je aktivnost PON1 bila ispod granica referentnog intervala. To je u saglasnosti sa činjenicom da je CER pozitivan, a PON1 negativan APP (Jain i sar., 2011). Ipak, kada se njihove vrednosti uporede između sezona, one nisu pokazivale razliku. Međutim, za poređenje stepena zapaljenja ili povrede tkiva, pojedinačni akutno fazni proteini i reaktanti nekada nisu dovoljno osetljivi. To se može objasniti činjenicom da se u uslovima prirodnih infekcija, u opservacionoj studiji preseka, dešava da pojedine životinje budu pregledane u samom početku bolesti, dok druge budu pregledane tek posle nekoliko dana od pojave kliničkih znakova bolesti. Zbog toga se odnos koncentracija brzih i sporih APP i reaktanata može razlikovati kod pojedinih životinja. Da bi se na neki način povećala osetljivost određivanja stepena inflamacije, grupa istraživača sa različitih institucija je predložila korišćenje indeksa reaktanata akutne faze (IRAF) koji bi se dobili kombinovanjem brzih i sporih, pozitivnih i negativnih akutno faznih proteina/reaktanata (Gruys i sar., 2006; Toussaint i sar., 1995). Oba IRAF u ovom istraživanju pokazala su postojanje intenzivnijeg zapaljenskog odgovora u sezoni Feb–Maj. Logističkom regresijom ova dva IRAF pokazano je da je verovatnoća pojave veće vrednosti IRAF u sezoni Feb–Maj bila više desetina puta veća (25 i 59 puta) u odnosu na druge dve sezone.

6.4. Promene hematoloških i biohemijskih parametara kod pasa prirodno inficiranih *B. canis* vezane za rasu, pol i starost

Istraživanja na psima obolelim od babezioze pokazuju da je lošija prognoza povezana sa većim brojem mladih neutrofila (Celliers i sar., 2020) i hipoglikemijom (Jacobson i Lobetti, 2005). Rezultati ovog istraživanja koji pokazuju da rasni psi u poređenju sa mešancima imaju veći broj mladih neutrofila i nižu koncentraciju glukoze i prethodna zapažanja drugih autora, bude sumnju da se babezioza kod rasnih pasa razvija u težem obliku.

Takođe, rezultati ove disertacije ukazuju i na moguć uticaj pola na težinu bolesti. Može se pretpostaviti da je kod mužjaka veći stepen hemolize usled prisustva parazita *B. canis* u eritrocitima, o čemu bi svedočile veće vrednosti MCHC u odnosu na ženke. Takođe, veće vrednosti MCHC, zajedno sa nižim vrednostima MCV kod mužjaka, mogle bi ukazati da je kod njih, odgovor koštane srži na hipoksiju koja nastaje kao posledica anemije lošiji nego kod ženki. Pored toga, veća aktivnost ALP kod mužjaka može ukazati da su i stres odnosno holestaza (eClinPath, 2021), izraženiji nego kod ženki. Kod asimptomatskih slučajeva broj neutrofila nalazi se u okviru referentnih intervala (Milanović i sar., 2020) dok je kod akutne babezioze smanjen (Zygner i sar., 2007). Ova razlika može ukazati na blaži oblik oboljenja kod ženki koje imaju veći broj neutrofila.

Mladi psi fiziološki imaju niže vrednosti RBC, HCT i HGB koje počinju sa rastom od drugog meseca i dostižu maksimalne vrednost između 12 i 24 meseca (Harper i sar., 2003). To bi delimično moglo objasniti pozitivnu korelaciju ovih parametara sa starošću, međutim, čak 40 % pasa bilo je starije od dve godine. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da je kod mlađih pasa prisutan veći broj parazita a anemija izraženija, što može biti posledica većeg obima hemolize. Kako se broj leukocita kod asimptomatskih pasa obolelih od babezioze približava gornjoj

granici referentnog intervala (Milanović i sar., 2020), a klinički slučajevi razvijaju leukopeniju (Solano-Gallego i sar., 2016), može se zaključiti da se kod mlađih pasa, koji imaju manji broj leukocita, razvija teži oblik oboljenja. Koncentracija glukoze bila je veća kod mlađih pasa za koje se može pretpostaviti da su osjetljiviji na stres. Taj nalaz se može delimično objasniti činjenicom da je glukoza kod mlađih životinja viša i da se fiziološki smanjuje do devetog meseca života (Wolfordd i sar., 1988). Ipak, nalaz je u suprotnosti sa literaturnim podacima koji govore da se nakon stresa kod starijih pasa oslobodi veća količina kortizola i posledično poveća glukoneogeneza (Reul i sar., 1991). Autori izveštavaju da se koncentracija ukupnih proteina i globulina povećava sa starošću pasa (Lowseth i sar., 1990), što može doprineti smanjenju Alb/Glob količnika kod starijih životinja. Kod mlađih pasa niža je aktivnost lipaze, do čijeg smanjenja dolazi kod APR (Feingold i sar., 1999).

Rezultati koji se odnose na parametre sa kojima korelira nivo parazitemije mogu ukazati na značajne patofiziološke interakcije tokom babezioze. Recipročna korelacija sa starošću obolelog psa mogla bi ukazati da imunološki mehanizmi starijih pasa mnogo efikasnije eliminišu parazite od imunoloških mehanizama mlađih pasa. Povezanost nižeg broja leukocita odnosno limfocita sa višim nivoom parazitemije može dodatno ilustrovati značaj celularnih imunoloških mehanizama u eliminaciji parazita (Solano-Gallego i sar., 2016). Takođe, na značaj endotelne disfunkcije u akutnoj babeziozi pasa može ukazati pozitivna korelacija nivoa parazitemije i aktivnosti AST, jednog od pokazatelja poremećaja funkcije endotela (Goncharov i sar., 2017). Vrlo se interesantnom čini i pozitivna međuzavisnost parazitemije i nivoa gvožđa u serumu. Naime, budući da gvožđe predstavlja intraeritrocitni faktor rasta za *B. canis*, čini se mogućim pretpostaviti da što je veća parazitemija to su intenzivniji mehanizmi kojima se gvožđe transportuje iz eritrocita u plazmu, kako bi se usporilo razmnožavanje *B. canis* (Beletić i sar., 2021). Takođe, korelacije koje se ne mogu objasniti trenutno dostupnim literaturnim izvorima (npr. recipročna međuzavisnost sa aktivnošću GGT, odnosno direktna sa koncentracijom fosfata i holesterola) predstavljaju pažnje vrednu osnovu za dalje studije o metabličkim interakcijama parazita i domaćina tokom akutne babezioze pasa.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Na osnovu broja slučajeva akutne babezioze kod pasa na teritoriji grada Beograda može se izvesti podela kalendarske godine na četiri sezone: januar–februar (prva polovina), februar (druga polovina)–maj, jun–septembar i oktobar–decembar. Najveći broj slučajeva se javlja tokom kasne zime i proleća i tokom jeseni, te se može zaključiti da je distribucija pojave ovog oboljenja bimodalna.
2. Kombinacija temperature i relativne vlažnosti koja odgovara pojavi babezioze u pojedinim sezonama je sledeća: januar–februar kombinacija temperature između -4°C i $6,5^{\circ}\text{C}$ i relativne vlažnosti (68–87) %; februar–maj, temperatura ($3-16^{\circ}\text{C}$) pri relativnoj vlažnosti (53–87) %; jun–septembar, temperatura ($15-25^{\circ}\text{C}$) pri relativnoj vlažnosti (55–77) %; oktobar–decembar, temperatura ($2-18^{\circ}\text{C}$) pri relativnoj vlažnosti (62–90) %.
3. Na pojavu oboljenja u sezoni sa najvećim brojem slučajeva, februar–maj, temperatura i relativna vlažnost vazduha u godini koja je prethodila pojavi oboljenja, pokazuju dugoročni uticaj. Smanjenje temperature tokom četiri nedelje pre nastanka oboljenja značajno korelira sa povećanjem broja slučajeva. Povećanje temperature i smanjenje relativne vlažnosti vazduha tokom prethodne zime i jeseni (16–30. nedelja pre nastanka oboljenja), povezano je sa pojavom većeg broja slučajeva. Smanjenje temperature krajem proleća i početkom leta prethodne godine (40–50. nedelja pre nastanka oboljenja) kao i povećanje relativne vlažnosti vazduha (44. i 45. nedelja pre oboljenja) takođe korelira sa povećanjem broja slučajeva.
4. Klinički slučajevi infekcije pasa *B. canis* ispitani su u sezonama januar–februar, februar–maj i oktobar–decembar. Odnos broja pasa sa i bez SIRS-a, kao i odnos seroreaktivnih i seronegativnih pasa nije se razlikovao između sezona. Parazitemija je bila najniža u sezoni februar–maj.
5. Više vrednosti indeksa reaktanata akutne faze ukazuju na jači inflamatorni odgovor u sezoni februar–maj u odnosu na druge dve sezone.
6. Promene u koncentracijama albumina i kreatinina ukazuju da ukoliko se akutna infekcija *B. canis* javlja u sezoni februar–maj, patogenezu karakteriše hemodilucija, dok druge dve sezone karakteriše dehidracija.
7. Kombinacija visokih vrednosti indeksa reaktanata akutne faze i hemodilucije u sezoni februar–maj ukazuje da se bolest razvija brže u odnosu na druge dve sezone.

