

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Milica K. Kuručki

Hepatozoon canis u populacijama vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) na teritoriji Srbije

- doktorska disertacija -

Beograd, 2024

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY**

Milica K. Kuručki

***Hepatozoon canis* in wolf (*Canis lupus*) and jackal
(*Canis aureus*) populations on the territory of
Serbia**

- Doctoral Dissertation -

Belgrade, 2024

Mentori i članovi komisije

Mentori:

dr Duško Ćirović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Snežana Tomanović, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za medicinska istraživanja
Institut od nacionalnog značaja za Republiku
Srbiju

Članovi komisije:

dr Ratko Sukara, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za medicinska istraživanja
Institut od nacionalnog značaja za Republiku
Srbiju

dr Aleksandra Penezić, docent
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

dr Anđeljko Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Biološki fakultet

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za ekologiju životinja i zoogeografiju, Instituta za zoologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u sklopu doktorske disertacije finansirana su u okviru projekta „Enzootski transmisioni ciklusi patogenih mikroorganizama koje prenose krpelji (OII73006)“ i od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (451-03-66/2024-03/200178 i 451-03-66/2024-03/200015).

Nakon višegodišnjeg rada i posvećenosti završavanje ove doktorske disertacije bila je značajna prekretnica i ne bih mogla da stignem do cilja bez vođstva, podrške i ohrabrenja mnogih neverovatnih ljudi.

Prvo i najvažnije, želim da izrazim iskrenu zahvalnost svojim mentorima, prof. dr Dušku Ćiroviću i dr Snežani Tomanović, na strpljenju, mudrosti i nepokolebljivoj podršci tokom ovog putovanja. Njihova stručnost, konstruktivne povratne informacije i vera u moj rad bili su od neprocenjive vrednosti.

Takođe sam zahvalana svim članovima komisije, dr Ratku Sukari, doc. dr Aleksandri Penezić i prof. dr Anđeljku Petroviću, čiji su me uvidi, sugestije i izazovna pitanja podstakli da usavršim i upotpunim ovo istraživanje.

Zahvalnost svim kolegama sa Katedre za ekologiju životinja i zoogeografiju koji su me inspirisali i podstakli da napredujem i usavršavam se.

Prijateljima veliko hvala na stalnom ohrabrenju i razumevanju. Vaša podrška mi je ulivala snagu i bila pokretač u istrajanju i ispunjenju cilja.

Najveću zahvalnost dugujem mami, tati, Miši i teti što su verovali u moj uspeh i bili bezuslovna podrška u trenucima sumnje.

„*Hepatozoon canis* u populacijama vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) na teritoriji Srbije”

SAŽETAK

Tokom ove studije je prvi put analiziran značaj vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) kao potencijalnih rezervoara patogena *Hepatozoon canis* u Srbiji. Protozoa *H. canis* se na domaćina prenosi ingestijom zaraženih vektora, najčešće smeđeg psećeg krpelja (*Rhipicephalus sanguineus*). Prisustvo *H. canis* je detektovano molekularnim metodama u slezinama vuka i šakala.

Tokom studije analizirana je ukupno 221 životinja, od toga 107 vukova i 114 šakala. Uzorak šakala obuhvatao je pored adultnih i 15 juvenilnih jedinki. Uzorci šakala su sakupljeni sa 30 lokaliteta, a vukova sa 23 lokaliteta u Srbiji.

Molekularne analize utvrdile su prisustvo DNK *H. canis* sa prevalencijom 57,94% (62/107) u analiziranom uzorku vuka i prevalencijom 78,95% (90/114) u analiziranom uzorku šakala. Sekvenciranje reprezentativnih uzoraka je ukazalo na pet varijabilnih pozicija u sekvencama *H. canis* poreklom od vuka, te je definisalo pet različitih tipova sekvenci (S1-S5). U analiziranom uzorku šakala genetički diverzitet *H. canis* je bio manji. Kod njih je na osnovu tri varijabilna mesta, detektovano četiri različita tipa sekvenci (S4-S7). Filogenetske analize sekvenci *H. canis* dobijenih u okviru ove doktorske disertacije i sekvenci dostupnih u banci gena (GenBank[®]) potvrdile su da je S4 tip sekvence zajednički za sve tri autohtone kanide u Srbiji, vuka, šakala i lisicu, dok su S1 i S2 tip svojstveni samo za vuka, a S6 i S7 samo za šakala.

Dobijeni rezultati ukazuju na ulogu vuka i šakala kao potencijalnih rezervoara *H. canis*. Veliki broj zaraženih štenaca šakala ukazuje na mogućnost transplacentalne transmisije patogena ili slučajnu ingestiju zaraženog krpelja. Filogenetske analize ukazuju na blisku povezanost i mogući zajednički obrazac prenosa između kohabitirajućih populacija divljih kanida: vuka, šakala i lisice.

KLJUČNE REČI: *Hepatozoon canis*, vuk, *Canis lupus*, šakal, *Canis aureus*, Srbija

NAUČNA OBLAST: Ekologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Parazitologija

UDK: [591.2:[591.67+ 595.421]]: 599.744.111.1 (043.3)

"*Hepatozoon canis* in wolf (*Canis lupus*) and jackal (*Canis aureus*) populations on the territory of Serbia"

ABSTRACT

In this study, the importance of wolves (*Canis lupus*) and jackals (*Canis aureus*) as potential reservoirs of the pathogen *Hepatozoon canis* in Serbia was analyzed for the first time. The protozoan *H. canis* is transmitted to the host by ingesting infected vectors, usually the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). The presence of *H. canis* was detected in the spleen of wolves and jackals using molecular methods.

A total of 221 animals were analyzed in the study, 107 of which were wolves and 114 jackals. In addition to the adult animals, the jackal sample also included 15 young animals. The jackal samples were collected from 30 locations and the wolf samples from 23 locations in Serbia.

Molecular analyzes revealed the presence of *H. canis* DNA with a prevalence of 57.94% (62/107) in the analyzed wolf sample and a prevalence of 78.95% (90/114) in the analyzed jackal sample. The sequencing of the representative samples revealed five variable positions in the *H. canis* sequences of wolves, resulting in five different sequence types (S1-S5). In the jackal sample analyzed, the genetic diversity of *H. canis* was lower. In them, four different sequence types (S4-S7) were detected based on three variable sites. Phylogenetic analyzes of the *H. canis* sequences obtained in this PhD thesis and the sequences available in the gene bank (GenBank[®]) confirmed that sequence type S4 is common to all three autochthonous canids in Serbia, wolf, jackal and fox, while types S1 and S2 are characteristic only for the wolf and S6 and S7 only for the jackal.

The results obtained indicate the role of wolves and jackals as potential reservoirs of *H. canis*. A large number of infected jackal pups indicates the possibility of transplacental transmission of the pathogen or accidental ingestion of an infected tick. Phylogenetic analyzes indicate a close relationship and a possible common transmission pattern between cohabiting populations of wild canids: wolf, jackal and fox.

Keywords: *Hepatozoon canis*, wolf, *Canis lupus*, jackal, *Canis aureus*, Serbia

Scientific field: Ecology

Scientific subfield: Parasitology

UDK: [591.2:[591.67+ 595.421]]: 599.744.111.1 (043.3)

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Vuk (<i>Canis lupus</i> Linnaeus, 1758)	1
1.1.1. Morfološke karakteristike	2
1.1.2. Distribucija	2
1.1.2.1. Distribucija u Srbiji	3
1.1.2.2. Brojnost i gustina	4
1.1.3. Biologija vrste	4
1.1.3.1. Ishrana	4
1.1.3.2. Ponašanje i reprodukcija	5
1.1.3.3. Stanište	5
1.2. Šakal (<i>Canis aureus</i> Linnaeus, 1758)	7
1.2.1. Morfološke karakteristike	7
1.2.2. Distribucija	8
1.2.2.1. Distribucija šakala u Srbiji	9
1.2.2.2. Brojnost i gustina	9
1.2.3. Biologija vrste	9
1.2.3.1. Ishrana	9
1.2.3.2. Reprodukcija	9
1.2.3.3. Stanište	10
1.3. <i>Hepatozoon</i> sp.	11
1.3.1. <i>Hepatozoon canis</i>	13
1.3.1.1. Distribucija <i>Hepatozoon canis</i>	13
1.3.1.2. Životni ciklus <i>Hepatozoon canis</i>	15
1.3.1.3. Vektori <i>Hepatozoon canis</i>	16
1.3.1.4. Divlje kanide kao rezervoari <i>Hepatozoon canis</i>	18
1.3.1.5. Putevi transmisije <i>Hepatozoon canis</i>	19
2. CILJEVI	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1. Prikupljanje uzoraka	22
3.2. Izolacija DNK i molekularna detekcija <i>Hepatozoon canis</i> u slezinama vuka i šakala	24
3.2.1. Izolacija DNK iz slezine životinja	24
3.2.2. Molekularne metode u detekciji i identifikaciji vrste <i>Hepatozoon canis</i>	25
3.2.2.1. Detekcija <i>Hepatozoon canis</i> u slezinama vuka i šakala	26

3.3. Sekvenciranje uzoraka	27
3.4. Filogenetske analize.....	27
3.5. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI	29
4.1. Prikupljeni uzorci životinja	29
4.1.1. Uzorci vuka.....	29
4.1.2. Uzorci šakala.....	33
4.1.2.1. Uzorci juvenilnih jedinki šakala	38
4.2. Molekularna detekcija <i>Hepatozoon canis</i> u slezinama vuka i šakala.....	39
4.2.1. Detekcija <i>Hepatozoon canis</i> u slezinama vuka.....	39
4.2.2. Detekcija <i>Hepatozoon canis</i> u slezinama šakala	43
4.2.2.1. Detekcija <i>Hepatozoon canis</i> kod juvenilnih i adultnih jedinki šakala	48
4.3. Razlike u prevalenciji <i>Hepatozoon canis</i> u populacijama vuka i šakala	49
4.4. Diverzitet različitih genotipova <i>Hepatozoon canis</i> u populacijama vuka i šakala.....	49
4.4.1. Diverzitet različitih genotipova <i>Hepatozoon canis</i> u populaciji vuka	49
4.4.1.1. Filogenetske analize prisustva <i>Hepatozoon canis</i> u populaciji vuka.....	52
4.4.2. Diverzitet različitih genotipova <i>Hepatozoon canis</i> u populaciji šakala	55
4.4.2.1. Filogenetske analize sekvenci <i>Hepatozoon canis</i> u analiziranom uzorku šakala.....	58
5. DISKUSIJA	61
6. ZAKLJUČCI.....	67
7. LITERATURA	68

1. UVOD

Redu Carnivora pripada više od 280 vrsta placentarnih sisara, uglavnom predatora, dok je porodica Canidae među najstarijim predstavnicima ovog reda. Četiri vrste divljih kanida su autohtone u Evropi: šakal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758), lisica (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758), vuk (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) i polarna lisica (*Alopex lagopus* Linnaeus, 1758). Sve vrste osim poslednje su prisutne u Srbiji. Zbog sve veće brojnosti šakala, trenutnog širenja areala, njihove mogućnosti kretanja na velike udaljenosti kroz širok spektar staništa, ali i oportunističke ishrane, ova vrsta predstavlja potencijalni rezervoar i prenosioca uzročnika velikog broja zoonoza (Széll et al., 2013). Najveći broj savremenih studija na šakalima imao je u fokusu endoparazite (Széll et al., 2013; Ćirović et al., 2015; Lalošević et al., 2016; Mitková et al., 2017), dok su istraživanja koja obuhvataju ulogu šakala u održavanju drugih patogena slabije vršena. Šakal je filogenetski blisko povezan i može hibridizovati sa psom (Galov et al., 2015), a sklonost ka nizijskim staništima i sposobnost uspostavljanja populacija u blizini ljudskih naselja mogu povećati verovatnoću interakcije između ove dve kanidne vrste (Mitková et al., 2017). Šakali takođe imaju i sanitarnu ulogu u ekosistemu, stupaju u interakcije sa različitim vrstama divljih životinja i njihovim okruženjem. Vuk kao autohtona vrsta, igra ključnu ulogu u ekosistemima kao vršni predator. Kao vršni predator ima ulogu kontrole brojnosti populacija plena (Boitani et al., 2022), dok njegove interakcije sa drugim divljim životinjama, mogu uticati na širenje patogena u različitim tipovima ekosistema.

Hepatozoon canis James, 1905 je protozoa iz razreda Apicomplexa. Jedna je od najrasprostranjenijih protozoa koju prenose krpelji, a inficira pse i divlje kanide širom sveta (Smith, 1996; Baneth, 2011). Ova protozoa obično izaziva hroničnu infekciju sa relativnom blagom kliničkom slikom, ili bez ikakvih kliničkih promena u svom domaćinu (Baneth et al., 2003). Putevi transmisije *H. canis* nisu još uvek dovoljno razjašnjeni. Najčešći put prenosa *H. canis* je ingestijom zaraženog krpelja, uglavnom smeđeg psećeg krpelja (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806) (Dantas-Torres & Otranto, 2015a). Vuk i šakal mogu uneti krpelja tokom svojih uobičajenih aktivnosti, koje podrazumevaju timarenje krzna ili se mogu zaraziti ingestijom zaraženog plena. Vertikalni prenos sa majke na potomstvo je još jedan mogući vid transmisije *H. canis* (Murata et al., 1993; Hodžić et al., 2018a; Schäfer et al., 2022a). Krpelji se inficiraju hraneći se na zaraženim domaćinima, a to mogu biti divlje kanide, psi ili potencijalno druge vrste divljih životinja. Na taj način krpelji prenose patogena sa jednog na drugog domaćina. Vuk i šakal tada postaju deo ciklusa prenosa tako što postaju domaćini parazita i služe kao izvor infekcije za krpelje. Praćenje prevalencije parazita u populacijama vuka i šakala značajno doprinosi boljem razumevanju epidemiologije bolesti u prirodnom okruženju.

S obzirom da vukovi i šakali mogu deliti stanište sa psima, takođe, mogu koristiti iste hranidbene resurse, hibridizovati, naseljavati urbana i suburbana područja, razumevanje uloge vuka i šakala u ciklusu prenosa *H. canis* je ključno za procenu rizika transmisije na pse.

Značaj vuka i šakala kao potencijalnih rezervoara za *H. canis* leži u njihovoj ulozi u prirodnom ciklusu prenosa parazita, što ima implikacije na zdravlje divljih životinja, zdravlje pasa i dinamiku ekosistema. Proučavanje interakcija između divljih kanida, krpelja i parazita, odnosno čitavog enzootskog ciklusa patogena, doprinosi širem razumevanju epidemiologije *H. canis* u populacijama divljih kanida i pasa.

1.1. Vuk (*Canis lupus* Linnaeus, 1758)

Vuk je najveća evropska kanida. Jedna je od tri krupne karnivore koje naseljavaju područje Srbije (Savić et al., 1995). Poznat je po svojoj inteligenciji, socijalnoj strukturi i ekološkom značaju.

1.1.1. Morfološke karakteristike

Vuk pripada porodici Canidae i od ostalih pripadnika porodice izdvaja se po svojoj veličini - najveći je predstavnik. Lobanja vuka je masivno građena sa snažnim vilicama, dugim, povijenim očnjacima i snažno razvijenim zubima, koji su prilagođeni ishrani krupnim plenom (Milenković et al., 2007). Telo je pokriveno dugačkom dlakom, koja je na leđima i bokovima sivo-smeđe boje, dok je na vratu i stomaku bele boje. Boja krzna vuka veoma varira kako sezonski (zimsko krzno je gušće i tamnije od letnjeg), tako i u zavisnosti od tipa staništa koje naseljava (Slika 1). U najsevernijim delovima areala krzno je gotovo potpuno bele boje, u Indiji je crvene boje, dok je za Severnu Ameriku karakteristična crna boja krzna (Milenković et al., 2007). Telo je izuzetno snažno građeno sa dugim nogama koje vukovima omogućavaju da dostižu brzinu i do 70 km/h kao i da se kreću po dubokom snegu (Mech & Boitani, 2003). Čitava građa tela zapravo predstavlja prilagođenost na predatorski način života. Veličina i masa tela značajno variraju u zavisnosti od pola, uzrasta, staništa i geografskog područja, pri čemu mogu dostizati dužinu tela i do 2 m (rep obično iznosi 1/3 dužine) i težinu koja može biti i preko 80 kg (Milenković et al., 2007). Polni dimorfizam se jasno uočava u pogledu veličine tela, pri čemu su mužjaci značajno krupniji od ženki. Veličina tela dosta varira i u zavisnosti od staništa u kome jedinke žive, pa tako vukovi koji naseljavaju pustinjska i polupustinjska područja se odlikuju najmanjom veličinom tela i masom, zatim slede vukovi umerenih područja koje odlikuje srednja veličina tela, dok su za severnija područja karakteristične najkrupnije jedinke (Macdonald, 2001). U Srbiji, mužjaci u proseku teže oko 35 kg, i dugi su i do 120 cm, dok se težina ženki kreće od 26 do 36 kg i prosečne su dužine oko 112 cm (Trbojević & Ćirović, 2016).



Slika 1. Letnje krzno vuka - Nacionalni park Tara (fotouzamka NP Tara)

1.1.2. Distribucija

Kao najveći predstavnik porodice pasa, vuk se odlikuje izuzetno širokom distribucijom. Areal vuka obuhvata skoro čitav Holarktiki - Evropu, Aziju i Severnu Ameriku, gde u visinskom opsegu naseljava područja od obala mora pa sve do 2400 mnnv (Mech & Boitani, 2010). Nekada je areal vuka

bio daleko veći i uključivao je i zapadne delove Evrope, kao i južne delove Sjedinjenih Američkih Država i Meksiko, međutim kao posledica intenzivnog i vekovnog progona, vuk je danas sa tih područja potpuno istrebljen (Boitani et al., 2023). Na području istorijskog rasprostranjenja u literaturi su opisane 32 podvrste vuka, od kojih je pet izumrlo (Mech, 2001). Podvrste koje imaju najveće geografsko rasprostranjenje su: *Canis lupus lupus* Linnaeus, 1758, *Canis lupus albus* Kerr, 1972, *Canis lupus campestris* Dwigubski, 1804 i *Canis lupus pallipes* Sykes, 1831 (Wilson & Reeder, 2005).

Poslednjih godina, zahvaljujući zaštiti vrste, reintrodukciji i realizaciji velikog broja konzervacionih projekata, došlo je do oporavka i povećanja broja jedinki, posebno na prostorima Evrope (Chapron et al., 2014).



Slika 2. Distribucija vuka (*Canis lupus*) u svetu. Prisustvo vuka označeno je braon bojom, zelenom bojom su označene oblasti u kojima je reintrodukovan, a crvenom područja sa kojih je iščezao (preuzeto sa www.iucnredlist.org)

1.1.2.1. Distribucija u Srbiji

Vuk je u Srbiji jedna od tri autohtone vrste kanida. Njegovo rasprostranjenje je relativno kontinuirano i obuhvata šumovite, brdske i planinske predele u istočnim, južnim i zapadnim delovima zemlje, kao i malobrojnu, izolovanu populaciju u regionu jugoistočnog Banata (Milenković et al., 2007). Prema procenama, populacija vuka je stabilna i ima tendenciju ka blagom povećanju. Procenjuje se da populacija broji oko 800 - 900 jedinki (Milenković et al., 2007).