LITERATURA

1. Abdalla, H., Hussein, H., Kreier, J., 1978. *Babesia rodhaini*: passive protection of mice with immune serum. *Tropenmedizin und Parasitologie* 29, 295-306.
2. Aird, W., 2003. The hematologic system as a marker of organ dysfunction in sepsis. *Mayo Clinic proceedings* 78, 869-881.
3. Aldo-Benson, M., Benson, M., 1982. SAA suppression of immune response *in vitro*: evidence for an effect on T cell-macrophage interaction. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 128, 2390-2392.
4. Aldred, A., Grimes, A., Schreiber, G., Mercer, J., 1987. Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. *The Journal of biological chemistry* 262, 2875-2878.
5. Aldridge, W., 1953. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *The Biochemical journal* 53, 117-124.
6. Angele, M., Pratschke, S., Hubbard, W., Chaudry, I., 2014. Gender differences in sepsis: cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* 5, 12-19.
7. Ansar, W., Ghosh, S., 2016. Acute-Phase Proteins and Responses and Their Application in Clinical Chemistry. *Biology of C Reactive Protein in Health and Disease*, 45-65 .
8. Arnal, M., Obled, C., Attaix, D., Patureau-Mirand, P., Bonin, D., 1987. Dietary control of protein turnover. *Diabete & metabolisme* 13, 630-642.
9. Arthur, D., 1960. Ticks. A monograph of the Ixodoidea. Part 5. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus*, and *Margaropus*. , Vol. 132. Cambridge University Press, New York, 251.
10. Ather, J., Ckless, K., Martin, R., Foley, K., Suratt, B., Boyson, J., Fitzgerald, K., Flavell, R., Eisenbarth, S., Poynter, M., 2011. Serum amyloid A activates the NLRP3 inflammasome and promotes Th17 allergic asthma in mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 187, 64-73.
11. Aviram, M., 2004. Introduction to the Serial Review on Paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free radical biology & medicine* 37, 1301-1303.
12. Badolato, R., Oppenheim, J., 1996. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism* 26, 526-538.
13. Badolato, R., Wang, J., Murphy, W., Lloyd, A., Michiel, D., Bausserman, L., Kelvin, D., Oppenheim, J., 1994. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine* 180, 203-209.
14. Bajer, A., Rodo, A., Bednarska, M., Mierzejewska, E., Welc-Faleciak, R., 2013. *Babesia canis* and tick-borne encephalitis virus (TBEV) co-infection in a sled dog. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 20, 426-430.
15. Balashov, Y., 1972. Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) - Vectors of Diseases of Man and Animals. *Entomological Society of America*, 163-376.

16. Ballmer, P., McNurlan, M., Hulter, H., Anderson, S., Garlick, P., Krapf, R., 1995. Chronic metabolic acidosis decreases albumin synthesis and induces negative nitrogen balance in humans. *Journal of Clinical Investigation* 95, 39-45.
17. Baneth, G., 2018. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Veterinary Parasitology* 254, 58-63.
18. Banks, W., Kastin, A., Broadwell, R., 1995. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2, 241-248.
19. Barle, H., Hammarqvist, F., Westman, B., Klaude, M., Rooyackers, O., Garlick, P., Wernerman, J., 2006. Synthesis rates of total liver protein and albumin are both increased in patients with an acute inflammatory response. *Clinical science (London, England : 1979)* 110, 93-99.
20. Barle, H., Nyberg, B., Essen, P., Andersson, K., McNurlan, M., Wernerman, J., Garlick, P., 1997. The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously *in vivo* in humans. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 25, 154-158.
21. Bartnikas, T., Gitlin, J., 2001. How to make a metalloprotein. *Nature structural biology* 8, 733-734.
22. Bartosik, K., Wiśniowski, L., Buczek, A., 2011. Abundance and seasonal activity of adult *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in eastern Poland in relation to meteorological conditions and the photoperiod. *Annals of agricultural and environmental medicine* 18, 340-344.
23. Baumann, H., Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunology today* 15, 74-80.
24. Baybutt, H., Holsboer, F., 1990. Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology* 127, 476-480.
25. Beck, R., Vojta, L., Mrljak, V., Marinculić, A., Beck, A., Živičnjak, T., Cacciò, S.M., 2009. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology* 39, 843-848.
26. Beletić, A., Janjić, F., Radaković, M., Spariosu, K., Francuski Andrić, J., Chandrashekar, R., Tyrrell, P., Radonjić, V., Balint, B., Ajtić, J., Kovačević Filipović, M., 2021. Systemic inflammatory response syndrome in dogs naturally infected with *Babesia canis*: Association with parasite load and host factors. *Veterinary parasitology* 291, 109366.
27. Belozеров, V., 1982. Diapause and Biological Rhythms in Ticks, In: Obenchain, F.D., Galun, R. (Eds.) *Physiology of Ticks*. Pergamon, pp. 469-500.
28. Belozеров, V., 2009. Diapause and quiescence as two main kinds of dormancy and their significance in life cycles of mites and ticks (Chelicerata: Arachnida: Acari). Part 2. Parasitiformes. *Acarina* 17, 3-32.
29. Belozеров, V., Fourie, L., Kok, D., 2002. Photoperiodic Control of Developmental Diapause in Nymphs of Prostriate Ixodid Ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology* 28, 163-168.
30. Benditt, E., Eriksen, N., 1971. Chemical classes of amyloid substance. *The American Journal of Pathology* 65, 231-252.
31. Benditt, E., Meek, R., 1989. Expression of the third member of the serum amyloid A gene family in mouse adipocytes. *The Journal of experimental medicine* 169, 1841-1846.

32. Bernard, G., Vincent, J., Laterre, P., LaRosa, S., Dhainaut, J., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J., Garber, G., Helterbrand, J., Ely, E., Fisher Jr., C., 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England journal of medicine* 344, 699-709.
33. Berrougui, H., Loued, S., Khalil, A., 2012. Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free radical biology & medicine* 52, 1372-1381.
34. Beugnet, F., Moreau, Y., 2015. Babesiosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 34, 627-639.
35. Bilić, P., Kuleš, J., Barić Rafaj, R., Mrljak, V., 2018. Canine Babesiosis: Where Do We Stand? *Acta Veterinaria-Beograd* 68, 127-160.
36. Birkenheuer, A., Levy, M., Breitschwerdt, E., 2003. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *Journal of clinical microbiology* 41, 4172-4177.
37. Blackburn Jr., W., 1994. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. *The Journal of rheumatology. Supplement* 42, 9-13.
38. Blatter, M., James, R., Messmer, S., Barja, F., Pometta, D., 1993. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *European journal of biochemistry* 211, 871-879.
39. Böhm, M., Leisewitz, A., Thompson, P., Schoeman, J., 2006. Capillary and venous *Babesia canis rossi* parasitaemias and their association with outcome of infection and circulatory compromise. *Veterinary Parasitology* 141, 18-29.
40. Bojic, S., Kotur-Stevuljevic, J., 2014. Low paraoxonase 1 activity predicts mortality in surgical patients with sepsis. *Disease markers*, 2014:427378.
41. Bone, R., Balk, R., Cerra, F., Dellinger, R., Fein, A., Knaus, W., Schein, R., Sibbald, W., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.
42. Bottari, N., Crivellenti, L., Borin-Crivellenti, S., Oliveira, J., Coelho, S., Contin, C., Tatsch, E., Moresco, R., Santana, A., Tonin, A., Tinucci-Costa, M., Da Silva, A., 2016. Iron metabolism and oxidative profile of dogs naturally infected by *Ehrlichia canis*: Acute and subclinical disease. *Microbial pathogenesis* 92, 26-29.
43. Bourdoiseau, G., 2006. Canine babesiosis in France. *Veterinary Parasitology* 138, 118-125.
44. Bourin, M., Lindahl, U., 1993. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *The Biochemical journal* 289 (Pt 2), 313-330.
45. Brown, J., 1976. Structural origins of mammalian albumin. *Federation proceedings* 35, 2141-2144.
46. Broze Jr., G., 1995. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annual review of medicine* 46, 103-112.

47. Buczek, A., Bartosik, K., Zając, Z., 2014. Changes in the activity of adult stages of *Dermacentor reticulatus* (Ixodida: Amblyommidae) induced by weather factors in eastern Poland. *Parasites & vectors* 7, 245.
48. Bullová, E., Lukáš, M., Stanko, M., Peřko, B., 2009. Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. *Veterinary Parasitology* 165, 357-360.
49. Burstein, S., 1997. Cytokines, platelet production and hemostasis. *Platelets* 8, 93-104.
50. Calabrese, L., Carbonaro, M., Musci, G., 1989. Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen. *The Journal of biological chemistry* 264, 6183-6187.
51. Camacho, A., 2005. Do eosinophils have a role in the severity of *Babesia annae* infection? *Veterinary Parasitology* 134, 281-282.
52. Castell, J., Gomez-Lechon, M., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P., 1989. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS letters* 242, 237-239.
53. Cecilian, F., Giordano, A., Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters* 9, 211-223.
54. Celliers, A., Rautenbach, Y., Hooijberg, E., Christopher, M., Goddard, A., 2020. Neutrophil Myeloperoxidase Index in Dogs With Babesiosis Caused by *Babesia rossi*. *Frontiers in veterinary science* 7, 72.
55. Ceron, J., Tecles, F., Tvarijonavičiute, A., 2014. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC veterinary research* 10, 74.
56. Cerón, J., Eckersall, D., Martynez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary clinical pathology* 34, 85-99.
57. Cerón, J., Martinez-Subiela, S., 2004. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Veterinary research* 35, 671-679.
58. Cerra, F., 1985. The systemic septic response: multiple systems organ failure. *Critical care clinics* 1, 591-607.
59. Chapman, A., Mocatta, T., Shiva, S., Seidel, A., Chen, B., Khalilova, I., Paumann-Page, M., Jameson, G., Winterbourn, C., Kettle, A., 2013. Ceruloplasmin is an endogenous inhibitor of myeloperoxidase. *The Journal of biological chemistry* 288, 6465-6477.
60. Chapman, W., Ward, P., 1977. *Babesia rodhaini*: requirement of complement for penetration of human erythrocytes. *Science* 196, 67-70.
61. Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L., 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary research* 40, 37.
62. Cheng, N., He, R., Tian, J., Ye, P., Ye, R., 2008. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 181, 22-26.
63. Chiarla, C., Giovannini, I., Siegel, J., 2008. Patterns of correlation of plasma ceruloplasmin in sepsis. *The Journal of surgical research* 144, 107-110.
64. Chrousos, G., 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England journal of medicine* 332, 1351-1362.

65. Chung, H., Lee, J., Jo, Y., Hwang, J., Kim, J., 2019. Circulating Monocyte Counts and its Impact on Outcomes in Patients With Severe Sepsis Including Septic Shock. *Shock* 51, 423-429.
66. Colley, C., Fleck, A., Goode, A., Muller, B., Myers, M., 1983. Early time course of the acute phase protein response in man. *Journal of clinical pathology* 36, 203-207.
67. Conner, G., Eckersall, D., Ferguson, J., Douglas, A., 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in veterinary science* 45, 107-110.
68. Cornillot, E., Hadj-Kaddour, K., Dassouli, A., Noel, B., Ranwez, V., Vacherie, B., Augagneur, Y., Brès, V., Duclos, A., Randazzo, S., Carcy, B., Debierre-Grockiego, F., Delbecq, S., Moubri-Ménage, K., Shams-Eldin, H., Usmani-Brown, S., Bringaud, F., Wincker, P., Vivarès, C., Schwarz, R., Schetters, T., Krause, P., Gorenflot, A., Berry, V., Barbe, V., Ben Mamoun, C., 2012. Sequencing of the smallest Apicomplexan genome from the human pathogen *Babesia microti*. *Nucleic acids research* 40, 9102-9114.
69. Cray, C., Zaias, J., Altman, N.H., 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comparative medicine* 59, 517-526
70. Creamer, B., 1967. The turnover of the epithelium of the small intestine. *British medical bulletin* 23, 226-230.
71. Cronin, S., Woolf, C., Weiss, G., Penninger, J., 2019. The Role of Iron Regulation in Immunometabolism and Immune-Related Disease. *Frontiers in molecular biosciences* 6, 116.
72. Dabrowski, R., Kostro, K., Szczubial, M., 2013. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. *Theriogenology* 80, 494-497.
73. Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors* 3, 26.
74. Dantoine, T., Debord, J., Charmes, J., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., Leroux-Robert, C., 1998. Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 9, 2082-2088
75. Darshan, D., Wilkins, S., Frazer, D., Anderson, G., 2011. Reduced expression of ferroportin-1 mediates hyporesponsiveness of suckling rats to stimuli that reduce iron absorption. *Gastroenterology* 141, 300-309.
76. Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Frfr. V. Schenck, E., 2006. Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *International journal of medical microbiology : IJMM* 296 Suppl 40, 149-156.
77. Davitkov, D., Vucicevic, M., Stevanovic, J., Krstic, V., Tomanovic, S., Glavinic, U., Stanimirovic, Z., 2015. Clinical babesiosis and molecular identification of *Babesia canis* and *Babesia gibsoni* infections in dogs from Serbia. *Acta veterinaria Hungarica* 63, 199-208.
78. De Buck, M., Gouwy, M., Wang, J., Van Snick, J., Proost, P., Struyf, S., Van Damme, J., 2016. The cytokine-serum amyloid A-chemokine network. *Cytokine & growth factor reviews* 30, 55-69.

79. De Domenico, I., Ward, D., di Patti, M., Jeong, S., David, S., Musci, G., Kaplan, J., 2007. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *The EMBO journal* 26, 2823-2831.
80. De Feo, P., Gaisano, M., Haymond, M., 1991. Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. *The Journal of clinical investigation* 88, 833-840.
81. Deakin, S., James, R., 2004. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical science (London, England : 1979)* 107, 435-447.
82. DeClue, A., 2017. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 8th ed. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA, 1492-1504.
83. Dinarello, C., 1983. Pathogenesis of fever during hemodialysis. *Contributions to nephrology* 36, 90-99.
84. Dinarello, C., 1989. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Advances in immunology* 44, 153-205.
85. Dinarello, C., 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. *The Journal of infectious diseases* 179, 294-304.
86. Dixon, F., Maurer, P., Deichmiller, M., 1953. Half-lives of homologous serum albumins in several species. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 83, 287-288.
87. Dobryszczyka, W., 1997. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 35, 647-654.
88. Dodson, C., Rengarajan, K., Gewant, H., Stodulkova, E., Nguyen, H., Boatright, J., Nickerson, J., 2001. Extra-hepatic expression of serum albumin mRNA in mouse retina. *Current eye research* 22, 182-189.
89. Draganov, D., La Du, B., 2004. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369, 78-88.
90. Draganov, D., Teiber, J., Watson, C., Bisgaier, C., Nemzek, J., Remick, D., Standiford, T., La Du, B., 2010. PON1 and oxidative stress in human sepsis and an animal model of sepsis. *Advances in experimental medicine and biology* 660, 89-97.
91. Ebersole, J., Cappelli, D., 2000. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology* 2000 23, 19-49.
92. Echaide, I., Hines, S., McElwain, T., Suarez, C., McGuire, T., Palmer, G., 1998. *In Vivo* Binding of Immunoglobulin M to the Surfaces of *Babesia bigemina* - Infected Erythrocytes. *Infection and Immunity* 66, 2922-2927.
93. Eckersall, D., Young, F., McComb, C., Hogarth, C., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A., Fitzpatrick, J., 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *The Veterinary record* 148, 35-41.
94. eClinPath, 2021. A Resource for Veterinary Clinical Pathology. (pristupljeno 28.01.2021.) <https://eclinpath.com/chemistry/liver/cholestasis/alkaline-phosphatase/>.

95. Essen, P., McNurlan, M., Gamrin, L., Hunter, K., Calder, G., Garlick, P., Wernerman, J., 1998. Tissue protein synthesis rates in critically ill patients. *Critical care medicine* 26, 92-100.
96. Estrada-Peña, A., 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 34, 53-65.
97. Estrada-Peña, A., Ayllón, N., de la Fuente, J., 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in physiology* 3, 64-64.
98. Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., Ascenzi, P., 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB life* 57, 787-796.
99. Feingold, K., Memon, R., Moser, A., Grunfeld, C., 1998. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 139, 307-315.
100. Feingold, K., Memon, R., Moser, A., Shigenaga, J., Grunfeld, C., 1999. Endotoxin and interleukin-1 decrease hepatic lipase mRNA levels. *Atherosclerosis* 142, 379-387.
101. Feldman, B., Kaneko, J., Farver, T., 1981. Anemia of inflammatory disease in the dog: ferrokinetics of adjuvant-induced anemia. *American journal of veterinary research* 42, 583-585.
102. Finberg, K., 2011. Unraveling mechanisms regulating systemic iron homeostasis. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2011, 532-537.
103. Fleck, A., Raines, G., Hawker, F., Trotter, J., Wallace, P., Ledingham, I., Calman, K., 1985. Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. *Lancet (London, England)* 1, 781-784.
104. Fleming, R., Gitlin, J., 1990. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development. *The Journal of biological chemistry* 265, 7701-7707.
105. Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., Sprong, H., 2016. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & vectors* 9, 314.
106. Fortna, R., Watson, H., Nyquist, S., 1999. Glycosyl Phosphatidylinositol-Anchored Ceruloplasmin Is Expressed by Rat Sertoli Cells and Is Concentrated in Detergent-Insoluble Membrane Fractions1. *Biology of Reproduction* 61, 1042-1049.
107. Fournier, T., Medjoubi, N., Porquet, D., 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et biophysica acta* 1482, 157-171.
108. Fox, P., Mazumder, B., Ehrenwald, E., Mukhopadhyay, C., 2000. Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine* 28, 1735-1744.
109. Franco, A., Sandri, S., Campa, A., 2011. High-density lipoprotein prevents SAA-induced production of TNF- α in THP-1 monocytic cells and peripheral blood mononuclear cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 986-992.
110. Fuhrman, B., Volkova, N., Aviram, M., 2005. Paraoxonase 1 (PON1) is present in postprandial chylomicrons. *Atherosclerosis* 180, 55-61.
111. Fujisaki, K., Kitaoka, S., Morii, T., 1973. Effect of photoperiod on the ovipositional patterns of *Haemophysalis longicornis* and *Ixodes persulcatus* (Ixodoidea: Ixodidae). *National Institute of Animal Health quarterly* 13, 8-13.