U Srbiji su prisutne dve evropske populacije vuka i to:

- dinarsko-balkanska, koja naseljava severoistočne, istočne, južne, jugozapadne i zapadne delove zemlje i
- karpatska, čija je brojnost veoma mala, egzistira na području južnog Banata (Vršački breg i Deliblatska peščara) i Đerdapa.

Na teritoriji Srbije vuk odsustvuje jedino duž Morave, u Mačvi, Sremu, Bačkoj i centralnom i severnom Banatu. Uključujući i Kosovo i Metohiju, veličina areala vuka je procenjena na oko 53.000 km² (Milenković et al., 2007; Kaczensky et al., 2012).

1.1.2.2. Brojnost i gustina

U Evropi, vuk relativno kontinuirano naseljava južne, istočne, centralne i severne delove kontinenta, pri čemu se geografski posmatrano danas može razlikovati 10 evropskih populacija: skandinavski (koja broji između 260 i 330 vukova), karelijska (150 do 165 jedinki), baltička (870 do 1400 jedinki), centralno evropska (150 do 154 jedinki), karpatska (~ 3000 jedinki), dinarsko-balkanska (najveća i broji više od 3900 jedinki), apeninska (600 do 800 jedinki), iberijska (2200 do 2500 jedinki) i mala populacija Sijera Morena (63 do 77 vukova) (Chapron et al., 2014). Kao posledica sprovođenja brojnih projekata za oporavak populacija vuka i primene propisanih mera zaštite tokom poslednjih godina, vuk je ponovo rekolonizovao neke delove nekadašnjeg areala i značajno povećao brojnost populacija, pre svega u zapadnoj Evropi (Kaczensky et al., 2012; Chapron et al., 2014). Brojnost populacija vuka u Evropi (izuzev Belorusije i Rusije) se procenjuje na preko 21500 jedinki (Boitani et al., 2022).

1.1.3. Biologija vrste

1.1.3.1. Ishrana

Kao posledica širokog rasprostranjenja, ishrana vuka veoma varira geografski. Zavisno od dostupnosti izvora hrane može varirati i lokalno i sezonski (Newsome et al., 2014). U poređenju sa ostalim predstavnicima porodice pasa, ishrana vuka nije tako raznovrsna, jer su vukovi primarno mesojedi u čijoj ishrani dominira plen (Milenković et al., 2007). Brojne analize ishrane širom areala su pokazale da krupni i unglati srednje veličine kao što su losovi, irvasi, divlje svinje, mufloni, bizoni, jeleni i srne predstavljaju glavni plen vuka (Ansorge et al., 2006; Meriggi et al., 2011; Jędrzejewski et al., 2012). Osim spomenutih životinja, u ishrani vuka se često mogu registrovati i neke manje životinje poput dabrova, zečeva kao i različitih vrsta glodara i ptica, koje predstavljaju alternativu u slučajevima kada je brojnost divljih preživara u prirodi niska (Anderson & Ozoliņš, 2004; Lanszki et al., 2012). Tokom leta, veliki značaj u ishrani vuka ima i biljna hrana i to pre svega sezonsko voće (šljiva, kruška, bobičasto voće), a povremeno i poljoprivredne kulture (kukuruz) ali i različite trave (Milenković et al., 2007). Ishrana koja uključuje domaće životinje, lešve ili organski otpad sa deponija, karakteristična je za jako antropogeno izmenjene prostore (Ćirović & Penezić, 2019). Brojne studije ishrane pokazale su da je to najuočljivije kod vukova sa juga areala (Macdonald et al., 1980; Fico et al., 1993; Vos, 2000; Iliopoulos et al., 2009). U Srbiji su do sada sprovedene samo analize zimske ishrane, na osnovu čega je pokazano da čak 70% ishrane čine domaće životinje (krave, ovce, svinje, koze), dok divljač (divlja svinja, srna, zec) čini svega 20% konzumirane biomase (Ćirović & Penezić, 2019).

1.1.3.2. Ponašanje i reprodukcija

Vuk je životinja sa jasno izraženom socijalnom organizacijom. Naime, vuk živi u čoporu čiju osnovu čini reproduktivno aktivan roditeljski par (alfa mužjak i ženka), nekoliko jedinki iz prethodnih okota koji ne učestvuju u reprodukciji i 3 do 6 štenaca (Mech & Boitani, 2003). Takođe postoje zabeleženi slučajevi da jedinka iz drugog čopora bude prihvaćena kao novi član čopora (Mech & Boitani, 2003; Milenković et al., 2007). Mladi ostaju sa roditeljskim parom od jedne do četiri godine, nakon čega se odvajaju i kreću u potragu za svojim partnerom sa kojim formiraju teritoriju i čopor. Vuk je izuzetno teritorijalna životinja, koja brani teritoriju svog čopora od svih ostalih životinja, ostavljajući mirisne oznake svakih 200-300 metara koje služe da upozore potencijalne uljeze da ne ulaze na datu teritoriju (Harrington, 1981; Zub et al., 2003). Veličina same teritorije može varirati od nekoliko stotina pa i do nekoliko hiljada kilometara kvadratnih i zavisi pre svega od dostupnosti hrane, zatim od reproduktivnog statusa roditeljskog para, sezone kao i veličine samog čopora (Mech & Boitani, 2003). Međutim treba imati u vidu da više od 50% svoje aktivnosti vukovi provode u centralnom delu teritorije (takozvana „core area“) koji je daleko manji. Uobičajeno je da veličina centralnog dela teritorije jednog čopora iznosi 35 km² (Jędrzejewski et al., 2007).

Vukovi se pare jednom godišnje, pri čemu sezona parenja obično počinje krajem januara ili početkom februara. Za vukove je karakteristično da su monogamne životinje, ali u odgajanju mladunaca učestvuju svi članovi čopora tako što prikupljaju hranu i štite ženku i mladunce (Mech & Boitani, 2003). Mogućnost zaštite je dodatno olakšana činjenicom da se ženke sa mladima obično nalaze skrivene u centralnom delu teritorije (Mech & Boitani, 2003). Ženke se kote krajem proleća, a broj mladih u okotu obično iznosi od četiri do šest. U nekim slučajevima zabeleženo da ženke kote i preko 10 štenaca (Mech & Boitani, 2003). Štenci su po rođenju gluvi i zatvorenih očiju i teže svega 300 do 500 g. Tokom prve tri nedelje života ni mladunci ni ženka ne napuštaju jazbinu. Kada su štenci stari mesec dana počinju da im rastu mlečni zubi i prelaze na ishranu čvrstom hranom. Već početkom jeseni mladi kreću da love zajedno da ostatkom čopora. Iako vukovi dostižu polnu zrelost relativno rano (krajem prve godine), pare se najranije u drugoj godini života (Milenković et al., 2007).

1.1.3.3. Stanište

Zahvaljujući izuzetnoj ekološkoj plastičnosti vrste, vuk je generalista koji naseljava široka geografska prostranstva i najrazličitije tipove ekosistema, počev od pustinja na jugu areala, preko šumskih (lišćarske, četinarske i mešovite šume) i travnatih (stepa i prerije), pa sve do tajgi i tundri u najsevernijim delovima areala (Geptner & Naumov, 1967). U Evropi, vukovi generalno preferiraju šumska staništa u planinskim područjima, koja karakteriše malo prisutvo ljudi. U istočnim delovima kontinenta naseljavaju široka stepska prostranstva. U Srbiji kao i u ostatku Balkana, vukovi najčešće žive u šumskim predelima brdskog i planinskog pojasa (Slika 3, Slika 4), osim u na krajnjem jugoistoku Banata gde na području Deliblatske peščare naseljava šumovite ravničarske i dinske predele (Milenković et al., 2007).



Slika 3. Vuk u tipičnom šumskom staništu - planina Tara (fotozamka NP Tara)



Slika 4. Par vukova u zimskim mesecima na planini Tari (fotozamka NP Tara)

1.2. Šakal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758)

Šakal je kanida srednje veličine. Jedna je od tri autohtone kanide u fauni sisara Srbije (Savić et al., 1995). Poznat je po svojoj adaptibilnosti koja mu omogućava da živi u različitim tipovima staništa.

1.2.1. Morfološke karakteristike

Šakal pripada redu Carnivora, porodici Canidae, filogenetski je veoma blizak vuku, lisici i psu. Zlatni šakal je ime dobio po specifičnoj boji krzna koja je na bokovima zlatno-žuta, iako boja krzna može da varira u skladu sa godišnjim dobima kada poprima svetlije ili tamnije nijanse. Na leđima se smenjuju tri boje, smeđa, bela i braon (Jhala & Moehlman, 2004), dok je krzno u predelu stomaka uvek svetlije boje. Ono što izdvaja ovu vrstu od ostalih predstavnika porodice Canidae, jesu dva spojena srednja jastučeta na šapi, što im pored taksonomske odlike daje i specifičan izgled traga koji ostavljaju na podlozi.

Odlikuje ih srednja veličina tela, malo su veći od lisice, a manji od vuka. U Srbiji dužina tela sa glavom u proseku iznosi 79,7 cm, uši su prosečne dužine 7,85 cm, a rep je dugačak 24,2 cm. Težina tela mužjaka šakala je oko 12 kg, dok je kod ženki nešto manja i iznosi oko 10 kg (Ćirović et al., 2006). Visina u grebenu kod šakala je od 45-50 cm (Sillero-Zubiri et al., 2004) (Slika 5).



Slika 5. Šakal (*Canis aureus*), levo – mužjak i desno - ženka (autor: Kostin, P.)

1.2.2. Distribucija

U svetu su rasprostranjenje tri vrste šakala: zlatni (*C. aureus* Linnaeus, 1758), crnoledi (*Canis mesomelas* Schreber, 1775) i prugasti (*Canis adustus* Sundevall, 1847) (Wilson & Reeder, 2005), zlatni šakal ima najšire rasprostranjenje. Ova vrsta ima široku trofičku nišu i veoma je prilagodljiva uticaju ljudi i promenama u ekosistemu. Smatra se da su šakali kolonizovali Evropu tokom Holocena, ali je tada njihovo rasprostranjenje bilo ograničeno na svega nekoliko ostrva i obalske regione jugoistočne Evrope (Krofel et al., 2017). Iako je njegovo inicijalno rasprostranjenje bilo ograničeno na južnu Aziju i jugoistočnu Evropu, danas su šakali prisutni širom istočne i centralne Evrope, uz tendenciju brzog širenja i ka zapadnoj i severnoj Evropi (Arnold et al., 2012; Trouwborst et al., 2015; Hoffman et al., 2018; Ranc et al., 2018). Pojedinačne jedinke su primećene čak i u Francuskoj, Norveškoj, Estoniji, a od nedavno i u Španiji (Ranc et al., 2018; Sørensen & Lindsø, 2021, Stefanović et al., 2024) (Slika 6). Prisustvo ove vrste kanida registrovano je u preko 33 evropske zemlje (Hatlauf et al., 2021), međutim, Balkansko poluostrvo se često smatra centrom distribucije šakala, gde predstavlja drugu najzastupljeniju vrstu kanida (Kryštufek et al., 1997; Arnold et al., 2012; Šálek, et al., 2014). Populacija šakala počela je da raste eksponencijalno i poslednjih decenija poprima razmere ekspanzije (Trouwborst et al., 2015). O glavnim razlozima ekspanzije trenutno se intenzivno raspravlja u naučnoj zajednici, pri čemu se antropogeni izvori hrane, značajne promene u korišćenju zemljišta od strane ljudi, klimatske promene i odsustvo vukova često ističu kao najvažniji faktori koji su omogućili njegovu ekspanziju (Šálek et al., 2014; Krofel, et al., 2017; Lanszki et al., 2018). Promene areala šakala bile su veoma dinamične tokom XX veka, kako u Evropi tako i na području Srbije. Posle Drugog svetskog rata, došlo je do drastičnog pada brojnosti populacije šakala, kao posledica planskog trovanja vuka, koji su nanosili velike ekonomske štete (Arnold et al., 2012). Nakon toga usledio je period bez promene brojnosti populacije da bi osamdesetih godina XX veka došlo do brzog povećanja brojnosti i rekolonizacije staništa.



Slika 6. Distribucija šakala (*Canis aureus*) (preuzeto sa www.iucnredlist.org)

1.2.2.1. Distribucija šakala u Srbiji

U odnosu na druge kanide, tokom XX veka najmanji broj studija u Srbiji je sproveden na šakalima. Mala brojnost, sporadni nalazi, specifičan način života i ograničeno rasprostranjenje (Milenković, 1983; 1987) razlog su tome. Zahvaljujući brzom širenju koje počinje 80ih godina prošlog veka, šakal je danas široko rasprostranjena vrsta širom Srbije, sa značajnim prisustvom u Vojvodini i centralnom delu zemlje. Preferiraju rečne obale obrasle gustom vegetacijom i mozaične predele. Pogoduju im staništa kao što su močvare, šume uz reke i poljoprivredna zemljišta po obodima obrasla gustom vegetacijom gde mogu naći skrovište i hranu (Ćirović et al., 2008; Šálek et al., 2014).

1.2.2.2. Brojnost i gustina

Šakal je izuzetno prilagodljiva vrsta, kako u pogledu tipova staništa koja naseljava, tako i u pogledu dostupnih hranidbenih resursa koje koristi u svojoj ishrani. U Evropi populacija šakala i dalje raste i širi svoj areal. Ekspanzija je posebno izražena na Balkanskom poluostrvu i u jugoistočnoj Evropi (Arnold et al., 2012). Na primer, rasprostranjenost šakala u Bugarskoj se povećala 33 puta između 1962. i 1985. godine (Kryštufek et al., 1997). Prema statistici lovačkih udruženja u Srbiji i Mađarskoj populacija šakala ima eksponencijalni rast od 1980-ih (Heltai et al., 2013). Nasuprot tome, iako je poslednjih decenija prisustvo šakala zabeleženo širom centralne Evrope, u ovim delovima oni pokazuju mnogo sporiji populacioni rast (npr. u Slovačkoj; Guimarães et al., 2019), dok je u mnogim zemljama kao što su Nemačka, Švajcarska i Poljska, prisustvo šakala još uvek ograničeno na malobrojne jedinke ili pojedinačne teritorijalne grupe (Jirku et al., 2018; Kowalczyk et al., 2020; Tillmann, 2020). U ovom trenutku, teško je predvideti budući rast populacije šakala u većem delu centralne, severne i zapadne Evrope.

1.2.3. Biologija vrste

1.2.3.1. Ishrana

Za šakala je karakteristična oportunistička strategija i omnivorna ishrana (Giannatos, 2004; Sillero-Zubiri et al., 2004). Ishrana varira sezonski ali i u odnosu na geografske i klimatske uslove sredine (Lanszki & Heltai, 2002; Jhala & Moehlman, 2004; Borkowski et al., 2011; Stoyanov, 2012; Bošković et al., 2013; Penezić & Ćirović, 2014; Lanszki et al., 2015). Antropogeni izvori hrane su često najzastupljeniji u ishrani šakala (Macdonald, 1979; Giannatos et al., 2010; Borkowski et al., 2011; Rotem et al., 2011; Raichev et al., 2013; Ćirović et al., 2014a), dok su glodari zabeleženi kao najznačajniji plen u njegovoj ishrani (Taryannikov, 1974; Mukherjee et al., 2004; Lanszki & Heltai, 2010; Markov & Lanszki, 2012), a divlji unglati uglavnom zastupljeni u obliku ostataka (koža, creva i unutrašnji organi) koji ostaju nakon lova (Penezić & Ćirović, 2015). Prema studijama sprovedenim u Srbiji ishrana šakala značajno varira sezonski (Ćirović et al., 2014a; Penezić & Ćirović, 2015). Tokom leta i jeseni u ishrani dominiraju sitni sisari, beskičmenjaci i hrana biljnog porekla, dok se usled nedostatka hranidbenih resursa zimi i u proleće najčešće hrane antropogenim izvorima hrane, klaničnim otpadom i sitnim sisarima (Penezić, 2016).

1.2.3.2. Reprodukција

Šakali imaju veoma fleksibilnu socijalnu organizaciju. Mogu da žive pojedinačno, u paru ili u grupi, koja je sastavljena od mužjaka i ženke koji su monogamni i mladunaca iz prethodnih godina „pomagača“ koji im pomažu u lovu, odbrani teritorije i ishrani štenaca (Jhala & Moehlman, 2004; Sillero-Zubiri et al., 2004). Kod šakala je karakteristično da ženka i mužjak ceo životni vek provode zajedno. Svoju teritoriju

markiraju urinom i fecesom, a komunikaciju ostvaruju karakterističnom vokalizacijom (Macdonald, 1979; Jhala & Moehlman, 2004). U zavisnosti od količine dostupne hrane, varira broj članova grupe. To bi mogao biti jedan od razloga zašto socijalna organizacija kod šakala nije strogo određena. Kako bi izbegli kontakt sa ljudima, šakali svoja skloništa nalaze u staništima sa gustom vegetacijom (Giannatos, 2004). Ženka mladunce nosi oko dva meseca (od 60-63 dana), a na svet dolazi između 2 i 10 štenaca (Vassilev & Genov, 2002; Giannatos, 2004). Mladunci su dobro skriveni od ljudi i životinja u jazbinama ili logama koje su skrivene u gustom vegetaciji.

Mladunci se rađaju zatvorenih očiju, i otvaraju ih nakon deset dana od rođenja, kada počinju da im rastu i zubi (Moehlman & Hofer, 1997). Dok je ženka u periodu laktacije, koji traje otprilike dva meseca, mužjak se sa „pomagačima“ (jedinke iz prošlogodišnjih okota) stara o njoj i mladuncima. Šakali polnu zrelost stižu sa 11 meseci, kada se najčešće i odvajaju od roditelja. „Pomagači“ su jedinke koje ostaju sa roditeljima duži vremenski period, imaju odloženu reprodukciju i zahvaljujući njihovoj pomoći broj preživelih mladunaca u grupi je mnogo veći (Demeter & Spassov, 1993). Šakali su aktivni tokom sumarak i noći, dok dan uglavnom provode odmarajući se skriveni u gustom vegetaciji (Giannatos, 2004).

1.2.3.3. Stanište

Šakali su najviše prisutni u nizijskim predelima gde preferiraju blizinu reka sa gustom travnatom vegetacijom, šikarama i šibljacima koje koriste kao zaklon (Giannatos, 2004; Sillero-Zubiri et al., 2004) (Slika 7). Zbog svoje velike prilagodljivosti i velikog areala, prisutni su u različitim biotopima, od šuma umerenog pojasa, preko tropskih šuma pa sve do polupustinja. Nema ih samo u pustinjama i velikim šumskim kompleksima (Giannatos, 2004). Porastom broja populacije 80ih godina XX veka, šakali su počeli da prilaze blizu ljudskih naselja i prilagođavaju životu u blizini ljudi, pa tako danas veoma uspešno opstaju i imaju veoma velike gustine na poljoprivrednim predelima ali i u suburbanim zonama, pa čak i u urbanim sredinama (Jhala & Moehlman, 2004; Šálek et al., 2014). Širenje šakala je uglavnom išlo duž rečnih tokova. Tako se populacija šakala u Srbiji širila se dolinom Morave, Timoka, Save, Dunava, Tise i Drine (Ćirović et al., 2008).



Slika 7. Šakal u svom tipičnom staništu u Srbiji. (autor: Kostin, P.)

1.3. *Hepatozoon* sp.