112. Funk, D., Parrillo, J., Kumar, A., 2009. Sepsis and septic shock: a history. *Critical care clinics* 25, 83-101.
113. Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine* 340, 448-454.
114. Gabrielli, S., Otašević, S., Ignjatović, A., Savić, S., Fraulo, M., Arsić-Arsenijević, V., Momčilović, S., Cancrini, G., 2015. Canine Babesioses in Noninvestigated Areas of Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15, 535-538.
115. Ganz, T., 2005. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell metabolism* 1, 155-157.
116. Ganz, T., Nemeth, E., 2012. Heparin and iron homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 1434-1443.
117. Garnet, B., Aldana-Campos, M., Shah, V., Elballat, M., Shah, A., Donath, E., Fahmy, S., 2016. Increased Risk of Mortality With Hypoalbuminemia and Albumin Transfusion in Patients With Septic Shock in a Single Institution. *Chest* 150, 367.
118. Gatt, M., Urieli-Shoval, S., Preciado-Patt, L., Fridkin, M., Calco, S., Azar, Y., Matzner, Y., 1998. Effect of serum amyloid A on selected *in vitro* functions of isolated human neutrophils. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 132, 414-420.
119. Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schomig, A., Neumann, F., 2000. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148, 75-85.
120. Geissler, C., Singh, M., 2011. Iron, meat and health. *Nutrients* 3, 283-316.
121. Goddard, A., Leisewitz, A., Kjølgaard-Hansen, M., Kristensen, A., Schoeman, J., 2016. Excessive Pro-Inflammatory Serum Cytokine Concentrations in Virulent Canine Babesiosis. *PloS one* 11, e0150113.
122. Goncharov, N., Nadeev, A., Jenkins, R., Avdonin, P., 2017. Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 9759735.
123. Gozzelino, R., Arosio, P., 2016. Iron Homeostasis in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 17, 130.
124. Gray, J., Kahl, O., Lane, R., Levin, M., Tsao, J., 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and tick-borne diseases* 7, 992-1003.
125. Green, R., Charlton, R., Seftel, H., Bothwell, T., Mayet, F., Adams, B., Finch, C., Layrisse, M., 1968. Body iron excretion in man: a collaborative study. *The American journal of medicine* 45, 336-353.
126. Griffiths, K., Pazderska, A., Ahmed, M., McGowan, A., 2017. Type 2 Diabetes in Young Females Results in Increased Serum Amyloid A and Changes to Features of High Density Lipoproteins in Both HDL2 and HDL3. *Journal of diabetes research* 2017:1314864.
127. Gruys, E., Obwolo, M., Toussaint, M., 1994. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *The Veterinary bulletin* 64:1009-1018.
128. Gruys, E., Toussaint, M., Niewold, T., Koopmans, S., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6, 1045-1056.

129. Gruys, E., Toussaint, M., Niewold, T., Koopmans, S., Van Dijk, E., Meloen, R., 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta histochemica* 108, 229-232.
130. Guyton, A., Lindsey, A., 1959. Effect of elevated left atrial pressure and decreased plasma protein concentration on the development of pulmonary edema. *Circulation research* 7, 649-657.
131. Han, C., Chiba, T., Campbell, J., Fausto, N., Chaisson, M., Orasanu, G., Plutzky, J., Chait, A., 2006. Reciprocal and coordinate regulation of serum amyloid A versus apolipoprotein A-I and paraoxonase-1 by inflammation in murine hepatocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1806-1813.
132. Hari-Dass, R., Shah, C., Meyer, D., Raynes, J., 2005. Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *The Journal of biological chemistry* 280, 18562-18567.
133. Harper, E., Hackett, R., Wilkinson, J., Heaton, P., 2003. Age-related variations in hematologic and plasma biochemical test results in Beagles and Labrador Retrievers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 1436-1442.
134. Heegaard, P., Godson, D., Toussaint, M., Tjørnehoj, K., Larsen, L., Viuff, B., Ronsholt, L., 2000. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary immunology and immunopathology* 77, 151-159.
135. Heinrich, P., Castell, J., Andus, T., 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* 265, 621-636.
136. Homer, M., Aguilar-Delfin, I., Telford 3rd, S., Krause, P., Persing, D., 2000. Babesiosis. *Clinical microbiology reviews* 13, 451-469.
137. Horadagoda, N., Knox, K., Gibbs, H., Reid, S., Horadagoda, A., Edwards, S., Eckersall, D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *The Veterinary record* 144, 437-441.
138. Hornok, S., Farkas, R., 2009. Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. *Medical and veterinary entomology* 23, 41-46.
139. Hornok, S., Tánčzos, B., Fernández de Mera, I., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., Farkas, R., 2013. High prevalence of *Hepatozoon*-infection among shepherd dogs in a region considered to be free of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* 196, 189-193.
140. Hou, D., Zhu, R., Sun, Z., Ma, X., Wang, D., Timothy, H., Chen, W., Yan, F., Lei, P., Han, X., Chen, D., Cai, L., Guan, H., 2016. Serum Proteomics Analysis in Rats of Immunosuppression Induced by Chronic Stress. *Scandinavian journal of immunology* 84, 165-173.
141. Hoyer, R., Bennett, S., Geelhoed, G., Gorschboth, C., 1972. Fluid volume and albumin kinetics occurring with major surgery. *Jama* 222, 1255-1261.
142. Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z., 2004. Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology* 28, 159-165.
143. Igarashi, I., Waki, S., Ito, Y., Omata, A., Suzuki, S., Suzuki, N., 1994. Role of CD41 T cells in the control of primary infection with *Babesia microti* in mice. *The Journal of protozoology research* 4:164-171.

144. IPCC, 2014. Climate Change 2014 Synthesis Report 2014. (pristupljeno 12.02.2021.) https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/SYR_AR5_FINAL_full.pdf.
145. Irwin, P., 2010. Canine babesiosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 40, 1141-1156.
146. Jabs, W., Logering, B., Gerke, P., Kreft, B., Wolber, E., Klinger, M., Fricke, L., Steinhoff, J., 2003. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation *in vivo*. *European journal of immunology* 33, 152-161.
147. Jacobson, L., Lobetti, R., 2005. Glucose, lactate, and pyruvate concentrations in dogs with babesiosis. *American journal of veterinary research* 66, 244-250.
148. Jain, S., Gautam, V., Naseem, S., 2011. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 3, 118-127.
149. Janjić, F., Milanović, Z., Ilić-Božović, A., Andrić, N., Spariosu, K., Ajtić, J., Beletić, A., Kovačević Filipović, M., 2020. Hematologic indices in clinically healthy outdoor dogs exposed to vector-borne pathogens. *Veterinarski glasnik* 74 (2), 178-186.
150. Janjić, F., Sarvan, D., Tomanović, S., Ćuk, J., Krstić, V., Radonjić, V., Filipović, M., Ajtic, J., 2019. A short-term and long-term relationship between occurrence of acute canine babesiosis and meteorological parameters in Belgrade, Serbia. *Ticks and tick-borne diseases* 10, 101273.
151. Jensen, L., Hiney, M., Shields, D., Uhlar, C., Lindsay, A., Whitehead, A., 1997. Acute phase proteins in salmonids: evolutionary analyses and acute phase response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 158, 384-392.
152. Johnson, R., 1997. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *Journal of animal science* 75, 1244-1255.
153. Joorgensen, K., Stoffersen, E., 1979. Heparin like activity of albumin. *Thrombosis research* 16, 569-574.
154. Joshi, P., 1998. Copper(II) as an efficient scavenger of singlet molecular oxygen. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 35, 208-215.
155. Kabyemela, E., Fried, M., Kurtis, J., Mutabingwa, T., Duffy, P., 2008. Decreased susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection in pregnant women with iron deficiency. *The Journal of infectious diseases* 198, 163-166.
156. Kajikawa, T., Furuta, A., Onishi, T., Tajima, T., Sugii, S., 1999. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Veterinary immunology and immunopathology* 68, 91-98.
157. Kamath, S., Lip, G., 2003. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 96, 711-729.
158. Karbowski, G., 2014. The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick – its expansion to new areas and possible causes. *Annals of parasitology* 60, 37-47.
159. Kernoff, L., Pimstone, B., Solomon, J., Brock, J., 1971. The effect of hypophysectomy and growth hormone replacement on albumin synthesis and catabolism in the rat. *The Biochemical journal* 124, 529-535.
160. King, V., Hatch, N., Chan, H., De Beer, M., De Beer, F., Tannock, L., 2010. A murine model of obesity with accelerated atherosclerosis. *Obesity (Silver Spring)* 18, 35-41.

161. Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A., Leidinger, E., 2012. In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere* 40, 87-94.
162. Kisilevsky, R., Manley, P., 2012. Acute-phase serum amyloid A: Perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 19, 5-14.
163. Kiszewski, A., Matuschka, F., Spielman, A., 2001. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annual review of entomology* 46, 167-182.
164. Kitagawa, S., Yuo, A., Yagisawa, M., Azuma, E., Yoshida, M., Furukawa, Y., Takahashi, M., Masuyama, J., Takaku, F., 1996. Activation of human monocyte functions by tumor necrosis factor: rapid priming for enhanced release of superoxide and erythrophagocytosis, but no direct triggering of superoxide release. *Experimental hematology* 24, 559-567.
165. Kleger, G., Turgay, M., Imoberdorf, R., McNurlan, M., Garlick, P., Ballmer, P., 2001. Acute metabolic acidosis decreases muscle protein synthesis but not albumin synthesis in humans. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 38, 1199-1207.
166. Klomp, L., Farhangrazi, Z., Dugan, L., Gitlin, J., 1996. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. *The Journal of clinical investigation* 98, 207-215.
167. Knolle, P., Lohr, H., Treichel, U., Dienes, H., Lohse, A., Schlaack, J., Gerken, G., 1995. Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 33, 613-620.
168. Knowles Jr., D., Kappmeyer, L., Perryman, L., 1994. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. *Infection and immunity* 62, 1909-1913.
169. Knutson, M., 2007. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism. *Nutrition reviews* 65, 335-340.
170. Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., Yilmaz, Z., 2010. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *The Journal of small animal practice* 51, 478-483.
171. Kocaturk, M., Tvarijonaviciute, A., Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Eralp, O., Yilmaz, Z., Ceron, J., 2015. Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice* 56, 119-124.
172. Kostro, K., Stojek, K., Grzybek, M., Tomczuk, K., 2015. Characteristics, immunological events, and diagnostics of *Babesia* spp. infection, with emphasis on *Babesia canis*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 59, 495-504.
173. Kotteck M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15:259–263
174. Kovačević Filipović, M., Beletić, A., Ilić Božović, A., Milanović, Z., Tyrrell, P., Buch, J., Breitschwerdt, E., Birkenheuer, A., Chandrashekar, R., 2018. Molecular and Serological Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *A. platys*, *Ehrlichia canis*, *E. chaffeenses*, *E. ewingii*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia canis*, *B. gibsoni* and *B. vogeli*

- among Clinically Healthy Outdoor Dogs in Serbia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 14, 117-122.
175. Kovačević Filipović, M., Ilić, V., Vujčić, Z., Dojnov, B., Stevanov Pavlović, M., Mijačević, Z., Božić, T., 2012. Serum amyloid A isoforms in serum and milk from cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 145, 120-128.
 176. Krause, A., Neitz, S., Magert, H., Schulz, A., Forssmann, W., Schulz-Knappe, P., Adermann, K., 2000. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS letters* 480, 147-150.
 177. Kuleš, J., De Torre, C., Rafaj, R., Gotić, J., Bilić, P., Ceron, J., Mrljak, V., 2016. Plasma biomarkers of SIRS and MODS associated with canine babesiosis. *Research in Veterinary Science* 105.
 178. Kuo, C., La Du, B., 1998. Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases. Structural stability and enzymatic activity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26, 653-660.
 179. Kushner, I., 1993. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspectives in biology and medicine* 36, 611-622.
 180. Ryde'n, L., 1984. Ceruloplasmin, in: R. Lontie (Ed.), *Copper Proteins and Copper Enzymes*, vol. 3,
 181. Lavie, M., Voisset, C., Vu-Dac, N., Zurawski, V., Duverlie, G., Wychowski, C., Dubuisson, J., 2006. Serum amyloid A has antiviral activity against hepatitis C virus by inhibiting virus entry in a cell culture system. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44, 1626-1634.
 182. Lee, H., Kim, M., Park, K., Shin, E., Jo, S., Kim, S., Jo, E., Lee, Y., Lee, C., Baek, S., Bae, Y., 2006. Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes. *Molecular pharmacology* 70, 241-248.
 183. Lee, P., Peng, H., Gelbart, T., Wang, L., Beutler, E., 2005. Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1906-1910.
 184. Leisewitz, A., Goddard, A., Clift, S., Thompson, P., Gier, J., Engelshoven, J., Schoeman, J., 2019a. A clinical and pathological description of 320 cases of naturally acquired *Babesia rossi* infection in dogs. *Veterinary Parasitology* 271.
 185. Leisewitz, A., Goddard, A., De Gier, J., Van Engelshoven, J., Clift, S., Thompson, P., Schoeman, J., 2019b. Disease severity and blood cytokine concentrations in dogs with natural *Babesia rossi* infection. *Parasite immunology* 41, e12630.
 186. Leschnik, M., Kirtz, G., Tichy, A., Leidinger, E., 2008. Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions. *International Journal of Medical Microbiology* 298, 243-248.
 187. Levi, M., Schultz, M., van der Poll, T., 2010. Disseminated intravascular coagulation in infectious disease. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 36, 367-377.
 188. Levi, M., ten Cate, H., Van der Poll, T., 2002. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Critical care medicine* 30, 220-224.
 189. Levi, M., Van der Poll, T., 2005. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends in cardiovascular medicine* 15, 254-259.

190. Levi, M., Van der Poll, T., 2010. Inflammation and coagulation. *Critical care medicine* 38, 26-34.
191. Levin, M., Franklin, E., Frangione, B., Pras, M., 1972. The amino acid sequence of a major nonimmunoglobulin component of some amyloid fibrils. *The Journal of clinical investigation* 51, 2773-2776.
192. Levitt, D., Levitt, M., 2014. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. *Clinical and experimental gastroenterology* 7, 307-328.
193. Levitt, D., Levitt, M., 2016. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *International journal of general medicine* 9, 229-255.
194. Levy, M., Fink, M., Marshall, J., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S., Vincent, J., Ramsay, G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine* 31, 1250-1256.
195. Liao, W., Jefferson, L., Taylor, J., 1986. Changes in plasma albumin concentration, synthesis rate, and mRNA level during acute inflammation. *The American journal of physiology* 251, 928-934.
196. Lin, Y., Rajala, M., Berger, J., Moller, D., Barzilai, N., Scherer, P., 2001. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *The Journal of biological chemistry* 276, 42077-42083.
197. Lindhorst, E., Young, D., Bagshaw, W., Hyland, M., Kisilevsky, R., 1997. Acute inflammation, acute phase serum amyloid A and cholesterol metabolism in the mouse. *Biochimica et biophysica acta* 1339, 143-154.
198. Lisiecka, U., Dudek, K., Brodzki, A., Kostro, K., Czop, M., Brodzki, P., 2019. Evaluation of Serum Acute Phase Protein Concentrations in Dogs with Circumanal Gland Tumours. *Journal of Comparative Pathology* 171, 12-18.
199. Lobetti, R., 1998. Canine babesiosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 20, 418-430.
200. Lobetti, R., Mohr, A., Dippenaar, T., Myburgh, E., 2000. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association* 71, 38-42.
201. Lobo, C., Rodriguez, M., Cursino-Santos, J., 2012. *Babesia* and red cell invasion. *Current opinion in hematology* 19, 170-175.
202. Lowseth, L., Gillett, N., Gerlach, R., Muggenburg, B., 1990. The Effects of Aging on Hematology and Serum Chemistry Values in the Beagle Dog. *Veterinary clinical pathology* 19, 13-19.
203. Loyer, P., Ilyin, G., Abdel Razzak, Z., Banchereau, J., Dezier, J., Campion, J., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 1993. Interleukin 4 inhibits the production of some acute-phase proteins by human hepatocytes in primary culture. *FEBS letters* 336, 215-220.
204. Mackness, B., Beltran-Debon, R., Aragonés, G., Joven, J., Camps, J., Mackness, M., 2010. Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB life* 62, 480-482.
205. Mackness, M., Mackness, B., 2015. Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene* 567, 12-21.

206. Maegraith, B., Gilles, H., Devakul, K., 1957. Pathological processes in *Babesia canis* infections. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie* 8, 485-514.
207. Mahoney, D., 1967. Bovine babesiosis: the passive immunization of calves against *Babesia argentina* with special reference to the role of complement fixing antibodies. *Experimental parasitology* 20, 119-124.
208. Maier, S., Watkins, L., 1998. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychological review* 105, 83-107.
209. Majno, G., 1991. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *The Journal of infectious diseases* 163, 937-945.
210. Margetic, S., 2012. Inflammation and haemostasis. *Biochemia medica* 22, 49-62.
211. Marhaug, G., Hackett, B., Dowton, S., 1997. Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse. *Clinical and experimental immunology* 107, 425-434.
212. Marsillach, J., Mackness, B., Mackness, M., Riu, F., Beltran, R., Joven, J., Camps, J., 2008. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free radical biology & medicine* 45, 146-157.
213. Martin, G., 2012. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert review of anti-infective therapy* 10, 701-706.
214. Martinez-Subiela, S., Bernal, L., Ceron, J., 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *American journal of veterinary research* 64, 1021-1026.
215. Martinez-Subiela, S., Ceron, J., 2005. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 46, 625-629.
216. Martinod, S., Gilot, B., 1991. Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). *Experimental & Applied Acarology* 11, 215-222.
217. Martoglio, B., Dobberstein, B., 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in cell biology* 8, 410-415.
218. Máthé, A., Vörös, K., Papp, L., Reiczigel, J., 2006. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta veterinaria Hungarica* 54, 367-385.
219. Mathews, K., 2008. The therapeutic use of 25% human serum albumin in critically ill dogs and cats. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 38, 595-605.
220. Matijatko, V., Kis, I., Torti, M., Brkljacic, M., Rafaj, R., Žvorc, Z., Mrljak, V., 2010. Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Veterinarski Arhiv* 80, 611-626.
221. Matijatko, V., Kiš, I., Torti, M., Brkljačić, M., Kučer, N., Rafaj, R., Grden, D., Živičnjak, T., Mrljak, V., 2009. Septic shock in canine babesiosis. *Veterinary parasitology* 162, 263-270.
222. Matijatko, V., Torti, M., Schetters, T., 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends in Parasitology* 28, 99-105.