Vrste roda *Hepatozoon* Miller, 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) su krvni paraziti iz radela Apicomplexa, koji se prenose vektorima (krpeljima, grinjama, peščanim mušicama, cece muovama, komarcima, buvama, vašima, stenicama, pijavicama) i imaju veoma složen životni ciklus (Smith, 1996; Baneth, 2011). Kičmenjaci služe kao intermedijarni domaćini, a hematofagni zglavkari kao što su krpelji, grinje i buve služe kao konačni domaćini i vektori ovih parazita (Baneth et al., 2007; Merino et al., 2014; Valkiūnas et al., 2016; Cardoso et al., 2022). Za razliku od drugih vektorima prenosivih patogena, transmisija vrsta roda *Hepatozoon* se ne postiže putem krvi (hranjenjem artropoda na domaćinu kičmenjaku), već se infekcija odvija kada intermedijarni domaćin proguta konačnog domaćina - ingestijom. Međutim, kod ovog parazita opisani su i putevi prenosa koji nisu vektorski. Za neke vrste roda *Hepatozoon*, kao što je *H. americanum* Vincent-Johnson, 1997 (parazitira na kanidama), *H. sipedon* Smith, Desser et Martin, 1994 (parazitira na gmizavcima), *H. caimani* Carini, 1909 (parazitira na krokodilima i kajmanima) i *H. ayorgbor* Sloboda, 2007 (parazitira na zmijama), prenošenje se može odvijati putem ishrane zaraženim plenom (Smith et al., 1994; Lainson et al., 2003; Sloboda et al., 2008; Johnson et al., 2009a, 2009b; Viana et al., 2012) ili u slučaju *H. canis* (parazitira na kanidama) i *Hepatozoon* sp. koji parazitira na zmiji *Thamnophis elegans* Baird & Girard, 1853, opisan je vertikalni prenos (Murata et al., 1993; Kauffman et al., 2017; Hodžić et al., 2018a; Schäfer et al., 2022a).

Patogenost vrsta roda *Hepatozoon* kod divljih životinja kao što su kanide (Cardoso et al., 2014; Mierzejewska et al., 2021), felide (Hodžić et al., 2017) i mustelide (Simpson et al., 2005) je niska, iako se u slučaju koinfekcija sa na primer bakterijama, mogu javiti teške manifestacije bolesti (Alić et al., 2021). Prisustvo parazita iz roda *Hepatozoon* kod divljih životinja je veoma značajno zbog potencijalnog prenošenja na domaće životinje. Poznato je da infekcija vrstama roda *Hepatozoon* kod pasa i mačaka može da izazove subkliničke kao i teške oblike bolesti, koji se mogu pogoršati istovremenom infekcijom sa drugim hemoparazitima i bakterijama (Baneth et al., 1998; Vojta et al., 2009; Baneth, 2011; Otranto et al., 2011; Chhabra et al., 2013; Kruzeniski et al., 2013; Lloret et al., 2015; Kegler et al., 2018; Lilliehöök et al., 2019; Grillini et al., 2021; Schäfer et al., 2022b).

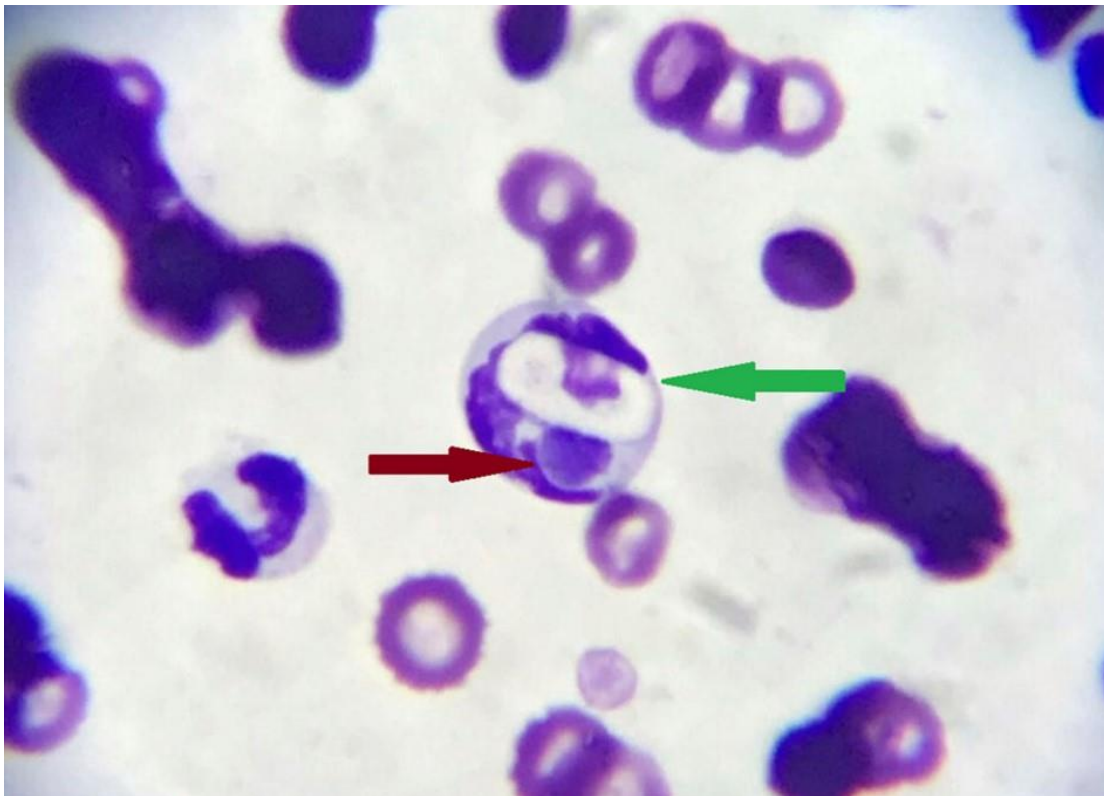
Do pre decenije preovladavale su histološke metode u karakterizaciji krvnih parazita, sa nekoliko izuzetaka (Criado-Fornelio et al., 2006; Johnson et al., 2007; Soares Ferreira Rodrigues et al., 2007; Gimenez et al., 2009; Allen et al., 2011). Početkom druge dekade ovog veka počinju da se koriste se uglavnom molekularne metode u te svrhe (de Waal, 2012). Identifikacija je bazirana na amplifikaciji male subjedinice fragmenta gena ribozomske RNK (18S rRNA). Nekoliko novih vrsta roda *Hepatozoon* je upravo opisano ovom metodom kod evropskih divljih i domaćih sisara, pri čemu je većina studija bila fokusirana na karnivorama (Criado-Fornelio et al., 2009; Duscher et al., 2015). Tako je *H. silvestris* Hodžić, 2017 (*H. felis*) detektovan kod evropskih divljih mačaka (*Felis silvestris* Schreber, 1775) u Bosni i Hercegovini (Hodžić et al., 2017; Hodžić et al., 2018b), Španiji (Ortuño et al., 2022) i Mađarskoj (Hornok et al., 2022) i kod domaćih mačaka iz Italije (Giannelli et al., 2017; Grillini et al., 2021). Takođe, *H. martis* Hodžić, 2018 je registrovan kod mustelida iz Bosne i Hercegovine i Hrvatske (Hodžić et al., 2018c), Mađarske (Hornok et al., 2022) i Španije (Ortuño et al., 2022) i kod divljih mačaka iz Španije (Barandika et al., 2016; Ortuño et al., 2022), *H. ursi* Kubo, 2008 kod mrkih medveda (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) iz Turske (Akyuz et al., 2020) i *Hepatozoon* sp. kod kune zlatice (*Martes martes* Linnaeus, 1758) iz Škotske (Simpson et al., 2005). Pri tome kod divljih kanida kao što su lisice (*Vulpes vulpes*) (Cardoso et al., 2014; Mitková et al., 2016; Criado-Fornelio et al., 2018; Mierzejewska et al., 2021; Ortuño et al., 2022), vukovi (*C. lupus*) (Battisti et al., 2020; Hodžić et al., 2020) i šakali (*C. aureus*) (Farkas et al., 2014), prevalencije *H. canis* utvrđene molekularnim metodama mogu biti visoke. Nasuprot tome, prevalencija *H. canis* kod domaćih pasa (Helm et al., 2020; Dordio et al., 2021) i mačaka (Criado-Fornelio et al., 2009; Giannelli et al., 2017) je generalno mnogo niža.

Suprotno kanidama, širom sveta je urađeno samo nekoliko studija koje se odnose na preživare ili krpelje prikupljene na njima, koji su testirani na prisustvo vrsta iz roda *Hepatozoon*. *Hepatozoon canis* je detektovan kod kamila iz Saudijske Arabije (Alanazi et al., 2020), krpelja prikupljenih sa koza u Kini (Li et al., 2020) i Rumuniji (Andersson et al., 2017a), dok je studija na krpeljima prikupljenih sa stoke u Pakistanu utvrdila prisustvo ovog parazita do nivoa roda (Ghafar et al., 2020). Prema dosadašnjim saznanjima, nisu dostupne informacije o prisustvu vrsta roda *Hepatozoon* kod vrsta iz reda Lagomorpha. Izuzetak je samo jedna studija iz Španije u kojoj je *Hepatozoon* sp. registrovan kod zečeva (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) (Gimenez et al., 2009). Kod glodara, vrste roda *Hepatozoon* su zabeležene na širem prostoru Evrope - u Finskoj, Estoniji i zapadnoj Rusiji (Laakkonen et al., 2001), Litvaniji (Baltrūnaitė et al., 2020), Poljskoj (Bajer et al., 2001; Pawelczyk et al., 2004; Bajer et al., 2014), Mađarskoj (Rigó et al., 2016), Češkoj (Modrý et al., 2021), Slovačkoj (Hamšíková et al., 2016), Velikoj Britaniji (Healing, 1981; Turner, 1986; Watkins & Nowell, 2003; Simpson et al., 2006), Nemačkoj (Walter et al., 1980; Galfsky et al., 2019), Austriji (Sebek et al., 1980) Turskoj (Usluca et al., 2019), Španiji (Criado-Fornelio et al., 2006) i Srbiji (Veinović et al., 2024). U nekim studijama vezanim za glodare predstavnici roda *Hepatozoon* identifikovani su do nivoa vrste. Tako je kod voluharica (*Myodes=Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) često detektovan *H. erhardovae* Krampitz, 1964 (Sebek et al., 1980; Walter et al., 1980; Turner et al., 1986; Bajer et al., 2001; Laakkonen et al., 2001; Bajer et al., 2014; Hamšíková et al., 2016; Rigó, et al., 2016), u manjoj meri *H. sciuri* Coles, 1914 kod

crvene veeverice (*Sciurus vulgaris* Linnaeus, 1758) (Modrý et al., 2021), a *H. griseisciuri* Clark, 1958 kod sive veeverice (*Sciurus carolinensis* Gmelin, 1788) (Watkins & Nowel, 2003), dok je *H. lavieri* Tuzet & Grjebine, 1957 indentifikovan kod poljskih voluharica (*Microtus arvalis* Pallas, 1779) (Pawelczyk et al., 2004). Podaci o prisustvu vrsta roda *Hepatozoon* kod evropskih vrsta krpelja su takođe oskudni, a nalazi su samo sporadični (Uiterwijk et al., 2023).

1.3.1. *Hepatozoon canis*

Hepatozoon canis je patogena protozoa koja izaziva hepatozoonozu koja najčešće nastaje kada životinje gutanjem (ingestijom) unesu zaražene vektore, npr. krpelje (Baneth et al., 2003). Slučajevi *H. canis* infekcija prijavljeni su kod pasa i drugih kanida iz različitih regiona širom sveta (Pacifco et al., 2020; Tołkacz et al., 2023, Hasani et al., 2024; Thomas et al., 2024). Hepatozoonoza je uglavnom asimptomatska bolest, ali može izazvati groznicu, anemiju, gubitak težine i limfadenomegaliju u različitim kombinacijama u zavisnosti od nivoa parazitemije (Baker et al., 2023; Kaya & Baydar, 2024; Khalifa & Attia, 2024)



Slika 8. Krvni razmaz sa prisustvom gametocita *Hepatozoon canis* u neutrofilima (označeno zelenom strelicom). Normalni neutrofili se mogu videti na periferiji. Prema: Sukara et al., 2023.

1.3.1.1. Distribucija *Hepatozoon canis*

Dve vrste protozoa iz roda *Hepatozoon*, *H. canis* i *H. americanum* inficiraju pse. *Hepatozoon canis* ima kosmopolitsku distribuciju i zabeležen je u različitim regionima južne Evrope, Amerike, Afrike i Azije, dok je *H. americanum* ograničen na Novi svet (Götsch et al., 2009, Abd Rani et al., 2011., Baneth, 2011, Dantas-Torres et al., 2011, Otranto et al., 2011) (Slika 9). Hepatozoonoza je kosmopolitska bolest pasa čiji se uzročnici prenose vektorima, uglavnom iksoidnim krpeljima. Infekcija kod pasa izazavana sa *H. canis* je inicijalno opisana u Indiji još početkom XX veka (James, 1905). Prisustvo *H. canis* je najčešće

registoravno kod pasa na Mediteranu, a nedavno je detektovano u Južnoj i Severnoj Americi (Baneth, 2011; Andersson et al., 2017a; Andersson et al., 2017b; Dantas-Torres et al., 2017; Ciuca et al., 2021). Širenje *H. canis* u Evropi je verovatno rezultat širenja njegovog glavnog iksodidnog vektora (*R. sanguineus*) ka severu, što je verovatno posledica klimatskih promena (Dantas-Torres et al., 2015b; Dantas-Torres et al., 2017; Hansford et al., 2018). Prvi slučajevi infekcija sa *H. canis* u centralnoj Evropi prijavljeni su kod pasa u Mađarskoj (Hornok et al., 2013), Ukrajini (Hamel et al., 2013), Češkoj (Mitková et al., 2016) i Nemačkoj (Helm et al., 2020), uprkos odsustvu utvrđenih populacija *R. sanguineus* u tim zemljama. Introdokovani slučajevi *H. canis* su takođe bili nedavno identifikovani u Velikoj Britaniji i Srbiji (Attipa et al., 2018, Sukara et al., 2023).

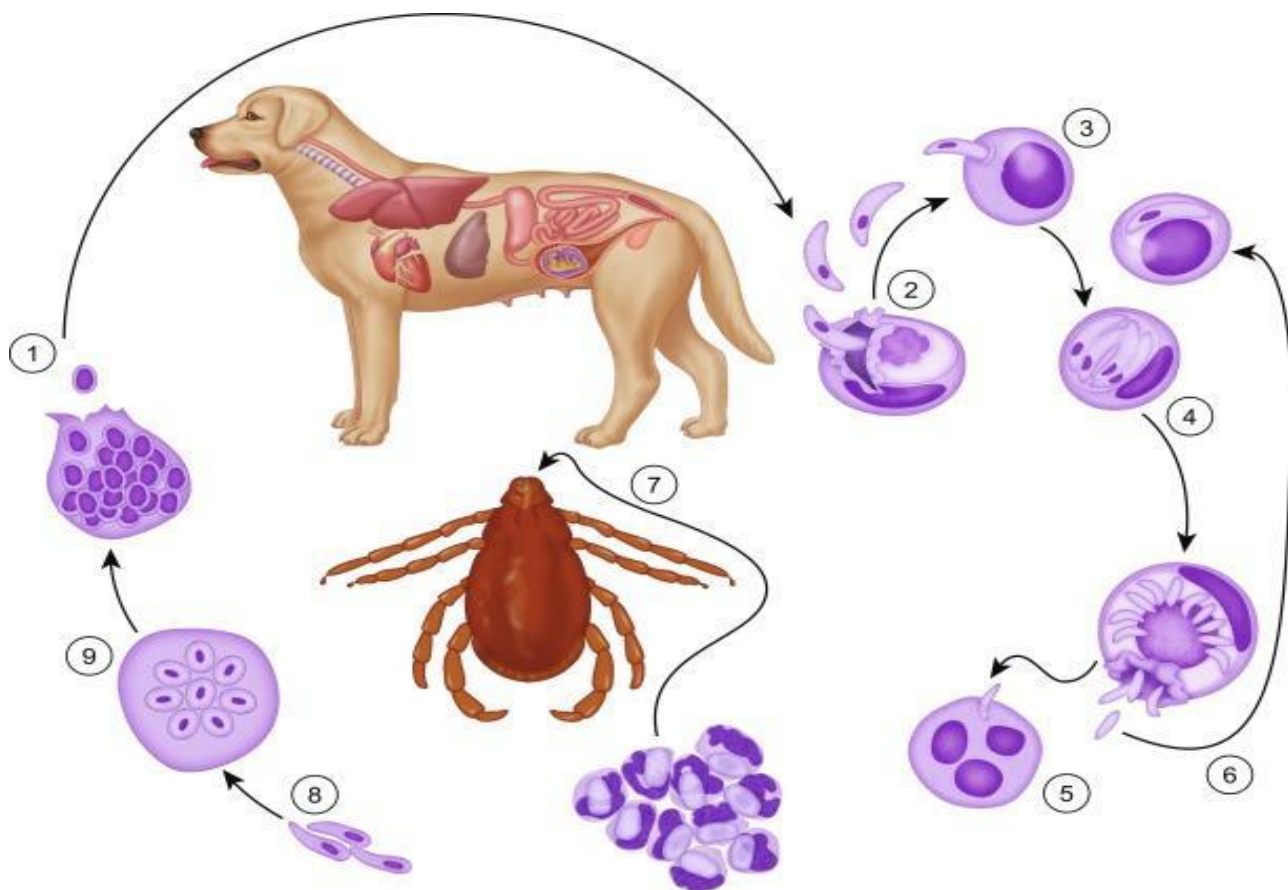
Patogen je prisutan i kod divljih kanida. U do sada objavljenim studijama registrovane su iznenađujuće visoke prevalencije *H. canis* u populacijama divljih kanida u centralnoj Evropi, uključujući lisice (Majláthová et al., 2007; Karbowski et al., 2010; Duscher et al., 2014a; Najm et al., 2014; Hodžić et al., 2015; Hodžić et al., 2018a; Helm et al., 2020; Mierzejewska et al., 2021), šakale (Duscher et al., 2014b; Farkas et al., 2014) i vukove (Hodžić et al., 2020). Do sada je u većem broju evropskih zemalja registrovano prisustvo *H. canis* u divljim populacijama: kod lisica u Španiji (Criado-Fornelio et al., 2003; Criado-Fornelio et al., 2006; Ortuño, et al., 2022;), Slovačkoj (Majláthová et al., 2007), Portugaliji (Cardoso et al., 2014), Italiji (Gabrielli et al., 2010; Ebani et al., 2017; Battisti et al., 2020; Sgroi et al., 2021; Ebani et al., 2022), Hrvatskoj (Dezdek et al., 2010), Nemačkoj (Helm et al., 2020), Francuskoj (Medkour et al., 2020), Mađarskoj (Baneth et al., 2011; Farkas et al., 2014; Tolnai et al., 2015), Austriji (Duscher et al., 2014a; Hodžić et al., 2018a), Bosni i Hercegovini (Hodžić et al., 2015), Češkoj (Mitková et al., 2016; Lesiczka et al., 2023), Srbiji (Juwaid et al., 2019) i Poljskoj (Mierzejewska et al., 2021). Registrovane prevalencije su se kretale u veoma velikom rasponu, od 5,1% u Italiji (Battisti et al., 2020) do 92% u Francuskoj (Medkour et al., 2020). Informacije o infekcijama izazavanim *H. canis* kod vuka su veoma oskudne. Do sada je poznato da je prisustvo *H. canis* zabeleženo u Italiji (Battisti et al., 2020) i Nemačkoj (Hodžić et al., 2020) sa prevalencijom od 46% (Hodžić et al., 2020) i 75% (Battisti et al., 2020). *H. canis* je identifikovan kod jednog šakala u Austriji (Duscher et al., 2013), dok je u populaciji u Mađarskoj registrovan sa prevalencijom od 60% (Farkas et al., 2014).