223. Matsubara, J., Koura, M., Kamiyama, T., 1993. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of *Babesia microti*. The Journal of parasitology 79, 783-786.
224. Matsuda, I., Pearson, T., Holtzman, N., 1974. Determination of apoceruloplasmin by radioimmunoassay in nutritional copper deficiency, Menkes' kinky hair syndrome, Wilson's disease, and umbilical cord blood. Pediatric research 8, 821-824.
225. McKie, A., 2008. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. Biochemical Society transactions 36, 1239-1241.
226. McKie, A., Barrow, D., Latunde-Dada, G., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T., Raja, K., Shirali, S., Hediger, M., Farzaneh, F., Simpson, R., 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. Science (New York, N.Y.) 291, 1755-1759.
227. Meek, R., Urieli-Shoval, S., Benditt, E., 1994. Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implications for serum amyloid A function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91, 3186-3190.
228. Mendez, J., Carreton, E., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., Montoya-Alonso, J., 2014. Acute phase response in dogs with *Dirofilaria immitis*. Veterinary parasitology 204, 420-425.
229. Mierzejewska, E., Estrada-Peña, A., Alsarraf, M., Kowalec, M., Bajer, A., 2016. Mapping of *Dermacentor reticulatus* expansion in Poland in 2012–2014. Ticks and tick-borne diseases 7, 94-106.
230. Mierzejewska, E., Welc-Falęciak, R., Bednarska, M., Rodo, A., Bajer, A., 2014. The first evidence for vertical transmission of *Babesia canis* in a litter of Central Asian Shepherd dogs. Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM 21, 500-503.
231. Migita, K., Koga, T., Satomura, K., Izumi, M., Torigoshi, T., Maeda, Y., Izumi, Y., Jiuchi, Y., Miyashita, T., Yamasaki, S., Aiba, Y., Komori, A., Nakamura, M., Motokawa, S., Kawakami, A., Nakamura, T., Ishibashi, H., 2012. Serum amyloid A triggers the monosodium urate -mediated mature interleukin-1 β production from human synovial fibroblasts. Arthritis Research & Therapy 14, 119.
232. Milanović, Z., Beletić, A., Vekić, J., Zeljković, A., Andrić, N., Božović, A.I., Spariosu, K., Radaković, M., Ajtić, J., Filipović, M.K., 2020. Evidence of acute phase reaction in asymptomatic dogs naturally infected with *Babesia canis*. Veterinary Parasitology 282, 109140.
233. Milanović, Z., Ilić, A., Francuski-Andrić, J., Radonjić, V., Beletić, A., Kovačević Filipović, M., 2017. Acute-phase response in *Babesia canis* and *Dirofilaria immitis* co-infections in dogs. Ticks and tick-borne diseases 8, 907-914.
234. Milanović, Z., Vekić, J., Radonjić, V., Ilić Božović, A., Zeljković, A., Janac, J., Spasojević-Kalimanovska, V., Buch, J., Chandrashekar, R., Bojić-Trbojević, Ž., Hajduković, L., Christopher, M., Kovačević Filipović, M., 2019. Association of acute *Babesia canis* infection and serum lipid, lipoprotein, and apoprotein concentrations in dogs. Journal of veterinary internal medicine 33, 1686-1694.

235. Milutinović, M., Radulovic, Z., 2002. Ecological notes on ticks, Acari: Ixodidae, in Serbia, central regions. *Acta veterinaria-Beograd* 52, 49-58.
236. Milutinović, M., Radulović, Ž., Tomanović, S., Petrović, Z., 2012. Krpelji (Acari: Ixodidae, Argasidae) Srbije. *Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd*.
237. Missano Florido, M., Assunção, M., Mazza, B., Jackiu, M., Freitas, F., Bafi, A., Machado, F., 2012. Evaluation of iron, transferrin and ferritin serum levels in patients with severe sepsis and septic shock. *Critical care* 16, 424.
238. Mittal, B., Doroudchi, M., Jeong, S., Patel, B., David, S., 2003. Expression of a membrane-bound form of the ferroxidase ceruloplasmin by leptomenigeal cells. *Glia* 41, 337-346.
239. Morrow, J., Stearman, R., Peltzman, C., Potter, D., 1981. Induction of hepatic synthesis of serum amyloid A protein and actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 4718-4722.
240. Moshage, H., de Haard, H., Princen, H., Yap, S., 1985. The influence of glucocorticoid on albumin synthesis and its messenger RNA in rat *in vivo* and in hepatocyte suspension culture. *Biochimica et biophysica acta* 824, 27-33.
241. Moshage, H., Janssen, J., Franssen, J., Hafkenscheid, J., Yap, S., 1987. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *The Journal of clinical investigation* 79, 1635-1641.
242. Mozes, G., Friedman, N., Shainkin-Kestenbaum, R., 1989. Serum amyloid A: an extremely sensitive marker for intensity of tissue damage in trauma patients and indicator of acute response in various diseases. *The Journal of trauma* 29, 71-74.
243. Mukhopadhyay, C., Mazumder, B., Lindley, P., Fox, P., 1997. Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11546-11551.
244. Munhoz, T., Faria, J., Vargas-Hernandez, G., Fagliari, J., Santana, A., Machado, R., Tinucci-Costa, M., 2012. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 21, 206-212.
245. Murtaugh, M., 1994. Porcine cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology* 43, 37-44.
246. Mylonakis, M., Ceron, J., Leontides, L., Siarkou, V., Martinez, S., Tvarijonaviciute, A., Koutinas, A., Harrus, S., 2011. Serum Acute Phase Proteins as Clinical Phase Indicators and Outcome Predictors in Naturally Occurring Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25, 811-817.
247. Nahon, J., Tratner, I., Poliard, A., Presse, F., Poiret, M., Gal, A., Sala-Trepat, J., Legres, L., Feldmann, G., Bernuau, D., 1988. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *The Journal of biological chemistry* 263, 11436-11442.
248. Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B., Ganz, T., 2004a. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation* 113, 1271-1276.

249. Nemeth, E., Tuttle, M., Powelson, J., Vaughn, M., Donovan, A., Ward, D., Ganz, T., Kaplan, J., 2004b. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)* 306, 2090-2093.
250. Neumann, S., 2003. Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. *Comparative Clinical Pathology* 12, 90-94.
251. Nguyen, K., Macaubas, C., Truong, P., Wang, N., Hou, T., Yoon, T., Mellins, E., 2014. Serum amyloid A induces mitogenic signals in regulatory T cells via monocyte activation. *Molecular immunology* 59, 172-179.
252. Nguyen, S., Nguyen, H., Park, C., Kim, M., Sok, D., 2009. Oxidative inactivation of lactonase activity of purified human paraoxonase 1 (PON1). *Biochimica et biophysica acta* 1790, 155-160.
253. Nicholson, J., Wolmarans, M., Park, G., 2000. The role of albumin in critical illness. *British journal of anaesthesia* 85, 599-610.
254. Niessen, R., Lamping, R., Jansen, P., Prins, M., Peters, M., Taylor Jr. F., De Vijlder, J., Ten Cate, J., Hack, C., Sturk, A., 1997. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thrombosis and haemostasis* 78, 1088-1092.
255. Nivy, R., Caldin, M., Lavy, E., Shaabon, K., Segev, G., Aroch, I., 2014. Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia – A prospective cohort study. *Veterinary Parasitology* 203, 153-159.
256. Northrop-Clewes, C., 2008. Interpreting indicators of iron status during an acute phase response--lessons from malaria and human immunodeficiency virus. *Annals of clinical biochemistry* 45, 18-32.
257. Nosek, J., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia parasitologica* 19, 93-102.
258. Novak, F., Vavrova, L., Kodydkova, J., Novak, F., Hynkova, M., Zak, A., Novakova, O., 2010. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clinical and experimental medicine* 10, 21-25.
259. Nuttall, P., Labuda, M., 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129, 177-189.
260. O'Connor, R., Allred, D., 2000. Selection of *Babesia bovis*-infected erythrocytes for adhesion to endothelial cells coselects for altered variant erythrocyte surface antigen isoforms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164, 2037-2045.
261. Okajima, K., 2001. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunological reviews* 184, 258-274.
262. Oliver, J., 1989. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics* 20, 397-430.
263. Olivieri, E., Gazzonis, A., Zanzani, S., Veronesi, F., Manfredi, M., 2017. Seasonal dynamics of adult *Dermacentor reticulatus* in a peri-urban park in southern Europe. *Ticks and tick-borne diseases* 8, 772-779.
264. Osaki, S., Johnson, D., Frieden, E., 1966. The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *The Journal of biological chemistry* 241, 2746-2751.

265. Ostrovsky, L., Woodman, R., Payne, D., Teoh, D., Kubes, P., 1997. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation* 96, 2302-2310.
266. Pagel, W., 1982. *Paracelsus: an introduction to philosophical medicine in the era of the Renaissance*. Karger Medical and Scientific Publishers.
267. Paltrinieri, S., 2008. The feline acute phase reaction. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 177, 26-35.
268. Parving, H., Rossing, N., Jensen, H., 1974. Increased metabolic turnover rate and transcapillary escape rate of albumin in essential hypertension. *Circulation research* 35, 544-552.
269. Patel, B., David, S., 1997. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 272, 20185-20190.
270. Peavy, D., Taylor, J., Jefferson, L., 1985. Time course of changes in albumin synthesis and mRNA in diabetic and insulin-treated diabetic rats. *The American journal of physiology* 248, 656-663.
271. Peter, T., 1993. *Ecological studies on the tick Dermacentor reticulatus*. PhD Thesis. University of Whales,
272. Peters Jr, T., 1995. 1 - Historical Perspective, In: Peters, T. (Ed.) *All About Albumin*. Academic Press, San Diego, 1-8.
273. Petersen, H., Nielsen, J., Heegaard, P., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary research* 35, 163-187.
274. Pue, C., Mortensen, R., Marsh, C., Pope, H., Wewers, M., 1996. Acute phase levels of C-reactive protein enhance IL-1 beta and IL-1ra production by human blood monocytes but inhibit IL-1 beta and IL-1ra production by alveolar macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 156, 1594-1600.
275. Quigley, K., Chelack, B., Haines, D., Jackson, M., 2001. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 13, 297-300.
276. Quinlan, G., Martin, G., Evans, T., 2005. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 41, 1211-1219.
277. Ragan, H., Nacht, S., Lee, G., Bishop, C., Cartwright, G., 1969. Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper-deficient swine. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 217, 1320-1323.
278. Raju, M., Kamaraju, R., Sritharan, V., Rajkumar, K., Natarajan, S., Kumar, A., Burgula, S., 2016. Continuous evaluation of changes in the serum proteome from early to late stages of sepsis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular medicine reports* 13, 4835-4844.
279. Rautenbach, Y., Goddard, A., Thompson, P., Mellanby, R., Leisewitz, A., 2017. A flow cytometric assessment of the lymphocyte immunophenotypes in dogs naturally infected with *Babesia rossi*. *Veterinary parasitology* 241, 26-34.

280. René-Martellet, M., Chêne, J., Chabanne, L., Chalvet-Monfray, K., Bourdoiseau, G., 2013. Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: Results of a multiregional study. *Veterinary Parasitology* 197, 50-58.
281. Republic Hydrometeorological Service of Serbia (RHMZS), 2021a. Monthly and Annual Means, Maximum and Minimum Values of Meteorological Elements for the Period 1981–2010. (pristupljeno 12.02.2021.). http://www.hidmet.gov.rs/eng/meteorologija/stanica_sr.php?moss_id=13274/.
282. Republic Hydrometeorological Service of Serbia (RHMZS), 2021b. Meteorological Yearbook - Climatological Data. (pristupljeno 12.02.2021.). http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php/.
283. Republički zavod za statistiku (RZS), 2021. (pristupljeno 18.02.2021.). <https://www.stat.gov.rs/sr-Latn/oblasti/stanovnistvo/procene-stanovnistva/>.
284. Reul, J., Rothuizen, J., de Kloet, E., 1991. Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: Neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40, 63-69.
285. Ristic, M. (1988). *Babesiosis of Domestic Animals and Man* (1st edition). CRC Press, Boca Raton, 119-130.
286. Rodrigo, L., Hernandez, A., Lopez-Caballero, J., Gil, F., Pla, A., 2001. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chemico-biological interactions* 137, 123-137.
287. Rokita, H., Shirahama, T., Cohen, A., Meek, R., Benditt, E., Sipe, J., 1987. Differential expression of the amyloid SAA 3 gene in liver and peritoneal macrophages of mice undergoing dissimilar inflammatory episodes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 139, 3849-3853.
288. Roncalli Amici, R., 2001. The history of Italian parasitology. *Veterinary parasitology* 98, 3-30.
289. Rosenberg, Y., Evans, C., 1979. Resistance of mice suppressed for IgM production to *Babesia microti* infection. *Nature* 281, 302-304.
290. Ross, A., 2017. Impact of chronic and acute inflammation on extra- and intracellular iron homeostasis. *The American journal of clinical nutrition* 106, 1581-1587.
291. Rossi, G., Ibba, F., Meazzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S., 2014a. Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniasis. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 199, 143-149.
292. Rossi, G., Kules, J., Rafaj, R., Mrljak, V., Lauzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S., 2014b. Relationship between paraoxonase 1 activity and high density lipoprotein concentration during naturally occurring babesiosis in dogs. *Research in veterinary science* 97, 318-324.
293. Rothschild, M., Oratz, M., Schreiber, S., 1973. Albumin Metabolism. *Gastroenterology* 64, 324-337.
294. Rothschild, M., Oratz, M., Schreiber, S., 1988. Serum albumin. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 8, 385-401.

295. Ruebush, M., Hanson, W., 1980a. Thymus dependence of resistance to infection with *Babesia microti* of human origin in mice. The American journal of tropical medicine and hygiene 29, 507-515.
296. Ruebush, M., Hanson, W., 1980b. Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. Cellular immunology 52, 255-265.
297. Ryter, S., Tyrrell, R., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. Free radical biology & medicine 28, 289-309.
298. Saari, S., Näreaho, A., Nikander, S., 2019. Chapter 9 - Arachnida, In: Saari, S., Näreaho, A., Nikander, S. (Eds.) Canine Parasites and Parasitic Diseases. Academic Press, 187-228.
299. Saklani, N., Khurana, A., 2019. Global Warming: Effect on Living Organisms, Causes and its Solutions. International Journal of Engineering and Management Research 09, 24-26.
300. Salzer, J., Lovejoy, L., Linder, M., Rosen, C., 1998. Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin. Journal of neuroscience research 54, 147-157.
301. Samokyszyn, V., Miller, D., Reif, D., Aust, S., 1989. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. The Journal of biological chemistry 264, 21-26.
302. Santiago, P., Roig-Lopez, J., Santiago, C., Garcia-Arraras, J., 2000. Serum amyloid A protein in an echinoderm: its primary structure and expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. The Journal of experimental zoology 288, 335-344.
303. Sato, M., Gitlin, J., 1991. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. The Journal of biological chemistry 266, 5128-5134.
304. Schalm, O., 1980. Manual of Feline and Canine Hematology, p. 152. Veterinary Practice. Santa Barbara, CA.
305. Scheepers, E., Leisewitz, A., Thompson, P., Christopher, M., 2011. Serial haematology results in transfused and non-transfused dogs naturally infected with *Babesia rossi*. Journal of the South African Veterinary Association 82, 136-143.
306. Schetters, T., 2005. Vaccination against canine babesiosis. Trends in Parasitology 21, 179-184.
307. Schetters, T., 2019. Mechanisms Involved in the Persistence of *Babesia canis* Infection in Dogs. Pathogens (Basel, Switzerland) 8, 94.
308. Schetters, T., Kleuskens, J., Crommert, J., Leeuw, P., Finizio, A., Gorenflot, A., 2009. Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study. Veterinary parasitology 162, 7-15.
309. Schetters, T., Kleuskens, J., Scholtes, N., Van de Crommert, J., Krijnen, E., Moubri, K., Gorenflot, A., Vermeulen, A., 2006. Onset and duration of immunity against *Babesia canis* infection in dogs vaccinated with antigens from culture supernatants. Veterinary parasitology 138, 140-146.
310. Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S., Dinarello, C., 1990. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and

- tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40-47.
311. Schouten, M., Wiersinga, W., Levi, M., Van der Poll, T., 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of leukocyte biology* 83, 536-545.
 312. Sedlak, E., Zoldak, G., Wittung-Stafshede, P., 2008. Role of copper in thermal stability of human ceruloplasmin. *Biophysical journal* 94, 1384-1391.
 313. Semeraro, N., Ammollo, C., Semeraro, F., Colucci, M., 2010. Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 2(3), e2010024.
 314. Shayeghi, M., Latunde-Dada, G., Oakhill, J., Laftah, A., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F., Hider, R., Frazer, D., Anderson, G., Vulpe, C., Simpson, R., McKie, A., 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122, 789-801.
 315. Shim, H., Harris, Z., 2003. Genetic Defects in Copper Metabolism. *The Journal of Nutrition* 133, 1527-1531.
 316. Shimada, T., Shikano, S., Hashiguchi, R., Matsuki, N., Ono, K., 1996. Effects of depletion of T cell subpopulations on the course of infection and anti-parasite delayed type hypersensitivity response in mice infected with *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. *The Journal of veterinary medical science* 58, 343-347.
 317. Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., Camaschella, C., 2008. The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin. *Cell metabolism* 8, 502-511.
 318. Singer, M., Deutschman, C., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G., Chiche, J., Cooper-Smith, C., Hotchkiss, R., Levy, M., Marshall, J., Martin, G., Opal, S., Rubenfeld, G., van der Poll, T., Vincent, J., Angus, D., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 315, 801-810.
 319. Siroký, P., Kubelová, M., Bednář, M., Modrý, D., Hubálek, Z., Tkadlec, E., 2011. The distribution and spreading pattern of *Dermacentor reticulatus* over its threshold area in the Czech Republic--how much is range of this vector expanding? *Veterinary parasitology* 183, 130-135.
 320. Smith, C., Arvedson, T., Cooke, K., Dickmann, L., Forte, C., Merriam, K., Perry, V., Tran, L., Rottman, J., Maxwell, J., 2013. IL-22 regulates iron availability *in vivo* through the induction of hepcidin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191, 1845-1855.
 321. Smith, J., 1997. Chapter 9 - Iron Metabolism and Its Disorders, In: Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Fifth Edition)*. Academic Press, San Diego, 223-239.
 322. Soares, M., Weiss, G., 2015. The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO reports* 16, 1482-1500.
 323. Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & vectors* 9, 336.
 324. Song, C., Hsu, K., Yamen, E., Yan, W., Fock, J., Witting, P., Geczy, C., Freedman, S.B., 2009. Serum amyloid A induction of cytokines in monocytes/macrophages and lymphocytes. *Atherosclerosis* 207, 374-383.

325. Sorenson, R., Bisgaier, C., Aviram, M., Hsu, C., Billecke, S., La Du, B., 1999. Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2214-2225.
326. Sow, F., Florence, W., Satoskar, A., Schlesinger, L., Zwilling, B., Lafuse, W., 2007. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. *Journal of leukocyte biology* 82, 934-945.
327. Spottiswoode, N., Duffy, P., Drakesmith, H., 2014. Iron, anemia and hepcidin in malaria. *Frontiers in pharmacology* 5, 125.
328. Squire, P., Moser, P., O'Konski, C., 1968. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry* 7, 4261-4272.
329. Stegeman, J., Birkenheuer, A., Kruger, J., Breitschwerdt, E., 2003. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222, 959-963.
330. Stocker, R., Glazer, A., Ames, B., 1987. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 5918-5922.
331. Subramanian, S., Han, C., Chiba, T., McMillen, T., Wang, S., Haw, A., Kirk, E., O'Brien, K., Chait, A., 2008. Dietary Cholesterol Worsens Adipose Tissue Macrophage Accumulation and Atherosclerosis in Obese LDL Receptor-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 685-691.
332. Sun, X., Kaysen, G., 1994. Albumin and transferrin synthesis are increased in H4 cells by serum from analbuminemic or nephrotic rats. *Kidney international* 45, 1381-1387.
333. Takegawa, R., Kabata, D., Shimizu, K., Hisano, S., Ogura, H., Shintani, A., Shimazu, T., 2019. Serum albumin as a risk factor for death in patients with prolonged sepsis: An observational study. *Journal of critical care* 51, 139-144.
334. Tape, C., Kisilevsky, R., 1990. Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1043, 295-300.
335. Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Cerón, J., Paltrinieri, S., 2005. Preliminary Studies of Serum Acute-Phase Protein Concentrations in Hematologic and Neoplastic Diseases of the Dog. *Journal of veterinary internal medicine* 19, 865-870.
336. Theurl, I., Theurl, M., Seifert, M., Mair, S., Nairz, M., Rumpold, H., Zoller, H., Bellmann-Weiler, R., Niederegger, H., Talasz, H., Weiss, G., 2008. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* 111, 2392-2399.
337. Thuiller, W., 2007. Climate change and the ecologist. *Nature* 448, 550-552.
338. Toussaint, M., van Ederen, A., Gruys, E., 1995. Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection. *Comparative Haematology International* 5, 149-157.
339. Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Tasca, S., Cerón, J., 2012. Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1 measurement in dogs. *American journal of veterinary research* 73, 34-41.
340. Uhlar, C., Whitehead, A., 1999. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European journal of biochemistry* 265, 501-523.