Slika 9. Rasprostranjenje *Hepatozoon canis* (plavo) i *Hepatozoon americanum* (crveno). Prema: Vincent-Johnson et al., 2022.

1.3.1.2. Životni ciklus *Hepatozoon canis*

Složen životni ciklus *H. canis* se odvija između kičmenjačkih i artropodnih domaćina. U kičmenjačkom domaćinu se odvija aseksualna reprodukcija patogena, dok se u krpelju odvija seksualna reprodukcija. Psi i divlje kanide se inficiraju sa *H. canis* ingestijom krpelja ili delova krpelja koji sadrže zrele oociste sa infektivnim sporozoitima. Sporozoiti *H. canis* se oslobađaju u gornjem delu gastrointestinalnog trakta, prodiru u zid creva i dospevaju u krv ili limfu (Baneth et al., 2007). *Hepatozoon canis* meronti se razvijaju u tkivima psa i mogu se naći u limfnim organima (npr. slezini i limfnim čvorovima), koštanoj srži i jetri već 13 dana nakon infekcije (Baneth et al., 2001). Mikromerozoiti prodiru u leukocite, obično neutrofile i monocite, u kojima sazrevaju do stadijuma gamonta, koji se detektuje u cirkulišućim leukocitima pasa sa parazitacijom, od 28. dana nakon infekcije (Baneth et al., 2007). Krpelji tokom ingestije krvnog obroka unose gamonte u svoje telo (Baneth et al., 2007). Kod krpelja gametogenezu prati sporogonija, koja se odvija unutar hemocela krpelja (Baneth et al., 2007). Životni ciklus se može završiti u roku od oko 81 dan (Baneth et al., 2007) (Slika 10).



Slika 10. Životini ciklus *Hepatozoon canis*: (1) infekcija se dešava kada pas proguta krpelja koji nosi *H. canis*; (2) oslobađanje sporozoit; (3) infekcija monocita i makrofaga; (4) formiranje meronta i aseksualna reprodukcija patogena- merogonija (šizogonija); (5) oslobađanje merozoita, infekcija neutrofilnih granulocita i monocita; (6) patogen može ponoviti ciklus aseksualne reprodukcije; (7) krpelj je zaražen prilikom sisanja krvi sa zaražene životinje; (8) bela krvna zrnca oslobađaju muške i ženske gamonte u crevima krpelja, sledi faza seksualne reprodukcije- gametogonija; (9) formira se zigot. Zigot se dalje deli, što rezultira oocistima u telesnoj šupljini krpelja. Prema: Saari et al., 2018.

1.3.1.3. Vektori *Hepatozoon canis*

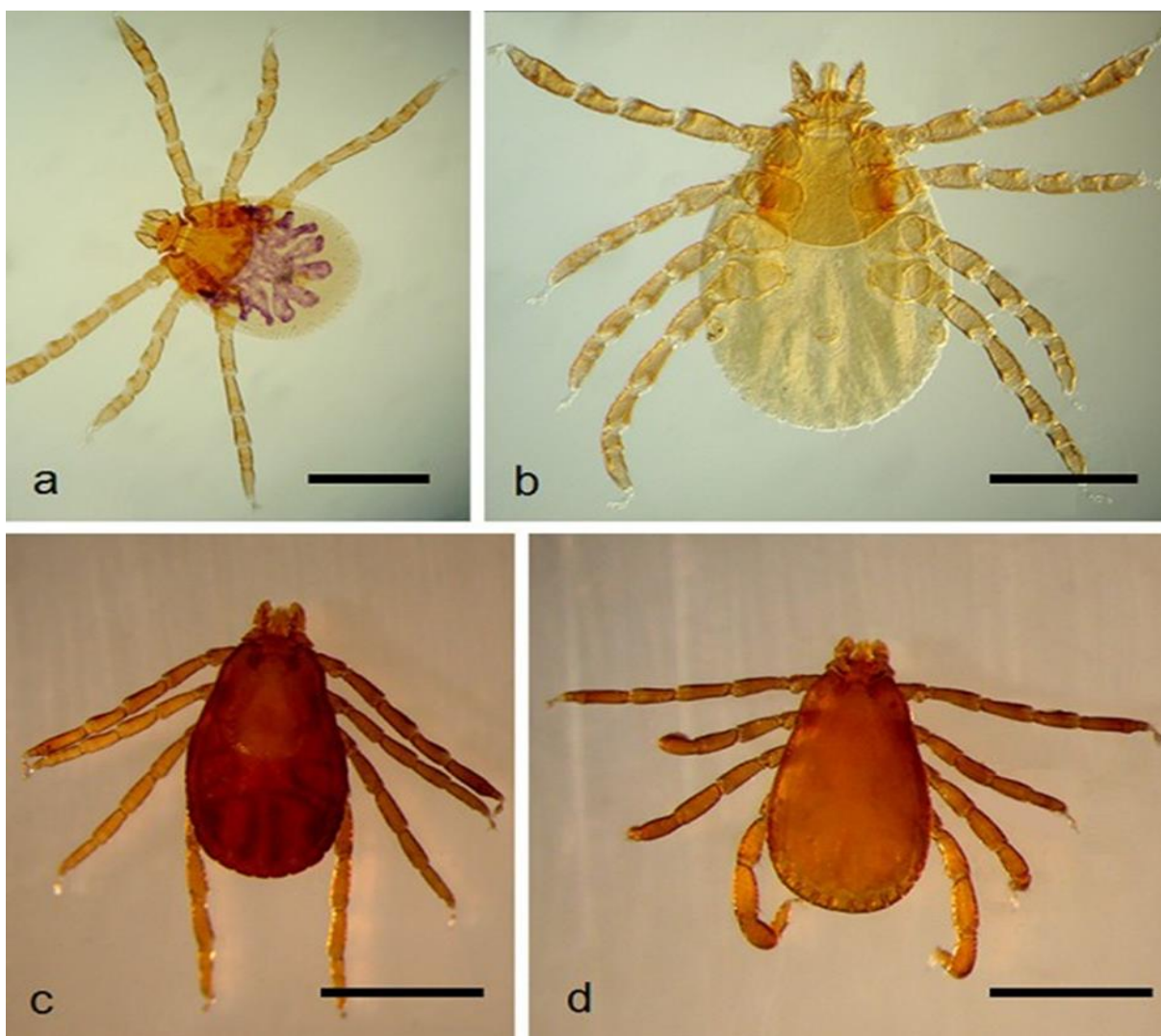
Krpelji su obligatni hematofagni ektoparaziti koji infestiraju kopnene kičmenjake (de la Fuente, 2008). Pored komaraca, krpelji su globalno najznačajniji vektori velikog broja patogena (virusa, bakterija, protozoa) uzročnika različitih zaraznih bolesti (Jongejan & Uilenberg, 2004; Colwell et al., 2011). Patogeni koje prenose krpelji se održavaju u prirodi kroz enzooske cikluse, koji, pored vektora, uključuju i kičmenjake kao domaćine i njihove prirodne rezervoare. Identifikacija elemenata enzooskih ciklusa i poznavanje njihovih ekoloških odnosa je od ključnog značaja za razumevanje epizootologije i epidemiologije bolesti koje prenose krpelji. Divlje kanide, pre svega lisica, šakal i vuk, kao pogodni domaćini za veliki broj ektoparazita, imaju značajnu ulogu u održavanju vektorima prenosivih bolesti.

Iako je prisustvo *H. canis* utvrđeno tek kod nekoliko vrsta krpelja (npr. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1888, *Amblyomma ovale* Koch, 1844, *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 i *Haemaphysalis flava* Neumann, 1897) (Murata et al., 1995, Rubini et al., 2009, de Miranda et al. 2011), smeđi pseći krpelj *R. sanguineus* smatra se najvažnijim vektorom ovog patogena širom sveta (Dantas-Torres, 2008, Baneth, 2011) (Slika 11). Nakon infekcije protozoama u stadijumu nimfe, odrasle jedinke

R. sanguineus mogu preneti *H. canis* na pse, ubrzo nakon sporogonije (Baneth et al., 2007). Larve krpelja *R. sanguineus* se mogu zaraziti *H. canis* tokom svog prvog krvnog obroka na pozitivnom domaćinu. Zreli oblici (oociste koje sadrže sporozoite) se razvijaju u tek formiranim nimfama, što ukazuje na transtadijalni put transmisije (Giannelli et al., 2013). Takođe, dokazana je transstadijalna transmisija *H. americanum* kod krpelja *Amblyomma maculatum* Koch, 1844, sa nasisane larve na nimfu (Ewing et al., 2002). Druge vrste krpelja kao npr. *H. flava* i *H. longicornis* su bili prijavljeni kao mogući vektori *H. canis* u Japanu (Murata et al., 1995). Štaviše, eksperimentalno je dokazano da je krpelj *A. ovale* potencijalni vektor *H. canis* u Brazilu (Forlano et al., 2005). De Miranda et al., 2011 su utvrdili prisustvo oociste *H. canis* u hemolimfi prirodno inficiranih *R. (Boophilus) microplus* uklonjenih sa zaraženog psa. Pored toga, otkrivena je DNK poreklom od *H. canis* kod *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758 krpelja iz Italije (Gabrielli et al., 2010) i Luksemburga (Reye et al., 2010).

Podaci o vrstama roda *Hepatozoon* kod evropskih vrsta krpelja mogu se naći sporadično u literaturi. Dugo se verovalo da je *R. sanguineus* sensu lato jedini poznati vektor *H. canis* u Evropi kao i mnogih drugih vrsta iz roda *Hepatozoon* (Farkas et al., 2014; Tolnai et al., 2015; Mitkova et al., 2016; Geurden et al., 2018;). Nedavni nalazi *Hepatozoon* sp. kod drugih vrsta krpelja otvaraju nova pitanja o njihovim vektorskim ulogama. Ti nalazi uključuju *H. canis* kod *I. ricinus*, *I. canisuga* Johnston, 1849, *I. hexagonus* Leach, 1815 i *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 na lisicama u Nemačkoj (Najm et al., 2014), u *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844 sakupljenih sa psa u Poljskoj (Hornok et al., 2013) i *I. ricinus* sakupljenim na kozama, psima, lisicama i mačkama u Rumuniji (Andersson et al., 2017a). Takođe, prisustvo *H. canis* je utvrđeno u krpeljima *I. ricinus* u Slovačkoj i Češkoj (Hamšíková et al., 2016) i u krepeljima *R. turanicus* prikupljenim sa zaraženih lisica u Italiji (Giannelli et al., 2017).

Uiterwijk et al., (2023) su u svojoj studiji detektovali *H. canis* ne samo kod *R. sanguineus*, već i kod *D. reticulatus*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. canisuga* i *I. ventalloi* Gil Collado, 1936, pa se može pretpostaviti da i druge vrste krpelja osim *R. sanguineus* takođe mogu biti konačni domaćini u životnom ciklusu *H. canis* (Gabrielli et al., 2010; Najm et al., 2014). Međutim, potvrda prisustva DNK patogena u krpelju ne znači nužno da je neka vrsta krpelja i rezervoar tog patogena, odnosno da krpelj može preneti infekciju (Haji et al., 2023). Shodno tome, kako bi se rasvetlili potencijalni rezervoari patogena u budućnosti je neophodno sprovođenje studija transmisije patogen.



Slika 11. Razvojni stadijumi krpelja *Rhipicephalus sanguineus*. a: larva (postavljena u Hojerovom medijumu; veličine = 400 μ m). b: nimfa (postavljena u Hojerovom medijumu; veličine = 0,5 mm). c: ženka (veličine = 1 mm). d: mužjak (veličine = 1 mm). Prema Dantas-Torres, 2010.

1.3.1.4. Divlje kanide kao rezervoari *Hepatozoon canis*

Divlje kanide su prepoznate kao važni domaćini za niz vektorski prenosivih patogena, te kao takve mogu poslužiti za epidemiološki nadzor (Aguirre, 2009; Tomassone et al., 2018). Takođe, prethodne faunističke studije potvrđuju da više vrsta krpelja parazitira na divljim kanidama u Evropi (Tomanović et al., 2013b; Gherman & Mihalca, 2017). Zbog veličine svog areala i gustine populacija šakali i lisice imaju najveći epidemiološki značaj među divljim kanidama kao rezervoari velikog broja vektorski prenosivih patogena, uzročnika zoonoznih i nezoonoznih zaraznih bolesti (Sukara et al., 2018; Juwaid et al., 2019; Ebani et al., 2023; Lesiczka et al., 2023; Tsokana et al., 2024). Uprkos porastu populacije i trenutnoj ekspanziji šakala na području jugoistočne Evrope, kao i njihovoj sklonosti da se približe naseljima (Trouwborst et al., 2015), malo je studija na prostoru Evrope koje su u fokusu imale ulogu šakala u održavanju i širenju uzročnika zoonoza (Ćirović et al., 2014b; Mitková et al., 2017; Sukara et al., 2018). Takođe, iako su lisice najzastupljeniji predatori u celoj Srbiji (Ćirović, 2000) uloga lisica u enzootskim ciklusima vektorski prenosivih zoonoza u našoj zemlji je još uvek slabo razjašnjena (Juwaid et al., 2019).

Lisice imaju možda i ključnu ulogu u kruženju patogena između divljih životinja, kućnih ljubimaca, domaćih životinja i ljudi. Razlozi za to su sve veća brojnost i gustina populacija nakon uspešno izvršene peroralne vakcinacije lisica (Duscher et al., 2015). Takođe, njihova podložnost patogenima, preferencija ka malim sisarima kao najznačajnijem plenu (Lanszki et al., 2006), što podrazumeva čestu ingestiju krpelja kao intermedijarnog domaćina. Sinantropni načina života koji podrazumeva život u blizini ljudskih naselja kao i u samim urbanim područjima lisicu čini važnom u ciklusima transmisije patogena (Wandeler et al, 2003, Deplazes et al, 2004, Duscher et al, 2005, Duscher et al, 2006, Torina et al, 2013). Veća gustina populacije i veća prisutnost u ljudskim naseljima posledično povećavaju stope kontakta među lisicama, domaćim životinjama i ljudima, a samim tim i rizik od prenosa patogena, kako na domaće životinje, tako i na ljude (Romig et al, 1999, Duscher et al, 2006). Zbog toga su lisice odgovorne za prenošenje širokog spektra vektorski prenosivih bolesti u Evropi (Hodžić et al., 2015). *Hepatozoon canis* je najčešće detektovan u populacijama lisice.

Poslednjih godina beleži se eksponencijalni rast populacije šakala u Srbiji. Areal šakala obuhvata čitavu teritoriju Srbije (Ćirović et al., 2008), a lokalne populacije imaju jednu od najvećih gustina na Balkanskom poluostrvu (Šálek et al., 2014). Istraživanja sprovedena na Balkanu su pokazala da u ishrani šakala dominiraju antropogeni izvori hrane (Bošković et al., 2013; Penezić & Ćirović, 2015). Ova oportunistička strategija ishrane može biti razlog asociranosti šakala sa ljudskim naseljima (Rotem et al., 2011). Ove životinje su sposobne da ishranom uklone značajnu količinu životinjskog otpada te pružaju značajne ekosistemske usluge (Ćirović et al., 2016). Međutim, važno je razmotriti i potencijalnu ulogu ove vrste u transmisiji vektorski prenosivih bolesti. Uprkos njihovoj masovnoj ekspanziji u Evropi i očiglednoj tendenciji približavanja ljudskim naseljima, tek nekoliko studija je analiziralo potencijalnu ulogu ove vrste u prenošenju parazita i/ili zaraznih bolesti (Széll et al., 2013; Ćirović et al., 2014b, 2015a; Lalošević et al., 2016; Mitková et al., 2017). Studije u Evropi potvrdile su prisustvo sledećih vrsta krpelja koje parazitiraju na šakalima: *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *I. canisuga*, *D. reticulatus*, *D. marginatus* Sulzer, 1776, *H. punctata* Canestrini & Fanzago, 1878, *H. concinna* Koch, 1844 i *R. sanguineus* s.l. (Duscher et al., 2013; Hornok et al., 2013; Farkas et al., 2014; Stojanov et al, 2014; D'Amico et al., 2017). Sve ove navedene vrste krpelja su zabeležene u Srbiji, a u njima su detektovane i različite vrste patogena koje oni mogu prenositi (Milutinović et al., 1996; Milutinović et al., 2008; Tomanović et al., 2013a, 2013b; Potkonjak et al., 2016). Studija sprovedena u Srbiji potvrdila je prisustvo *Babesia canis* Piana & Galli-Valerio, 1895 i *Anaplasma phagocytophilum* Foggie, 1949 kod šakala kao i *B. microti* França, 1912, *Borrelia* sp. i *A. marginale* Theiler, 1910 u krpeljima sakupljenih sa šakala (Sukara et al., 2018).

Slično drugim divljim vrstama kanida, poput lisica i šakala, vuk takođe može igrati važnu ulogu u epidemiologiji patogena koji se prenose krpeljima zbog njihove slične biološke i ekološke plastičnosti, velikog areala (Chapron et al., 2014), kao i velikih distanci koje prelazi (Ražen et al., 2016; Byrne et al., 2018.; Joly et al., 2019). Oni su vršni predatori i generalisti po pitanju izbora staništa, sposobni da migriraju na veoma velike udaljenosti koje mogu biti i veće od 1500 km (Ražen et al., 2016; Joly et al., 2019). Tokom ovih migracija, vukovi su izloženi različitim krpeljima i patogenima, a koji se zatim mogu raširiti u nova područja daleko od izvorne populacije. Na taj način vukovi mogu prenositi patogene na velike udaljenosti bilo preko njihovih vektora (npr. krpelja) koji parazitiraju na njima, ili kao rezervor istih tih patogena.

1.3.1.5. Putevi transmisije *Hepatozoon canis*

Putevi transmisije *H. canis* još uvek nisu dovoljno razjašnjeni. Dosadašnji nalazi ukazuju da je najčešći put transmisije *H. canis* ingestijom zaraženog krpelja i to smeđeg psećeg krpelja *R. sanguineus* koji je glavni vektor ovog patogena (Dantas-Torres & Otranto, 2015a). *Hepatozoon canis* infekcija varira od asimptomatske kod naizgled zdravih životinja, do teške i potencijalno smrtonosne bolesti koja izaziva

ekstremnu letargiju, kaheksiju i anemiju. Najčešće se javlja blaga klinička slika i obično je udružena sa niskim nivoom parazitacije *H. canis* (1-5% inficiranih neutrofila). Teška klinička slika registrovana je kod pasa sa visokom parazitacijom, koja najčešće inficira 100% neutrofila periferne krvi (Baneth & Weigler, 1997). Visok nivo parazitacije je često praćen sa ekstremnim dostizanjem neutrofilije (čak 150 000 neutrofila/ml krvi). Psi sa leukocitozom i visokom parazitacijom mogu imati veliki broj cirkulišućih parazita sa preko 50 000 gamonta/ml krvi. Ovakva parazitacija podrazumeva veliki broj meronta u tkivima, i utiče na domaćina tako što troši hranljive materije i izaziva direktna oštećenja zahvaćenih tkiva, što dovodi do ekstremnog gubitka težine i kaheksije. Međutim, čini se da većina pasa (životinja) zaraženih *H. canis* imaju subkliničku infekciju pri malim opterećenjem parazitima (Baneth et al., 1996).