341. Uilenberg, G., 2006. Babesia--a historical overview. *Veterinary parasitology* 138, 3-10.
342. Ulutas, B., Bayramli, G., Ulutas, P., Karagenc, T., 2005. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Veterinary clinical pathology* 34, 144-147.
343. Urieli-Shoval, S., Cohen, P., Eisenberg, S., Matzner, Y., 1998. Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues. Predominant localization to the epithelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46, 1377-1384.
344. Urieli-Shoval, S., Linke, R., Matzner, Y., 2000. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Current opinion in hematology* 7, 64-69.
345. Vachette, P., Dainese, E., Vasyliov, V., Di Muro, P., Beltramini, M., Svergun, D., De Filippis, V., Salvato, B., 2002. A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin. *The Journal of biological chemistry* 277, 40823-40831.
346. Van der Poll, T., de Jonge, E., Levi, M., 2001. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 27, 639-651.
347. Van Lenten, B., Hama, S., de Beer, F., Stafforini, D., McIntyre, T., Prescott, S., La Du, B., Fogelman, A., Navab, M., 1995. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *The Journal of clinical investigation* 96, 2758-2767.
348. Van Lenten, B., Wagner, A., Navab, M., Fogelman, A., 2001. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *The Journal of biological chemistry* 276, 1923-1929.
349. Van Miert, A., 1995. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *The Veterinary quarterly* 17, 41-50.
350. Vannier, E., Gewurz, B., Krause, P., 2008. Human babesiosis. *Infectious disease clinics of North America* 22, 469-488.
351. Vannier, E., Diuk-Wasser, M., Ben Mamoun, C., Krause, P., 2015. Babesiosis. *Infectious disease clinics of North America* 29, 357-370.
352. Varloud, M., Liebenberg, J., Fourie, J., 2018. Early *Babesia canis* transmission in dogs within 24 h and 8 h of infestation with infected pre-activated male *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasites & vectors* 11, 41-41.
353. Vukovic, A., Vujadinovic, M., Rendulic, S., Djurdjevic, V., Ruml, M., Babic, V., Popovic, D., 2018. Global warming impact on climate change in Serbia for the period 1961-2100. *Thermal Science* 2018, 168.
354. Vulpe, C., Kuo, Y., Murphy, T., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G., 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature Genetics* 21, 195-199.
355. Wall, R., Shearer, D., 2008. Ticks (Acari). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control, Second Edition*, 55-82.

356. Walther, G., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T., Fromentin, J., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389-395.
357. Welc-Fałęciak, R., Rodo, A., Siński, E., Bajer, A., 2009. *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Veterinary Parasitology* 166, 191-198.
358. Welzl, C., Leisewitz, A., Jacobson, L., Vaughan-Scott, T., Myburgh, E., 2001. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association* 72, 158-162.
359. Wessling-Resnick, M., 2010. Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annual Review of Nutrition* 30, 105-122.
360. Wigmore, S., Fearon, K., Maingay, J., Lai, P., Ross, J., 1997. Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *The American journal of physiology* 273, 720-726.
361. Wolf, M., Bohm, S., Brand, M., Kreymann, G., 1996. Proinflammatory cytokines interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *European journal of endocrinology* 135, 729-737.
362. Wolfordd, S., Schroer, R., Gohs, F., Gallo, P., Falk, H., Dente, A., 1988. Effect of Age on Serum Chemistry Profile, Electrophoresis and Thyroid Hormones in Beagle Dogs Two Weeks to One Year of Age. *Veterinary Clinical Pathology* 17, 35-42.
363. Wrighting, D., Andrews, N., 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108, 3204-3209.
364. Yahia, S., El-Assmy, M., Eldars, W., Mahmoud, M., Abdel Ghaffar, N., Wahba, Y., 2019. Serum amyloid A versus C-reactive protein in sepsis: new insights in an Egyptian ICU. *Research and Opinion in Anesthesia and Intensive Care* 6, 429-432.
365. Yamada, T., Kakihara, T., Kamishima, T., Fukuda, T., Kawai, T., 1996. Both acute phase and constitutive serum amyloid A are present in atherosclerotic lesions. *Pathology international* 46, 797-800.
366. Yin, M., Si, L., Qin, W., Li, C., Zhang, J., Yang, H., Han, H., Zhang, F., Ding, S., Zhou, M., Wu, D., Chen, X., Wang, H., 2018. Predictive Value of Serum Albumin Level for the Prognosis of Severe Sepsis Without Exogenous Human Albumin Administration: A Prospective Cohort Study. *Journal of intensive care medicine* 33, 687-694.
367. Yoshida, K., Seto-Ohshima, A., Sinohara, H., 1997. Sequencing of cDNA encoding serum albumin and its extrahepatic synthesis in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 4, 351-354.
368. Yu, M., Chen, M., Han, F., Li, Q., Sun, R., Tu, Y., 2018. Prognostic value of the biomarkers serum amyloid A and nitric oxide in patients with sepsis. *International immunopharmacology* 62, 287-292.
369. Yuan, H., Huang, J., Lv, B., Yan, W., Hu, G., Wang, J., Shen, B., 2013. Diagnosis value of the serum amyloid A test in neonatal sepsis: a meta-analysis. *BioMed research international* 2013:520294.

370. Zhang, Y., Zhang, J., Sheng, H., Li, H., Wang, R., 2019. Chapter Two - Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases. *Advances in clinical chemistry* 90, 25-80.
371. Zimmerman, G., McIntyre, T., Prescott, S., Stafforini, D., 2002. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Critical care medicine* 30, 294-301.
372. Zivkovic, D., Seinen, W., Kuil, H., Albers-van Bommel, C., Speksnijder, J., 1984. Immunity to *Babesia* in mice. I. Adoptive transfer of immunity to *Babesia rodhaini* with immune spleen cells and the effect of irradiation on the protection of immune mice. *Veterinary immunology and immunopathology* 5, 343-357.
373. Zivkovic, D., Speksnijder, J.E., Kuil, H., Seinen, W., 1985. Immunity to *Babesia* in mice III. The effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum on mice immune to *Babesia rodhaini*. *Veterinary immunology and immunopathology* 9, 131-142.
374. Zygnier, W., Gójska, O., Rapacka, G., Jaros, D., Wędrychowicz, H., 2007. Hematological changes during the course of canine babesiosis caused by large *Babesia* in domestic dogs in Warsaw (Poland). *Veterinary Parasitology* 145, 146-151.

Biografija

Filip Janjić rođen je 04.05.1989. godine u Smederevu. Osnovnu školu završio je u Azanji, a srednju u Svilajncu. Fakultet veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu upisuje 2008. godine i završava ga 2014. godine, sa prosečnom ocenom 8,55. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, upisao je 2015. godine i položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 9,87.

Na Katedri za bolesti kopitara, mesojeda, živine i divljači Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, stažirao je 2015–2016. godine. Tokom 2016–2019. godine volonterski je radio na projektu „Antioksidativna zaštita i potencijali za diferencijaciju i regeneraciju mezenhimalnih matičnih ćelija iz različitih tkiva tokom procesa starenja“, na Katedri za patološku fiziologiju, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Od avgusta 2018. godine povremeno volontira u veterinarskim službama koje se bave zaštitom zdravlja pasa i mačaka. Septembra 2018. godine završio je dva kursa posvećena upotrebi PCR tehnologije. Od aprila 2019. godine angažovan je u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta na projektu „Funkcionalni fiziološki aktivni biljni materijali sa dodatkom vrednošću za primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji“, sa radnim mestom na katedri za Mikrobiologiju sa imunologijom i bolesti riba rakova i školjki, Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. U Veterinarsko specijalističkom institutu „Požarevac“ volontirao je tokom februara i marta 2020. godine. Objavio je dva rada u časopisima M21 kategorije, jedan rad u časopisu M51 kategorije i jedan rad M34 kategorije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: Filip Janjić

Broj upisa: 14/16

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskom programu drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

Potpis doktoranda

U Beogradu,

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Filip Janjić

Broj upisa: 14/16

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: „Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima“

Mentor 1: prof. dr Milica Kovačević Filipović

Mentor 2: prof. dr Jelena Ajtić

Potpisani: Filip Janjić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu,

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „**Odgovor akutne faze kod pasa obolelih od babezioze tokom različitih godišnjih doba i veza pojave akutnog oboljenja sa meteorološkim parametrima**“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu,

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.