Postoje i drugi načini prenosa ovog patogena. Vertikalni prenos *H. canis* opisan je kod pasa i lisica (Murata et al., 1993; Hodžić et al., 2018a; Schäfer et al., 2022a). Intrauterini prenos *H. canis* potvrđen je u studiji iz Japana, u kojoj su *H. canis* gamonti detektovani u brisevima periferne krvi kod 23 od 29 štenaca (79%) koji su poreklom iz šest okota, na 16 do 60 dana nakon rođenja (Murata et al., 1993). Takođe, kod četvorogodišnje skotne ženke transportovane iz Italije (Sardinija) u Nemačku koja je pokazivala znake letargije i tahipenije, PCR metodama je potvrđeno prisustvo *H. canis*. Ženka i sedam preživelih štenaca bili su pozitivni na *H. canis* dva meseca nakon porođaja, a kod jednog mrtvorodenog šteneta, slezina, pupčana vrpca i amnionska tečnost bili su pozitivni na *H. canis* (Schäfer et al., 2022a). Ovi rezultati potvrđuju da je vertikalni prenos mogući put infekcije *H. canis* kod pasa, a verovatno i kod svih divljih kanida. Studija na lisicama u Austriji pokazala je na slučaju jedne skotne ženke da su dva fetusa od ukupno šest bila pozitivna (33,3%) na *H. canis*. DNK sekvenciranje potvrdilo je da su i fetusi i skotna lisica zaraženi istim haplotipom *H. canis*, što ukazuje na moguću intrauterinu infekciju (Hodžić et al., 2018a). Ovaj vid transmisije sa majke na potomstvo, ukazuje na važnu ulogu ženki koje transplacentalno inficiraju svoje potomstvo, i tako i na dalje širenje patogena u prirodi. Za neke vrste roda *Hepatozoon* potvrđen je prenos ingestijom zaraženog plena (Smith et al., 1994; Lainson et al., 2003; Sloboda et al., 2008; Johnson et al., 2009a, 2009b; Viana et al., 2012), iako za *H. canis* ovaj vid transmisije još uvek nije potvrđen.

2. CILJEVI

Osnovni cilj doktorske disertacije je analiza značaja šakala (*Canis aureus*) i vuka (*Canis lupus*) kao potencijalnih rezervoara uzročnika hepatozoonoze koju prenose krpelji. Proučavanje prisustva patogena u domaćinu prvi je korak u determinaciji elemenata ciklusa kruženja krpeljima prenosivog patogena (*Hepatozoon canis*) i identifikaciji potencijalnih žarišta hepatozoonoze koju oni uzrokuju.

Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije imaju za cilj:

- da se utvrde prevalencije patogena *Hepatozoon canis* u populacijama šakala i vuka
- da se utvrdi prostorna distribucija prisustva ovog patogena u populacijama ove dve karnivore u Srbiji
- da se utvrdi genetička varijabilnost sojva *Hepatozoon canis* koji cirkulišu u populacijama šakala i vuka
- da se utvrdi epidemiološki značaj šakala i vuka za *Hepatozoon canis* kod nas
- da se analiziraju faktori (abiotički i biotički) koji utiču na prisustvo i zastupljenost patogena *Hepatozoon canis* u populacijama šakala i vuka.

3. MATERIJAL I METODE

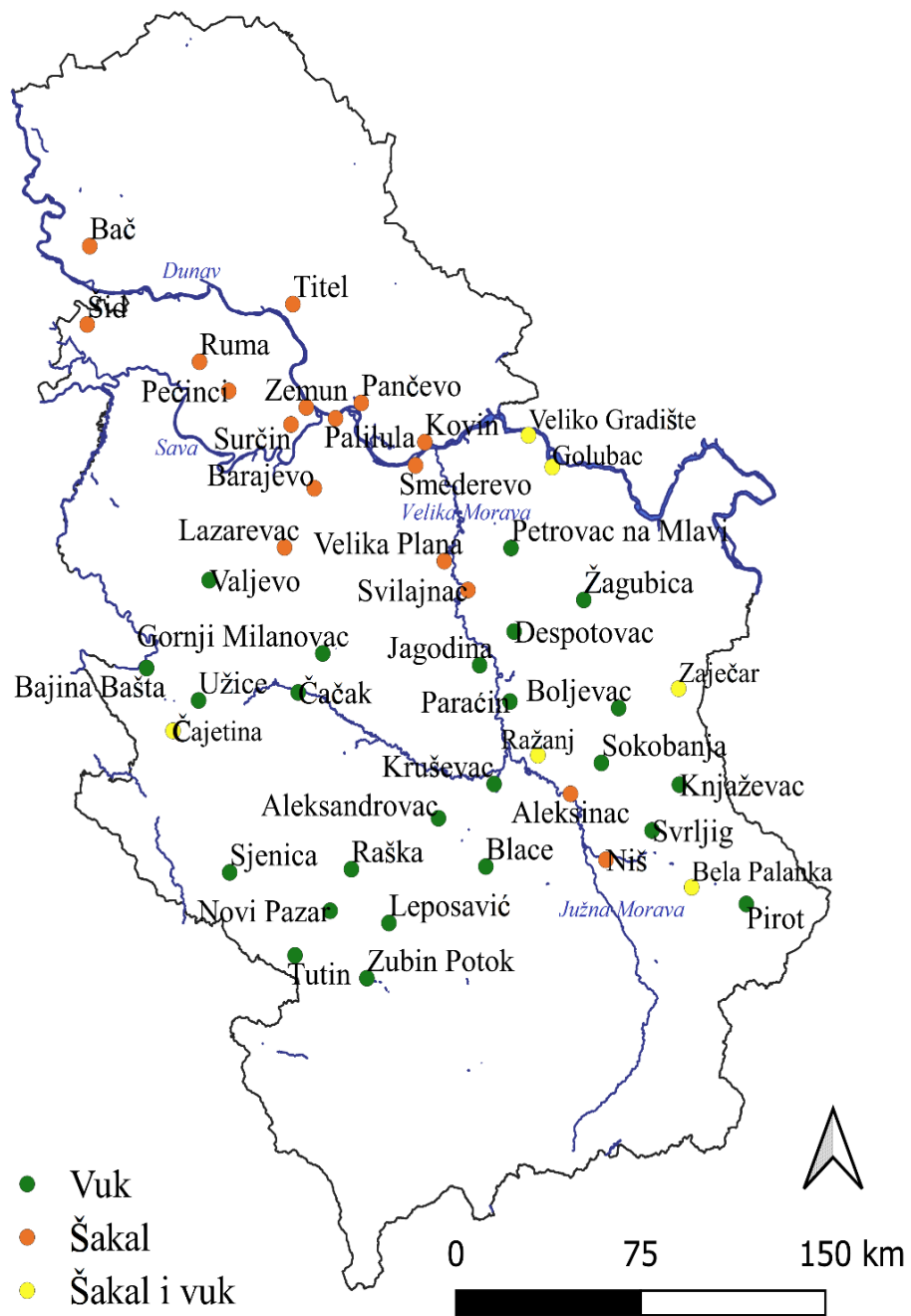
3.1. Prikupljanje uzoraka

Odstreljeni šakali i vukovi sakupljeni su u saradnji sa lovcima i lovačkim organizacijama u okviru redovnog i planiranog odstela, u periodu od jedanaest godina (2010-2020), u daleko manjem obimu, u istom vremenskom periodu, prikupljana su i tela šakala stradalih u saobraćaju. Nijedna životinja nije namerno niti namenski žrtvovana za potrebe ove doktorske disertacije niti drugih povezanih istraživanja/projektima u kojima učestvuju istraživački timovi Katedre za ekologiju životinja i zoogeografiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu kao i naučnoistraživačke Grupe za medicinsku entomologiju, Instituta za Medicinska istraživanja, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, u saradnji sa kojim je i realizovano istraživanje u okviru ove disertacije. Tela su prikupljana na širokom prostoru rasprostranjenja obe vrste u Srbiji. Nakon što su tela preuzeta od lovaca (ili nađena stradala u saobraćaju), prema definisanom protokolu, za svaku životinju beležene su sledeće informacije: datum odstrela, lokalitet, koordinate (ako je moguće), pol i uzrast. Osim toga sve jedinke su standardno morfometrijski obrađene - premerena je dužina tela, dužina repa, dužina glave, dužina zadnjeg stopala, visina uha, visina u grebenu i izmerena i zabeležena je masa tela.

Nakon što su tela prikupljena, disekcijom su uzeti uzorci unutrašnjih organa. Za potrebe ove studije prikupljeni su uzorci slezine. Mali komadić (oko 20 grama) je pakovan u sterilne plastične bočice i do konačnih analiza u laboratoriji deponovan u zamrzivač na temperaturi od -20°C . Tkiva su sakupljena u kratkom vremenskom periodu kako ne bi došlo do promena koje bi uzorke učinile neodgovarajućim za dalje molekularne analize. Svaki pojedinačni uzorak je obeležen etiketom sa osnovnim podacima o uzorku - kolektorski broj, vrsta životinje, pol, datum, lokalitet, koordinate (ako ih je bilo moguće zabeležiti) i vrsta uzorka. Tako obeleženi čuvani su u zamrzivaču na -20°C u laboratoriji Katedre za ekologiju životinja i zoogeografiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i deo su teriološke zbirke.

Uzorci šakala i vuka su prikupljeni sa širokog prostora Srbije (Slika 12). Za potrebe analiza prisustva, prevalencije i identifikacija potencijalnih žarišta hepatozoonoze u populaciji vuka, u ovoj studiji teritorija Srbije je podeljena na istočni i zapadni region u odnosu na položaj reka Velike i Južne Morave. S obzirom da šakal ima šire rasprostranjenje u odnosu na vuka, za potrebe ove studije (analiza prisustva, prevalencije i identifikacija potencijalnih žarišta hepatozoonoze) teritorija Srbije je podeljena na tri regiona severni, istočni i zapadni u odnosu na položaj reka Save, Dunava, Velike i Južne Morave.

U sklopu ove doktorske disertacije testirana je prevalencija i genetički diverzitet *H. canis* na osnovu prikupljenog uzorka slezina vuka i šakala.



Slika 12. Mapa Srbije sa lokalitetima sa kojih su prikupljeni uzorci vuka i šakala.

3.2. Izolacija DNK i molekularna detekcija *Hepatozoon canis* u slezinama vuka i šakala

3.2.1. Izolacija DNK iz slezine životinja

DNK je izolovana iz slezine svake prikupljene životinje (vuka ili šakala). S obzirom da je slezina organ sa visokom perfuzijom uključen u imunološku kontrolu i eliminaciju vektorski prenosivih patogena, koji bi mogli imati fundamentalnu ulogu u patogenezi bolesti slezine. Pomoću sterilnih lanceta uzorkovana je mala količina tkiva slezine (maksimalno 10 mg) u sterilne tubice od 1,5 ml (Eppendorf™), zatim je vršena homogenizacija plastičnim štapićima (Micropestle, Eppendorf™). Za izolaciju DNK u sistemu sa kolonicama korišćen je komercijalni kit (Gene Jet Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific™), prema protokolu proizvođača. Oprema koja je upotrebljena prilikom ekstrakcije DNK *H. canis* prikazana je na Slici 13.

Proces ekstrakcije podrazumevao je sledeće korake:

- U homogenizovano tkivo slezine dodato je 180 µl rastvora za digestiju i 20 µl enzima proteinaze K. Sadržaj je izmešan na vortex mešalici radi dobijanja homogene suspenzije, a zatim inkubiran u vodenom kupatilu (Thermomixer compact, Eppendorf™) na temperaturi od 56 °C u trajanju od 3 sata.
- Nakon inkubacije u uzorke je dodato 20 µl Rnaze A. Uzorci su zatim lizirani inkubacijom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga u lizat je dodato 400 µl 50% etanola uz kratku resuspenziju na vortex mešalici.
- U kolone za prečišćavanje prebačen je lizat koji je pripremljen. Kolonice su zatim centrifugirane 1 minut na 6000 x g. Sadržaj koji nakon centrifugiranja ostaje u tubicama za sakupljanje je odbačen.
- Nakon toga vršeno je ispiranje uzoraka puferima (eng. *Wash Buffer I*, *Wash Buffer II*). Prvo je u kolonice sa uzorcima dodato 500 µl „Wash Buffer I“ za ispiranje, nakon čega su uzorci centrifugirani 1 minut na 8000 x g. Sadržaj iz tubica za sakupljanje je nakon centrifugiranja odbačen i dodat je „Wash Buffer II“ za ispiranje, odmah zatim uzorci su centrifugirani još 3 minuta na ≥ 12000 x g.
- Nakon ispiranja, u plastične tube od 1,5 ml prebačena je kolona za izolaciju sa DNK. U centralni deo filtera dodato je 200 µl pufera za eluciju DNK (eng. *Elution Buffer*). Dalje su uzorci inkubirani na sobnoj temperaturi 2 minuta, a potom centrifugirani 1 minut na 8000 x g. Kolona sa filterom je nakon toga odbačena, a od izolovane DNK napravljeni su alikvoti od po 200 µl i uzorci su čuvani na -20 °C do daljih analiza.



1. Centrifuga - 5417 R
(Eppendorf™)



2. Rotirajuće vodeno
kupatilo - Thermomixer
compact (Eppendorf™)



3. Vortex mešalica - EV-
100 (Velp Scientifica®)

Slika 13. Oprema korišćena za izolaciju DNK *Hepatozoon canis* iz slezine životinja.

3.2.2. Molekularne metode u detekciji i identifikaciji vrste *Hepatozoon canis*

DNK *H. canis* u analiziranim uzorcima detektovan je pomoću lančane reakcije polimeraze (PCR- eng. *polymerase chain reaction*). PCR detekcija vršena je na uređaju Eppendorf 5333 MasterCycler Thermal Cycler (Slika 14). Ukupna radna zapremina uzoraka za PCR bila je 25 μ l.



Slika 14. Eppendorf 5333 MasterCycler Thermal Cycler na kome je vršena PCR detekcija patogena.

3.2.2.1. Detekcija *Hepatozoon canis* u slezinama vuka i šakala

Detekcija DNK patogena vršena je konvencionalnim PCR-om prema ustaljenom protokolu. Upotrebljeni su setovi prajmera HepF_for (5'-ATACATGAGCAAAATCTCAAC-3') i HepR_rev (5'-CTTATTATTCCATGCTGCTGCAG-3') koji umnožavaju 666-bp fragment 18S rRNA gena (Inokuma et al., 2002), kao i PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific™). Čitav proces je rađen prema preporukama proizvođača hemikalija. Zapremine hemikalija, prajmera i uzorka prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Zapremine reagenasa upotrebljenih prilikom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Reagensi	Količina (µl)
H ₂ O	12,375 µl
5X Green Reaction Buffer	5 µl
dNTP's (10mM)	0,5 µl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl	0,125 µl
Hep_R (10pmol/µl)	2 µl
Hep_F(10pmol/µl)	2 µl
uzorak	3 µl
ukupna zapremina	25 µl

Oprema za horizontalnu gel elektroferezu, Sub-Cell, GT, Bio-Rad™, upotrebljena je za elektroforetsko razdvajanje PCR produkata. Gel je pravljen pomoću agaroze SeaKem, LE (Lonza™) sa koncentracijom od 2%, a bojenje vršeno etidijum bromidom (Etidium Bromide Solution, 10mg/ml, Invitrogen™).

Vizuelizacija PCR produkata vršena je pod UV svetlom u komori (BioDocAnalyze Darkhood, Biometra™)

3.3. Sekvenciranje uzoraka

Pozitivni uzorci životinja pripremljeni su za sekvenciranje umnožavanjem fragmenata 18S rRNA gena. Umnožavanje je vršeno gore pomenutim prajmerima i reagensima čije su zapremine navedene u tabeli 2.

Tabela 2. Zapremine reagensa upotrebljenih za pripremu uzoraka za sekvenciranje

Reagensi	Količina (µl)
	1 tubica
H ₂ O	24,75 µl
5X Green Reaction Buffer	10 µl
dNTP's (10mM)	1 µl
TaqPolymerase (GoTaq) 5u/µl	0,25 µl
Hep_R (10pmol/µl)	4 µl
Hep_F(10pmol/µl)	4 µl
uzorak	6 µl
ukupna zapremina	50 µl

Svi amplifikovani proizvodi su vizuelizovani na 2% agaroznom gelu.

Sekvenciranje uzoraka je urađeno korišćenjem komercijalnog servisa (Macrogen Europe). Dalja obrada sekvenci rađena je u programima FinchTV™, BioEdit™, MEGA™. Identifikacija vrste detektovanog patogena vršena je na osnovu poređenja dobijenih sekvenci sa prethodno deponovanim sekvencama dostupnim u banci gena (National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [zadnji put pristupljeno 16.6.2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.4. Filogenetske analize

Skvence dobijene u okviru ove studije podvrgnute su filogenetskim analizama. Uređivanje Sanger sekvenci, sklapanje i stvaranje konsenzusa sekvenci sprovedeno je u FinchTV. Korišćeno je dva seta sekvenci (jedan set izolovan iz vuka, drugi iz šakala na prostoru Srbije), gde je procena evolutivnih modela utvrđena na osnovu jModelTest 2.1.4 (Posada et al., 2008). Filogenetska stabla konstruisana su na osnovu Tamura 3-parametarskog modela (T92) u MEGA X softveru (Kumar et al., 2018). Reprezentativne sekvence izolovane slezina iz vuka upoređene su sa dostupnim sekvencama iz banke gena (GenBank®) koristeći BLAST pretragu (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, pristupljeno 1. oktobra 2022) [Internet]. Konstuisano je Neighbor-Joining (1000 bootstrap replika) filogenetsko stablo. Takođe, izolovane sekvence iz slezina šakala su zajedno sa svim dostupnim sekvencama iz Srbije u banci gena (GenBank®) (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, pristupljeno 23. aprila 2024) podvrgnute filogenetskim analizama. Skup podataka sadržao je ukupno 77 sekvenci gena 18S rRNA *H. canis*, 35 izolovanih iz uzoraka tkiva šakala u okviru ove studije i 42 ranije objavljene. Filogenetski odnosi su rekonstruisani upotrebom dva različita algoritma, uključujući Bajesovu statistiku (eng.

Bayesian inference) i „maximum likelihood“, implementiranim u softveru MEGA X (Kumar et al., 2018). Bajesova analiza je sprovedena primenom Markov chain Monte Carlo (MCMC) za 5×10^6 generacija sa frekvencijom uzorkovanja na svakih 5000 generacija i sagorevanjem od 25%, implementirano u MrBayes 3.1.2 (Ronquist et al., 2012).

3.5. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati su dalje analizirani korišćenjem Hi-kvadrat (χ^2) i G-testa u statističkim programima Statistica 5.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA), Excel, (Microsoft Corporation™), R Software (version 4.2.2), sa nivoom značajnosti $p < 0,05$. Hi-kvadrat test je korišćen da objasni statističku značajnost u prevalenciji patogena između ženki i mužijaka vuka i ženki i mužjaka šakala. Takođe, hi-kvadrat testom testirana je i statistička značajnost između dva regiona (istočni i zapadni) kod vukova i između uzrasta (adultne i juvenilne jedinke) u analiziranom uzorku šakala. Šakali su bili klasifikovani prema starosti na juvenilne jedinke (<10 meseci) i adultne jedinke (>11 meseci). Uzorak vuka sadržao je samo adultne jedinke. G-test je korišćen da objasni razliku u prevalenciji između tri definisana regiona u Srbiji (severni, istočni i zapadni) kod šakala.

4. REZULTATI

4.1. Prikupljeni uzorci životinja

Tokom 11 godina (2010-2020) prikupljen je 221 uzorak slezine vuka i šakala sa prostora 53 opštine na području Srbije. Uzorci vuka prikupljeni su od jedinki iz ukupno 30 opština (Bajina Bašta, Valjevo, Gornji Milanovac, Čajetina, Užice, Čačak, Sjenica, Raška, Aleksandrovac, Kruševac, Novi Pazar, Leposavić, Blace, Zubin Potok, Tutin, Jagodina, Veliko Gradište, Golubac, Petrovac na Mlavi, Žagubica, Despotovac, Paraćin, Zaječar, Boljevac, Ražanj, Sokobanja, Knjaževac, Svrljig, Pirot, Bela Palanka), a uzorci šakala od jedinki iz 23 opštine (Kovin, Titel, Surčin, Bač, Palilula, Pećinci, Pančevo, Šid, Ruma, Zemun, Barajevo, Lazarevac, Smederevo, Velika Plana, Čajetina, Veliko Gradište, Golubac, Svilajnac, Ražanj, Zaječar, Aleksinac, Niš, Bela Palanka) (Slika 12). Najveći broj uzoraka vuka prikupljen je na području Braničevskog, Zaječarskog, Nišavskog i Pirotskog upravnog okruga dok je najveći broj šakala prikupljen na širem području grada Beograda. U pogledu okruga, najveći broj šakala prikupljen je iz Sremskog, Južno Banatskog, Braničevskog, Podunavskog, Nišavskog i Zaječarskog upravnog okruga.

4.1.1. Uzorci vuka

U periodu od 10 godina (2010-2019) prikupljeno je 107 uzorka slezine adultnih jedinki vuka iz ukupno 30 opština u Srbiji. Za potrebe analiza u ovoj studiji teritorija Srbije je podeljena na istočni i zapadni region u odnosu na položaj Velike i Južne Morave. Istočnom regionu pripadalo je 14 opština (Veliko Gradište, Golubac, Petrovac na Mlavi, Žagubica, Despotovac, Paraćin, Zaječar, Boljevac, Ražanj, Sokobanja, Knjaževac, Svrljig, Pirot, Bela Palanka), a zapadnom 16 opština (Bajina Bašta, Valjevo, Gornji Milanovac, Čajetina, Užice, Čačak, Sjenica, Raška, Aleksandrovac, Kruševac, Novi Pazar, Leposavić, Blace, Zubin Potok, Tutin, Jagodina) sa kojih su prikupljeni uzorci. Najviše životinja sakupljeno je na području Sjenice 30/107 (28,04%), Čajetine 7/107 (6,54%), Žagubice 7/107 (6,54%), Užica 6/107 (5,61%) i Paraćina 6/107 (5,61%).

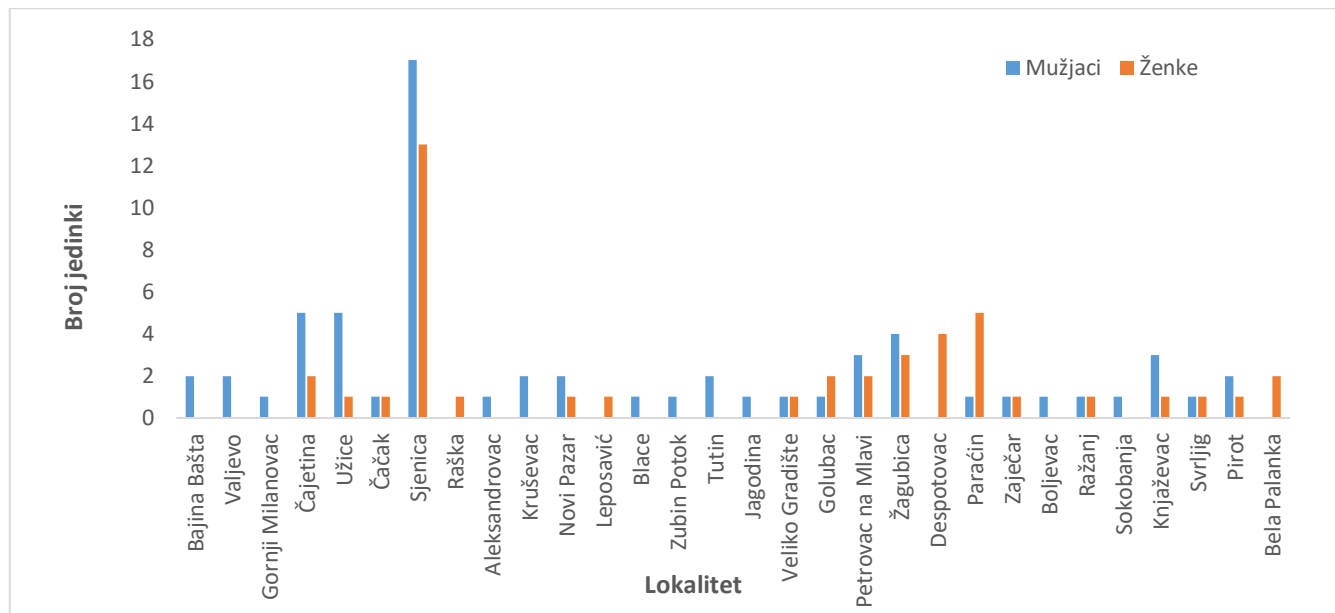
Od ukupno 107 uzoraka vuka, 63 su bili mužjaci (43 u zapadnom regionu, 20 u istočnom regionu), a 44 ženke (20 u zapadnom regionu, 24 u istočnom regionu).

Distribucija sakupljenih jedinki u odnosu na pol po lokalitetima prikazana je u Tabeli 3 i Slici 15.

Tabela 3. Distribucija sakupljenih jedinki vuka u odnosu na pol po lokalitetima

Region	Lokalitet	Mušjaci	Ženke	Ukupno
ZAPADNI REGION	Bajina Bašta	2	0	2
	Valjevo	2	0	2
	Gornji Milanovac	1	0	1
	Čajetina	5	2	7
	Užice	5	1	6
	Čačak	1	1	2
	Sjenica	17	13	30
	Raška	0	1	1
	Aleksandrovac	1	0	1
	Kruševac	2	0	2
	Novi Pazar	2	1	3
	Leposavić	0	1	1
	Blace	1	0	1

	Zubin Potok	1	0	1
	Tutin	2	0	2
	Jagodina	1	0	1
Ukupno		43	20	63
ISTOČNI REGION	Veliko Gradište	1	1	2
	Golubac	1	2	3
	Petrovac na Mlavi	3	2	5
	Žagubica	4	3	7
	Despotovac	0	4	4
	Paraćin	1	5	6
	Zaječar	1	1	2
	Boljevac	1	0	1
	Ražanj	1	1	2
	Sokobanja	1	0	1
	Knjaževac	3	1	4
	Svrljig	1	1	2
	Pirot	2	1	3
	Bela Palanka	0	2	2
Ukupno		20	24	44
Σ		63	44	107

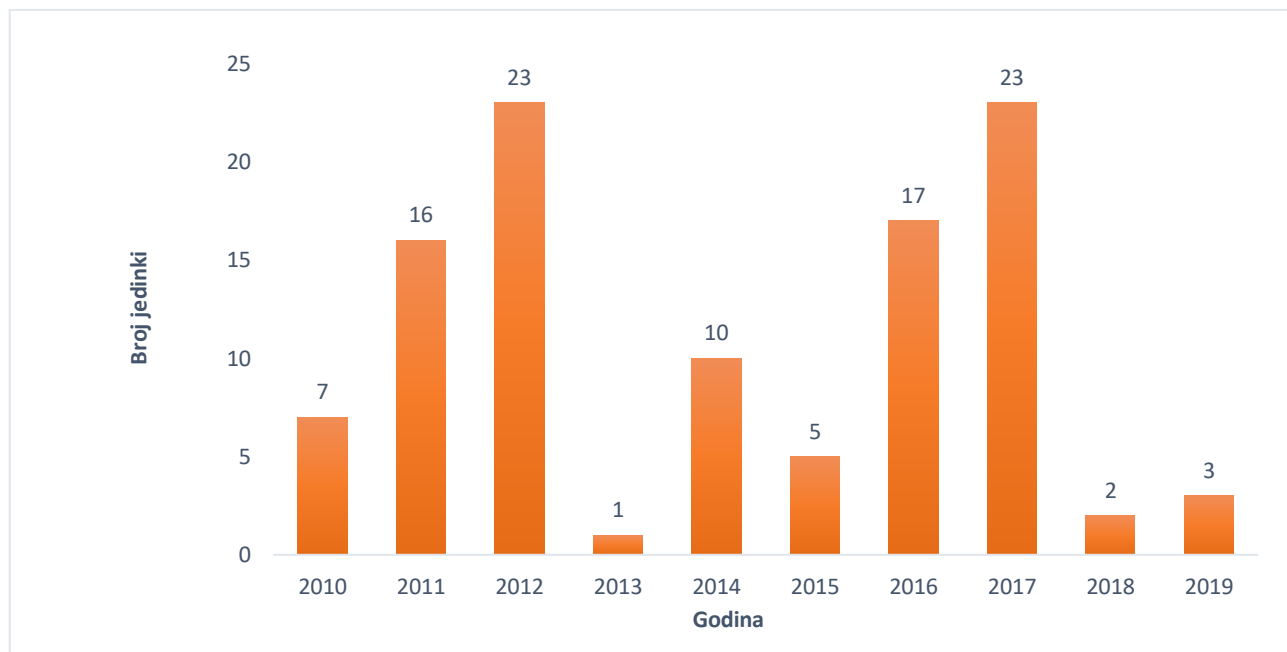


Slika 15. Distribucija sakupljenih jedinki vuka u odnosu na pol po lokalitetima.

Najveći broj uzoraka vuka sakupljen je u toku 2011., 2012., 2017. godine u zapadnom regionu, a 2014., 2016., 2017. u istočnom regionu. Prikaz broja uzoraka po godinama dat je u Tabeli 4 i Slici 16.

Tabela 4. Broj sakupljenih jedinki vuka po godinama

Region	Godina	Broj jedinki
ZAPADNI REGION	2010	3
	2011	12
	2012	17
	2013	0
	2014	1
	2015	3
	2016	7
	2017	14
	2018	1
	2019	2
Ukupno		60
ISTOČNI REGION	2010	4
	2011	4
	2012	6
	2013	1
	2014	9
	2015	2
	2016	10
	2017	9
	2018	1
	2019	1
Ukupno		47
Σ		107

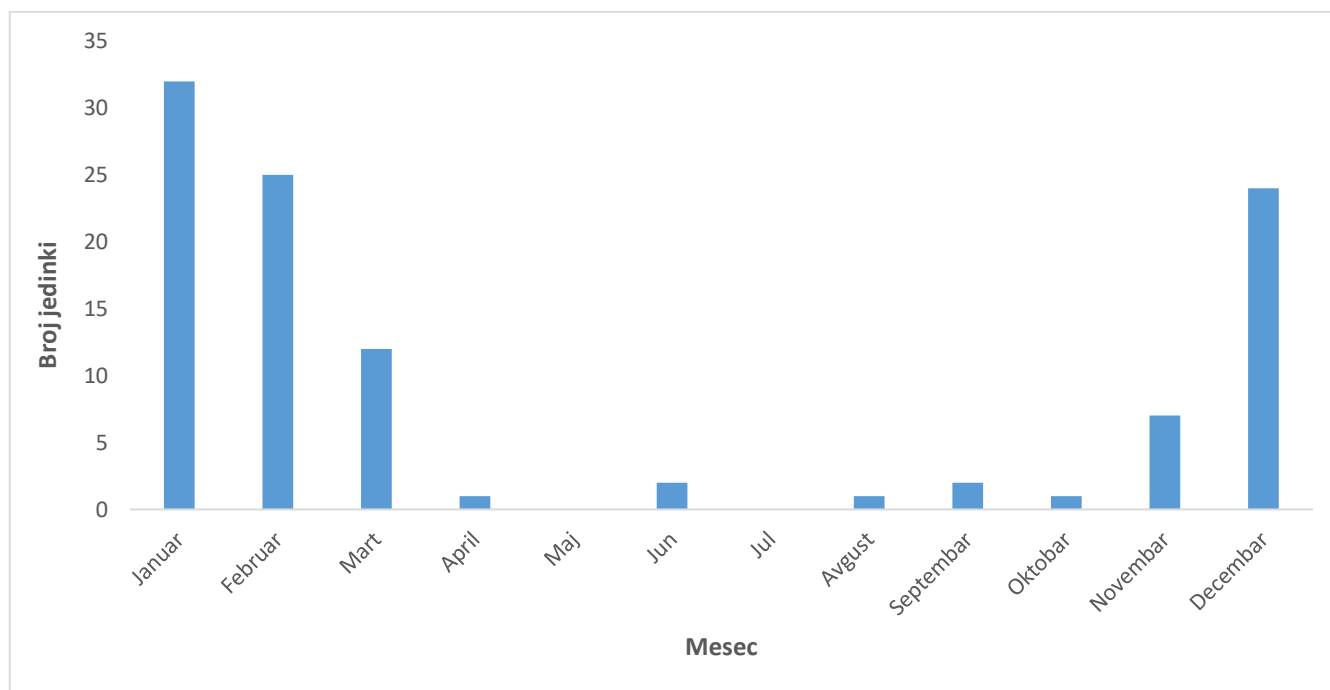


Slika 16. Broj sakupljenih jedinki vuka po godinama

Najveći broj uzoraka prikupljen je u toku zimske sezone, od decembra do februara (81/107; 75,7%) (Tabela 5, Slika 17).

Tabela 5. Broj sakupljenih jedinki vuka po mesecima

Region	Mesec	Broj jedinki
ZAPADNI REGION	Januar	16
	Februar	20
	Mart	9
	April	1
	Maj	0
	Jun	0
	Jul	0
	Avgust	1
	Septembar	1
	Oktobar	1
	Novembar	4
	Decembar	12
Ukupno		65
ISTOČNI REGION	Januar	16
	Februar	5
	Mart	3
	April	0
	Maj	0
	Jun	2
	Jul	0
	Avgust	0
	Septembar	1
	Oktobar	0
	Novembar	3
	Decembar	12
Ukupno		42
Σ		107



Slika 17. Broj sakupljenih jedinki vuka po mesecima.

4.1.2. Uzorci šakala

U periodu od 11 godina (2010-2020) prikupljeno je ukupno 114 uzoraka slezine šakala iz ukupno 23 opštine u Srbiji. Uzorak je obuhvatao 99 adultnih jediniki i 15 juvenilnih jediniki. Za potrebe studije teritoriju Srbije smo podelili u odnosu na položaj reka Save, Dunava, Velike i Južne Morave na tri regiona severni, istočni i zapadni. Severnom regionu pripadalo je 10 opština (Kovin, Titel, Surčin, Bač, Palilula, Pećinci, Pančevo, Šid, Ruma, Zemun), zapadnom 5 opština (Barajevo, Lazarevac, Smederevo, Velika Plana, Čajetina), istočnom 8 opština (Veliko Gradište, Golubac, Svilajnac, Ražanj, Zaječar, Aleksinac, Niš, Bela Palanka) sa kojih su sakupljeni uzorci životinja.

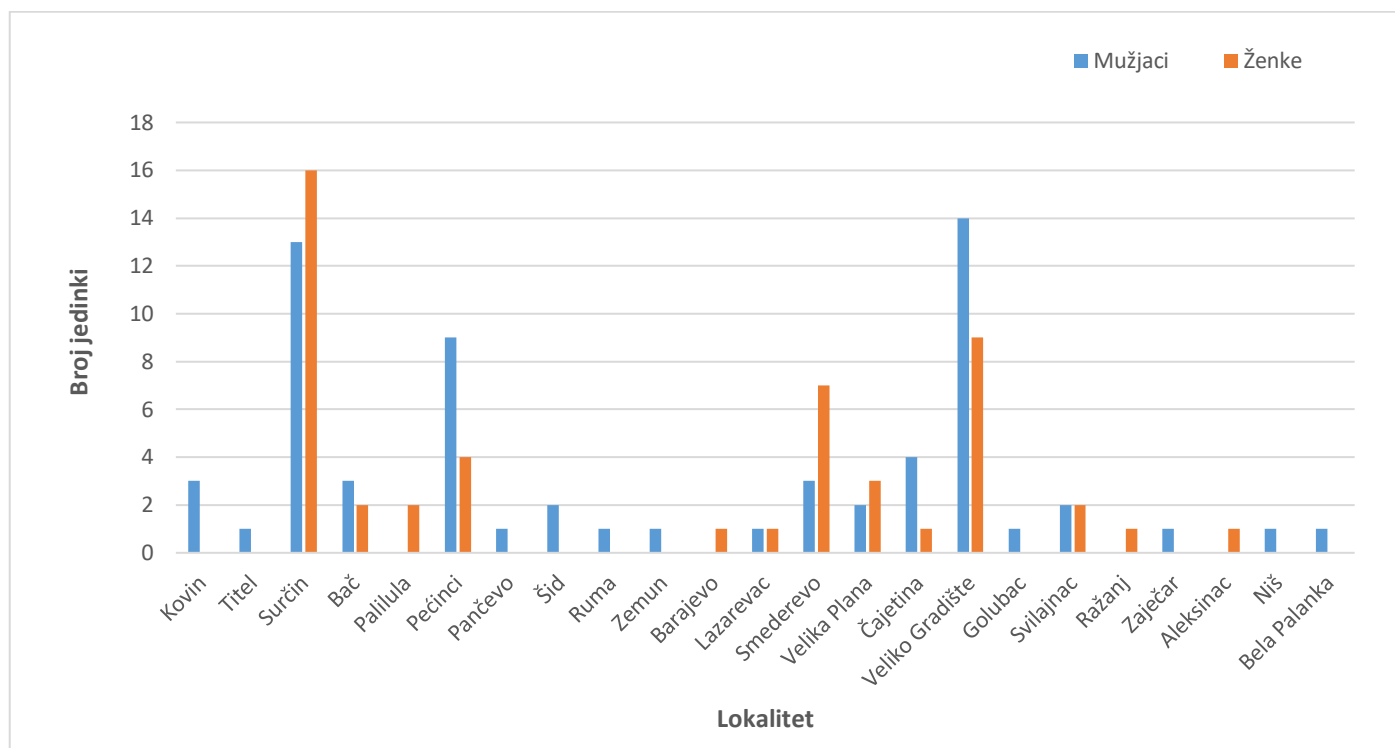
Najviše životinja sakupljeno je na području Surčina 29/114 (25,44%), Velikog Gradišta 23/114 (20,78%).

Od ukupno 114 uzoraka šakala, 64 su bili mužjaci (34 u severnom regionu, 10 u zapadnom regionu, 20 u istočnom regionu), a 50 ženke (24 u severnom regionu, 13 u zapadnom regionu, 13 u istočnom regionu).

Distribucija životinja u odnosu na pol po lokalitetima prikazana je u Tabeli 6 i Slici 18.

Tabela 6. Distribucija sakupljenih jedinki šakala u odnosu na pol po lokalitetima

Region	Lokalitet	Mužjaci	Ženke	Ukupno
SEVERNI REGION	Kovin	3	0	3
	Titel	1	0	1
	Surčin	13	16	29
	Bač	3	2	5
	Palilula	0	2	2
	Pećinci	9	4	13
	Pančevo	1	0	1
	Šid	2	0	2
	Ruma	1	0	1
	Zemun	1	0	1
Ukupno		34	24	58
ZAPADNI REGION	Barajevo	0	1	1
	Lazarevac	1	1	2
	Smederevo	3	7	10
	Velika Plana	2	3	5
	Čajetina	4	1	5
Ukupno		10	13	23
ISTOČNI REGION	Veliko Gradište	14	9	23
	Golubac	1	0	1
	Svilajnac	2	2	4
	Ražanj	0	1	1
	Zaječar	1	0	1
	Aleksinac	0	1	1
	Niš	1	0	1
	Bela Palanka	1	0	1
Ukupno		20	13	33
Σ		64	50	114



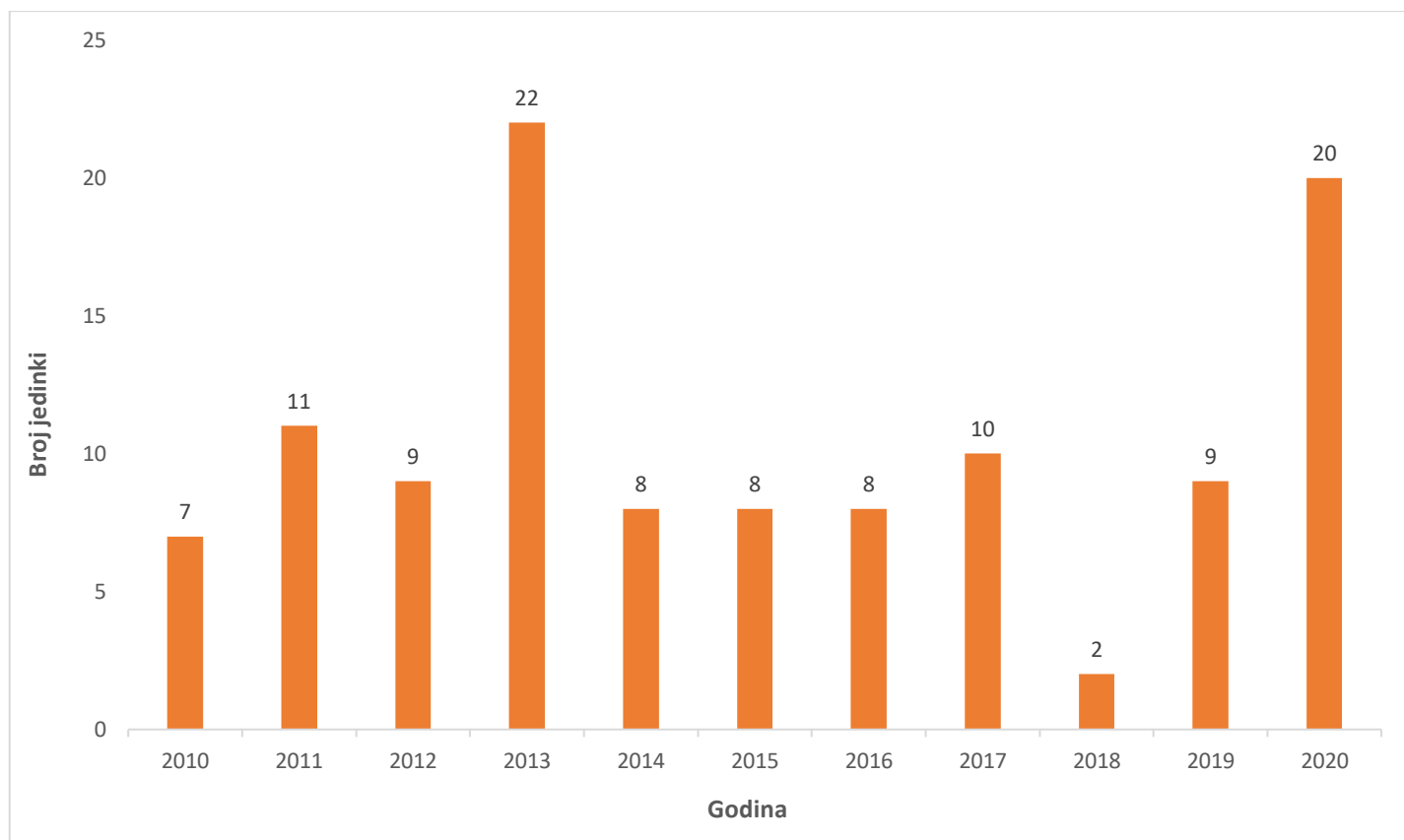
Slika 18. Distribucija sakupljenih jedinki šakala u odnosu na pol po lokalitetima.

Najveći broj uzoraka šakala sakupljen je u toku 2013., 2015., 2020. godine u severnom regionu, 2011., 2012., 2020. godine u zapadnom regionu, 2016., 2017. godine u istočnom regionu. Prikaz broja uzoraka po godinama dat je u Tabeli 7 i Slici 19.

Tabela 7. Broj sakupljenih jedinki šakala po godinama

Region	Godina	Broj jedinki
SEVERNI REGION	2010	1
	2011	3
	2012	0
	2013	17
	2014	6
	2015	8
	2016	2
	2017	2
	2018	0
	2019	4
	2020	15
Ukupno		58
ZAPADNI REGION	2010	2
	2011	4
	2012	6
	2013	1
	2014	1

	2015	0
	2016	0
	2017	3
	2018	0
	2019	2
	2020	4
Ukupno		23
ISTOČNI REGION	2010	4
	2011	4
	2012	3
	2013	4
	2014	1
	2015	0
	2016	6
	2017	5
	2018	2
	2019	3
2020	1	
Ukupno		33
Σ		114

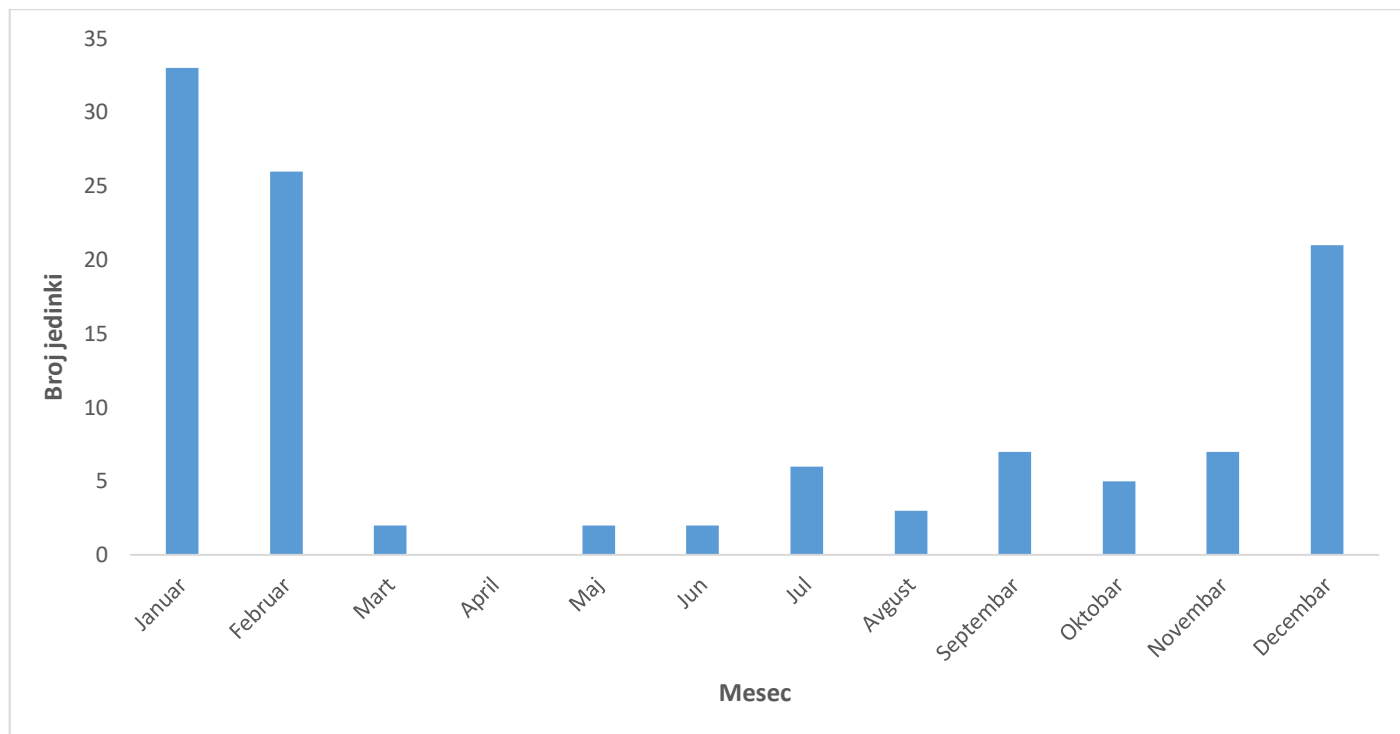


Slika 19. Broj sakupljenih jedinki šakala po godinama

Najveći broj uzoraka prikupljen je u toku zimske sezone, od decembra do februara (80/114; 70,18%) (Tabela 8, Slika 20).

Tabela 8. Broj sakupljenih jedinki šakala po mesecima

Region	Godina	Broj jedinki
SEVERNI REGION	Januar	14
	Februar	13
	Mart	1
	April	0
	Maj	2
	Jun	2
	Jul	4
	Avgust	2
	Septembar	6
	Oktobar	4
	Novembar	6
	Decembar	4
Ukupno		58
ZAPADNI REGION	Januar	12
	Februar	5
	Mart	1
	April	0
	Maj	0
	Jun	0
	Jul	0
	Avgust	1
	Septembar	0
	Oktobar	1
	Novembar	1
	Decembar	2
Ukupno		23
ISTOČNI REGION	Januar	7
	Februar	8
	Mart	0
	April	0
	Maj	0
	Jun	0
	Jul	2
	Avgust	0
	Septembar	1
	Oktobar	0
	Novembar	0
	Decembar	15
Ukupno		33
Σ		114



Slika 20. Broj sakupljenih jedinki šakala po mesecima.

4.1.2.1. Uzorci juvenilnih jedinki šakala

Od ukupnog uzorka koji je brojao 114 šakala, 15 jedinki su bile starosne dobi od 3 do 7 meseci (štenci - juvenilne jedinke). Distribucija juvenilnih jedinki prikazana je u Tabeli 9.

Tabela 9. Distribucija juvenilnih jedinki šakala

Region	Lokalitet	Broj jedinki
SEVERNI REGION	Surčin	6
	Bač	2
	Palilula	1
	Pećinci	2
	Pančevo	1
	Šid	1
Ukupno		13

ZAPADNI REGION	Čajetina	1
Ukupno		1
ISTOČNI REGION	Veliko Gradište	1
Ukupno		1
Σ		15

4.2. Molekularna detekcija *Hepatozoon canis* u slezinama vuka i šakala

4.2.1. Detekcija *Hepatozoon canis* u slezinama vuka

Molekularna detekcija DNK patogena *H. canis* izvršena je u uzorcima slezine 107 jedinki vuka. Od 107 analiziranih životinja, kod 62 (57,94%) je utvrđeno prisustvo DNK *H. canis*. Od 44 analizirane ženke 24 (54,55%) je bilo pozitivno, dok je od 63 mužjaka 38 (60,32%) bio pozitivno. Nisu utvrđene statistički značajne razlike u prevalenciji infekcija *H. canis* između polova ($p < 0,55176$). Životinje zaražene *H. canis* su poreklom sa 26 lokaliteta, po 13 lokaliteta iz istočnog i zapadnog regiona Srbije. Međutim, postojale su statistički značajne razlike u prevalenciji infekcije ovim patogenom između istočnog regiona, 32/44 (72,7%) i zapadnog regiona 30/63 (47,6%) ($p < 0,00963$).

Prikaz rezultata pozitivnih životinja dat je u Tabeli 10 i Slici 21.

Tabela 10. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku vuka

Region	Lokalitet	Broj analiziranih jedinki	M/Ž	Broj pozitivnih jedinki (%)	M/Ž
ZAPADNI REGION	Bajina Bašta	2	2/0	1 (50%)	1/0
	Valjevo	2	2/0	2 (100%)	2/0
	Gornji Milanovac	1	1/0	/	0/0
	Čajetina	7	5/2	4 (57,14%)	3/1
	Užice	6	5/1	3 (50%)	3/0
	Čačak	2	1/1	1 (50%)	1/0
	Sjenica	30	17/13	11 (36,66%)	6/5
	Raška	1	0/1	1 (100%)	0/1
	Aleksandrovac	1	1/0	/	0/0
	Kruševac	2	2/0	2 (100%)	2/0
	Novi Pazar	3	2/1	1 (33,33%)	1/0
	Leposavić	1	0/1	/	0/0
	Blace	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Zubin Potok	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Tutin	2	2/0	1 (50%)	1/0
	Jagodina	1	1/0	1 (100%)	1/0
Ukupno		63		30 (47,6%)	
ISTOČNI REGION	Veliko Gradište	2	1/1	1 (50%)	1/0
	Golubac	3	1/2	3 (100%)	1/2
	Petrovac na Mlavi	5	3/2	5 (100%)	3/2
	Žagubica	7	4/3	2 (28,57%)	1/1
	Despotovac	4	0/4	3 (75%)	0/3
	Paraćin	6	1/5	6 (100%)	1/5
	Zaječar	2	1/1	1 (50%)	0/1
	Boljevac	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Ražanj	2	1/1	/	0/0
	Sokobanja	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Knjaževac	4	3/1	3 (75%)	3/0
	Svrljig	2	1/1	2 (100%)	1/1
	Pirot	3	2/1	3 (100%)	2/1
	Bela Palanka	2	0/2	1 (50%)	0/1
	Ukupno		44		32 (72,7%)
Σ		107		62 (57,94%)	



Slika 21. Distribucija prisustva *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku vuka u Srbiji.

Najveći broj pozitivnih uzoraka vuka 12/23 bio je iz 2012. godine. U zapadnom regionu je prevalencija takođe bila najveća 2012. godine (9/17 uzoraka), a 2014. godine u istočnom regionu (8/9 uzoraka) (Tabela 11).

Tabela 11. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku vuka po godinama

Region	Godina	Broj analiziranih jedinki	Broj pozitivnih jedinki	%
ZAPADNI REGION	2010	3	1	33,33
	2011	14	6	42,85
	2012	17	9	52,94
	2013	0	0	0
	2014	1	1	100
	2015	3	1	33,33
	2016	7	4	57,14
	2017	15	6	40
	2018	1	1	100
	2019	2	1	50
Ukupno		63	30	47,61
ISTOČNI REGION	2010	4	4	100
	2011	2	2	100
	2012	6	3	50
	2013	1	1	100
	2014	9	8	88,88
	2015	2	2	100
	2016	10	7	70
	2017	8	5	62,5
	2018	1	0	0
	2019	1	0	0
Ukupno		44	32	72,72
Σ		107	62	57,94

Najveći broj pozitivnih uzoraka vuka 10/19 detektovan je tokom februara u zapadnom regionu, 11/16 tokom januara u istočnom regionu (Tabela 12).

Tabela 12. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku vuka po mesecima

Region	Mesec	Broj analiziranih jedinki	Broj pozitivnih jedinki	%
ZAPADNI REGION	Januar	16	8	50
	Februar	19	10	52,63
	Mart	8	2	25
	April	1	1	100
	Maj	0	0	0
	Jun	0	0	0
	Jul	0	0	0
	Avgust	1	1	100
	Septembar	1	0	0
	Oktobar	1	1	100
	Novembar	4	1	25
	Decembar	12	6	50

Ukupno		63	30	47,61
ISTOČNI REGION	Januar	16	11	68,75
	Februar	6	5	83,33
	Mart	4	3	75
	April	0	0	0
	Maj	0	0	0
	Jun	2	1	50
	Jul	0	0	0
	Avgust	0	0	0
	Septembar	1	0	0
	Oktoibar	0	0	0
	Novembar	3	3	100
Decembar	12	9	75	
Ukupno		44	32	72,72
Σ		107	62	57,94

4.2.2. Detekcija *Hepatozoon canis* u slezinama šakala

Molekularna detekcija DNK *H. canis* je vršena na ukupno 114 uzoraka šakala. Od 114 analiziranih životinja 90 (78,95%) je bilo pozitivno na prisustvo DNK *H. canis*. Posmatrano po polu životinja, od ukupno 50 ženki 40 (80%) je bilo pozitivno, dok je od ukupno 64 mužjaka 50 (78,13%) je bilo pozitivano. Hi-kvadrat testom nije uočena statistička značajnost u prevalenciji među polovima ($p < 0,9903$). Rezultati analize G testa, ukazuju da je bilo statističke značajnosti u prevalenciji između severnog (68,9%), zapadnog (95,6%) i istočnog (84,8%) regiona ($p < 0,01008$). Prikaz rezultata pozitivnih životinja dat je u Tabeli 13 i Slici 22.

Tabala 13. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku šakala

Region	Lokalitet	Broj analiziranih jedinki	M/Ž	Broj pozitivnih jedinki (%)	M/Ž
SEVERNI REGION	Kovin	3	3/0	2 (66,6%)	2/0
	Titel	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Surčin	29	13/16	21 (72,4%)	10/11
	Bač	5	3/2	2 (40%)	1/1
	Palilula	2	0/1	1 (50%)	0/1
	Pećinci	13	9/4	10 (76,9%)	7/3
	Pančevo	1	1/0	/	0/0
	Šid	2	2/0	1 (50%)	1/0
	Ruma	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Zemun	1	1/0	1 (100%)	1/0

Ukupno		58		40 (68.9%)	
ZAPADNI REGION	Barajevo	1	0/1	1 (100%)	0/1
	Lazarevac	2	1/1	2 (100%)	1/1
	Smederevo	10	3/7	10 (100%)	3/7
	Velika Plana	5	2/3	5 (100%)	2/3
	Čajetina	5	4/1	4 (80%)	3/1
Ukupno		23		22 (95.6%)	
ISTOČNI REGION	Veliko Gradište	23	14/9	19 (82,6%)	11/8
	Golubac	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Svilajnac	4	2/2	3 (75%)	2/1
	Ražanj	1	0/1	1 (100%)	0/1
	Zaječar	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Aleksinac	1	0/1	1 (100%)	0/1
	Niš	1	1/0	1 (100%)	1/0
	Bela Palanka	1	1/0	1 (100%)	1/0
Ukupno		33		28 (84.8%)	
Σ		114		90 (78.95%)	



Slika 22. Distribucija prisustva *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku šakala u Srbiji.

Najveći broj pozitivnih uzoraka šakala 19/22 je bio iz 2013. godine. Takođe, u severnom regionu je detektovana najveća prevalencija tokom 2013. godine (14/17 uzoraka), tokom 2012. godine u zapadnom regionu (6/6 uzoraka), a 2016. godine u istočnom regionu (6/6 uzoraka) (Tabela 14).

Tabela 14. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku šakala po godinama

Region	Godina	Broj analiziranih jedinki	Broj pozitivnih jedinki	%
SEVERNI REGION	2010	1	1	100
	2011	3	3	100
	2012	0	0	0
	2013	17	14	82,35
	2014	6	5	83,33
	2015	8	5	65,5
	2016	2	0	0
	2017	2	0	0
	2018	0	0	0
	2019	4	4	100
	2020	15	8	53,33
Ukupno		58	40	68,97
ZAPADNI REGION	2010	2	2	100
	2011	4	4	100
	2012	6	6	100
	2013	1	1	100
	2014	1	1	100
	2015	0	0	0
	2016	0	0	0
	2017	3	3	100
	2018	0	0	0
	2019	2	1	50
	2020	4	4	100
Ukupno		23	22	91,67
ISTOČNI REGION	2010	4	4	100
	2011	4	3	75
	2012	3	3	100
	2013	4	4	100
	2014	1	1	100
	2015	0	0	0
	2016	6	6	100
	2017	5	4	80
	2018	2	1	50
	2019	3	2	66,67
	2020	1	0	0
Ukupno		33	28	84,85
Σ		114	90	78,95

Najveći broj pozitivnih jedinki šakala 12/14, odnosno 12/12 registrovan je tokom januara u severnom regionu, odnosno zapadnom regionu, 13/15 tokom decembra u istočnom regionu (Tabela 15).

Tabela 15. Prevalencija *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku šakala po mesecima

Region	Godina	Broj analiziranih jedinki	Broj pozitivnih jedinki	%
SEVERNI REGION	Januar	14	12	85,71
	Februar	13	9	69,23
	Mart	1	1	100
	April	0	0	0
	Maj	2	1	50
	Jun	2	0	0
	Jul	4	3	75
	Avgust	2	1	50
	Septembar	6	4	66,67
	Oktobar	4	3	75
	Novembar	6	3	50
	Decembar	4	3	75
Ukupno		58	40	68,97
ZAPADNI REGION	Januar	12	12	100
	Februar	5	5	100
	Mart	1	1	100
	April	0	0	0
	Maj	0	0	0
	Jun	0	0	0
	Jul	0	0	0
	Avgust	1	1	100
	Septembar	0	0	0
	Oktobar	1	0	0
	Novembar	1	1	100
	Decembar	2	2	100
Ukupno		23	22	95,65
ISTOČNI REGION	Januar	7	4	57,14
	Februar	8	8	100
	Mart	0	0	0
	April	0	0	0
	Maj	0	0	0
	Jun	0	0	0
	Jul	2	2	100
	Avgust	0	0	0
	Septembar	1	1	100
	Oktobar	0	0	0
	Novembar	0	0	0
	Decembar	15	13	86,66
Ukupno		33	28	84,85
Σ		114	90	78,95

4.2.2.1. Detekcija *Hepatozoon canis* kod juvenilnih i adultnih jedinki šakala

Kako bi se utvrdilo da li postoji razlika u prevalenciji u starosnoj strukturi šakala, analizirano je ukupno 99 (86,84%) adultnih jedinki (1+ godina) i 15 (13,16%) juvenilnih jedinki (3-7 meseci). Prevalencija kod adultnih jedinki bila je 84,84% (84/99), a kod juvenilnih jedinki 40% (6/15). Analize su pokazale da postoji statistički značajna razlika ($p < 0,00028$) u prevalenciji *H. canis* kod ove dve uzrasne kategorije u korist adultnih jedinki. Distribucija analiziranih juvenilnih jedinki šakala prikazana je na Slici 23.



Slika 23. Distribucija prisustva *Hepatozoon canis* u analiziranim juvenilnim jedinkama šakala u Srbiji.

4.3. Razlike u prevalenciji *Hepatozoon canis* u populacijama vuka i šakala

Na osnovu rezultata analiziranih uzoraka uočena je razlika u prevalenciji *H. canis* između vuka i šakala. U analiziranom uzorku šakala detektovana je daleko veća prevalencija (78,95%), dok je u uzorku vuka bila značajno niža (57,94%). Takođe razlika je registrovana i u prevalenciji patogena kod ženki vuka i ženki šakala i u prevalenciji patogena kod mužjaka vuka i mužjaka šakala. Kod ženki vuka prevalencija je bila 54,55%, a kod ženki šakala 80%, dok je kod mužjaka vuka prevalencija bila 60,32%, a kod mužjaka šakala 78,13%.

4.4. Diverzitet različitih genotipova *Hepatozoon canis* u populacijama vuka i šakala

Dosadašnja istraživanja o diverzitetu genotipova *H. canis* su veoma oskudna. Kod vuka su do sada registrovana samo dva različita genotipa (Hodžić et al., 2020), dok literaturnih podataka na ovu temu kod šakala još uvek nema. U sklopu ove studije detektovan je veliki diverzitet patogena *H. canis* u analiziranim uzorcima vuka i šakala.

4.4.1. Diverzitet različitih genotipova *Hepatozoon canis* u populaciji vuka

Ukupno 36 reprezentativnih pozitivnih uzoraka vuka je podvrgnuto sekvenciranju. Sekvenciranje je bilo uspešno za sve uzorke. Analizirane parcijalne sekvence 18S rRNA gena *H. canis*, dužina u rasponu od 454 do 627 bp, pokazale su izvesnu heterogenost. Poravnanje je izvršeno na osnovu 30 sekvenci koje pokrivaju dužinu od 539 bp, gde su uočene varijabilne pozicije sekvenci, dok je šest sekvenci isključeno iz analize zbog nedovoljne dužine na 5' ili 3' kraju. Sve reprezentativne sekvence su deponovane u banci gena (GenBank®) pod pristupnim brojevima (OP012773 - OP012802) (Tabela 16). Sekvence su pokazale varijabilnost na pet pozicija, što odgovara pet različitih tipova sekvenci. To su tipovi sekvenci S1, S2, S3, S4 i S5 (Tabela 17).

Tabela 16. Deponovane sekvence *Hepatozoon canis* detektovane u analiziranom uzorku vuka

Pristupni broj	Lokalitet	Tip sekvence
OP012773	Paraćin	S2
OP012774	Užice	S2
OP012775	Knjaževac	S2
OP012776	Bajina Bašta	S2
OP012777	Bela Palanka	S1
OP012778	Sjenica	S4
OP012779	Despotovac	S5
OP012780	Paraćin	S2
OP012781	Paraćin	S2
OP012782	Sokobanja	S1
OP012783	Užice	S2
OP012784	Petrovac na Mlavi	S2
OP012785	Petrovac na Mlavi	S2
OP012786	Petrovac na Mlavi	S2
OP012787	Blace	S4
OP012788	Paraćin	S1
OP012789	Knjaževac	S2

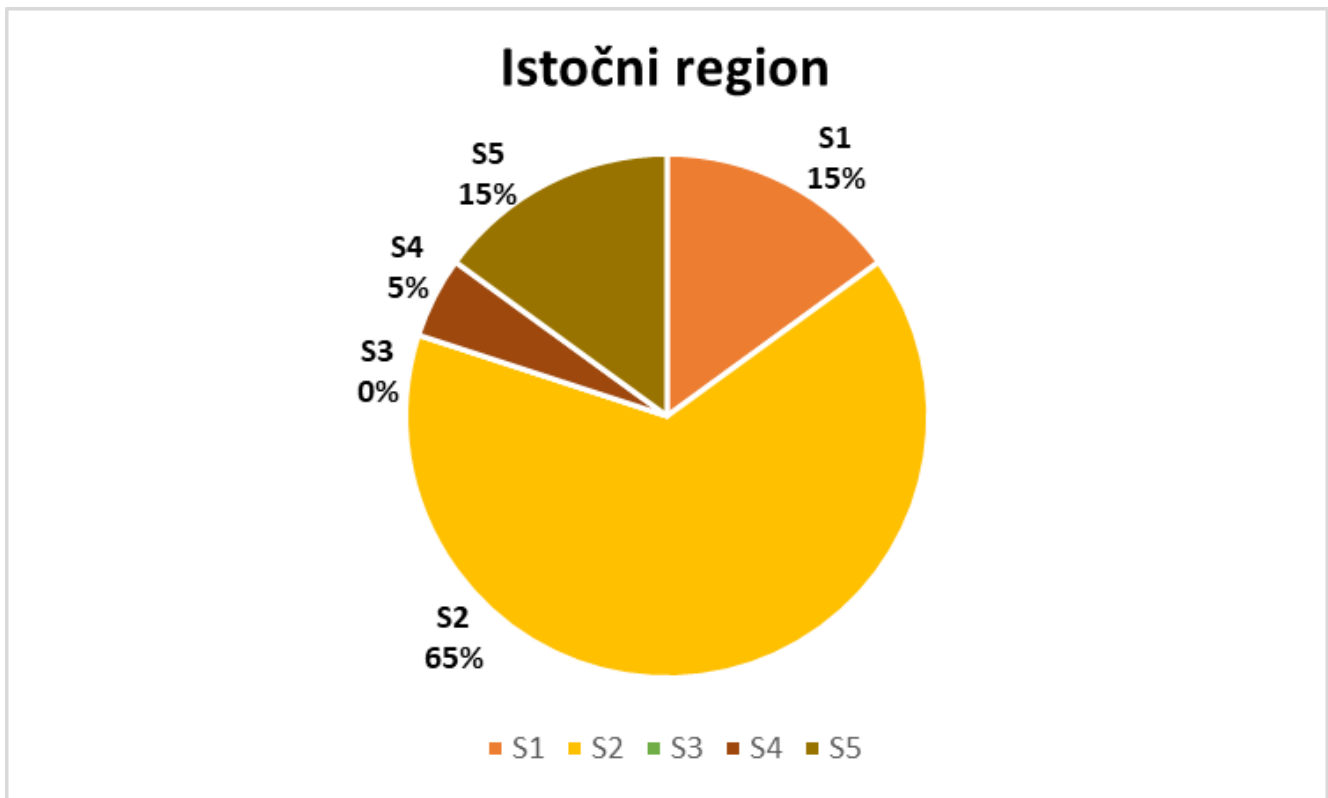
OP012790	Čajetina	S5
OP012791	Valjevo	S2
OP012792	Svrljig	S5
OP012793	Paraćin	S2
OP012794	Užice	S1
OP012795	Boljevac	S2
OP012796	Golubac	S2
OP012797	Zaječar	S2
OP012798	Valjevo	S3
OP012799	Žagubica	S4
OP012800	Despotovac	S5
OP012801	Čajetina	S4
OP012802	Petrovac na Mlavi	S2

Tabela 17. Pozicija varijabilnih mesta u parcijalnim sekvencama 18S rRNK gena (539 bp)

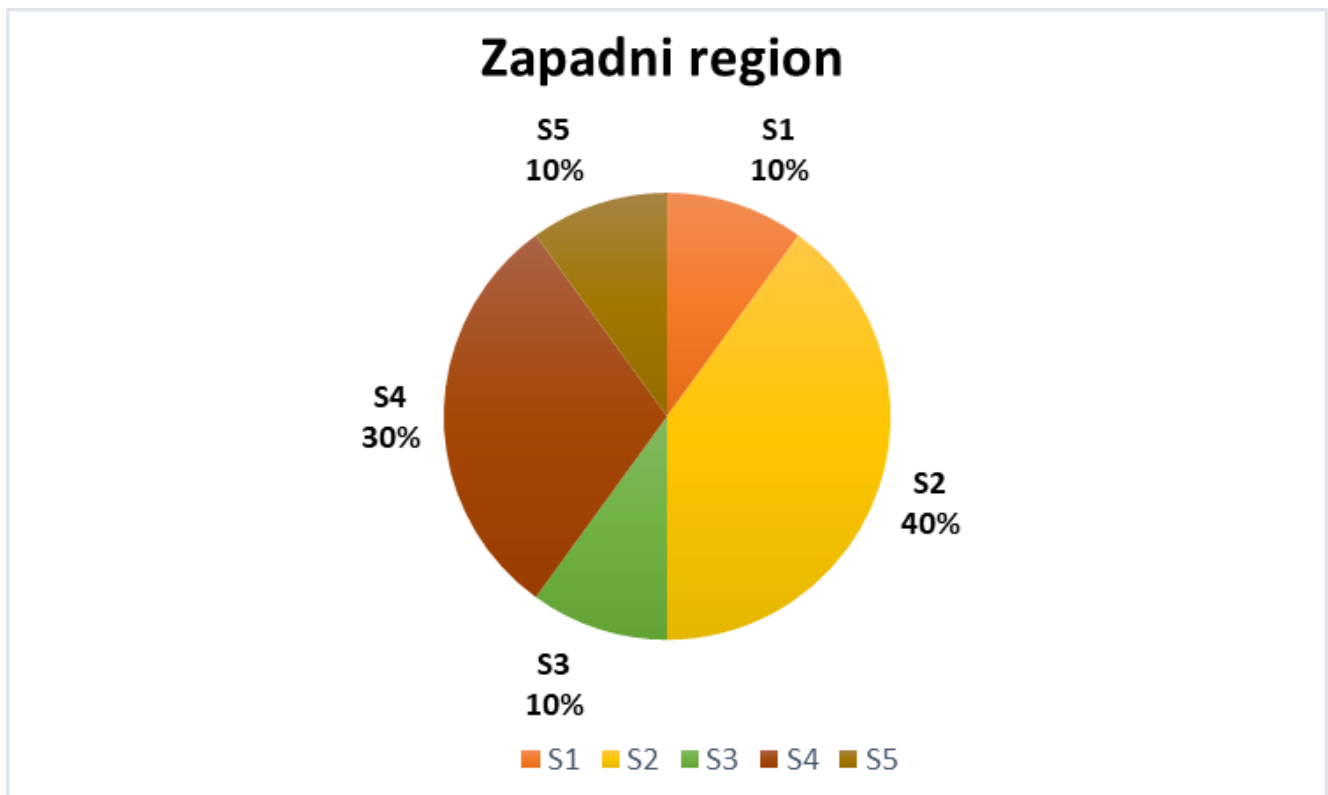
Tip sekvence	Pozicija varijabilnih mesta				
	3 bp	380 bp	400 bp	522 bp	523 bp
Konsenzus	T	A	G	C	A
S1
S2	A
S3	A	G	T	.	G
S4	A	G	T	T	G
S5	A	G	T	T	.

Skraćenica. bp-bazni parovi, T-timin, A-adenin, G-guanin, C-citozin.

Po četiri sekvence (4/30, 13,3%) pripadaju S1, S4 i S5 tipu sekvenci, 17/30 (56,7%) pripada tipu sekvence S2, a jedna sekvenca (1/30, 3,4%) pripada tipu sekvence S3. U pogledu regionalne distribucije, 20 sekvenci potiče od životinja sa lokaliteta u istočnom regionu i 10 sa lokaliteta u zapadnom regionu. Svih pet tipova sekvenci su prisutne u zapadnom regionu, dok su četiri (S1, S2, S4 i S5) prisutne u istočnom regionu u kome jedino sekvenca S3 nije pronađena. Iako je tip sekvence S2 bio dominantan u oba regiona (65% u istočnom regionu, 40% u zapadnom regionu), uočene su neznatne razlike u pogledu distribucije tipova sekvenci između regiona, sa dominacijom S2 i S4 na zapadu i S1, S2 i S5 na istoku (Slika 24 i Slika 25).



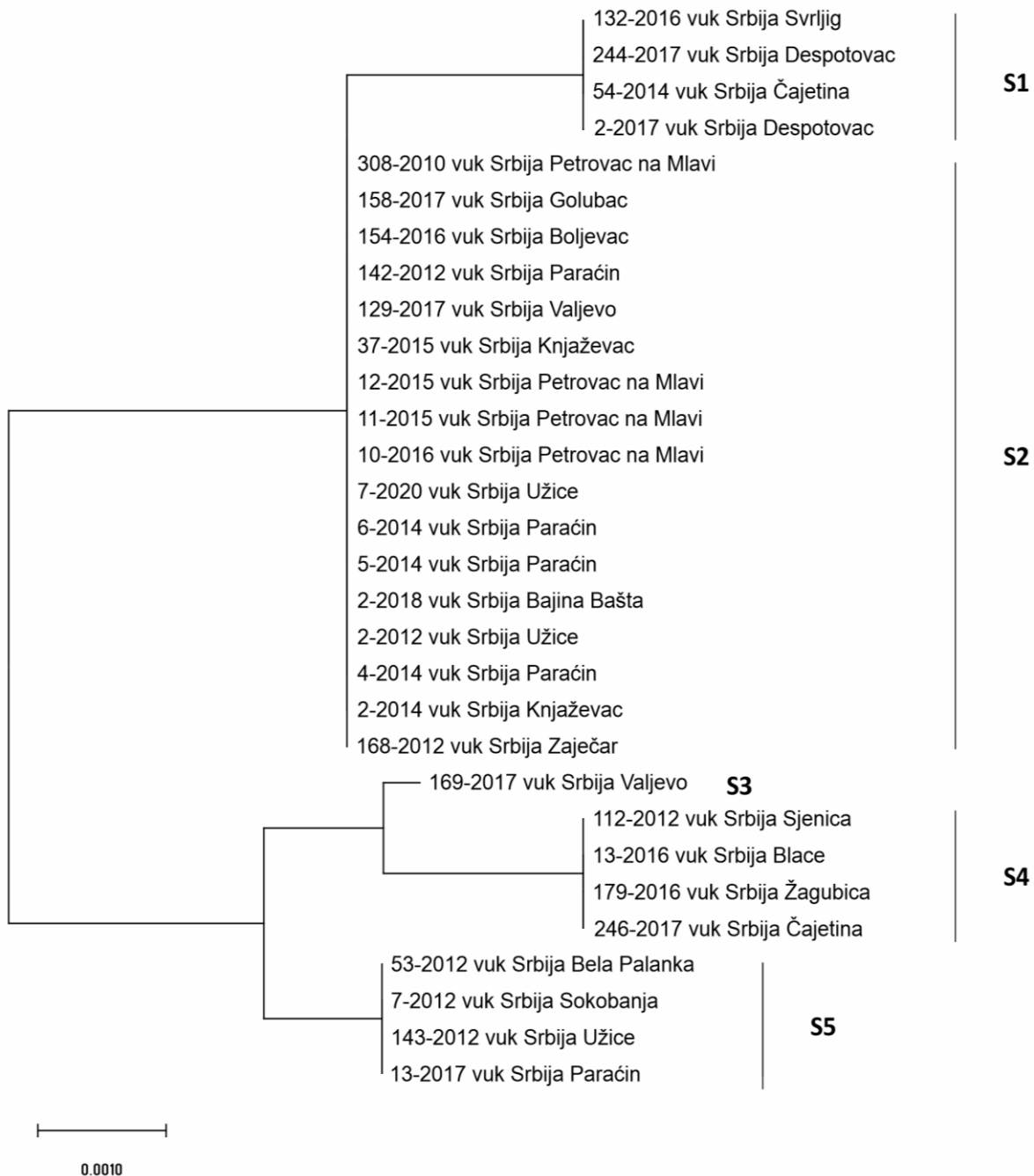
Slika 24. Distribuciju tipova sekvenci S1-S5 u istočnom regionu



Slika 25. Distribucija tipova sekvenci S1-S5 u zapadnom regionu

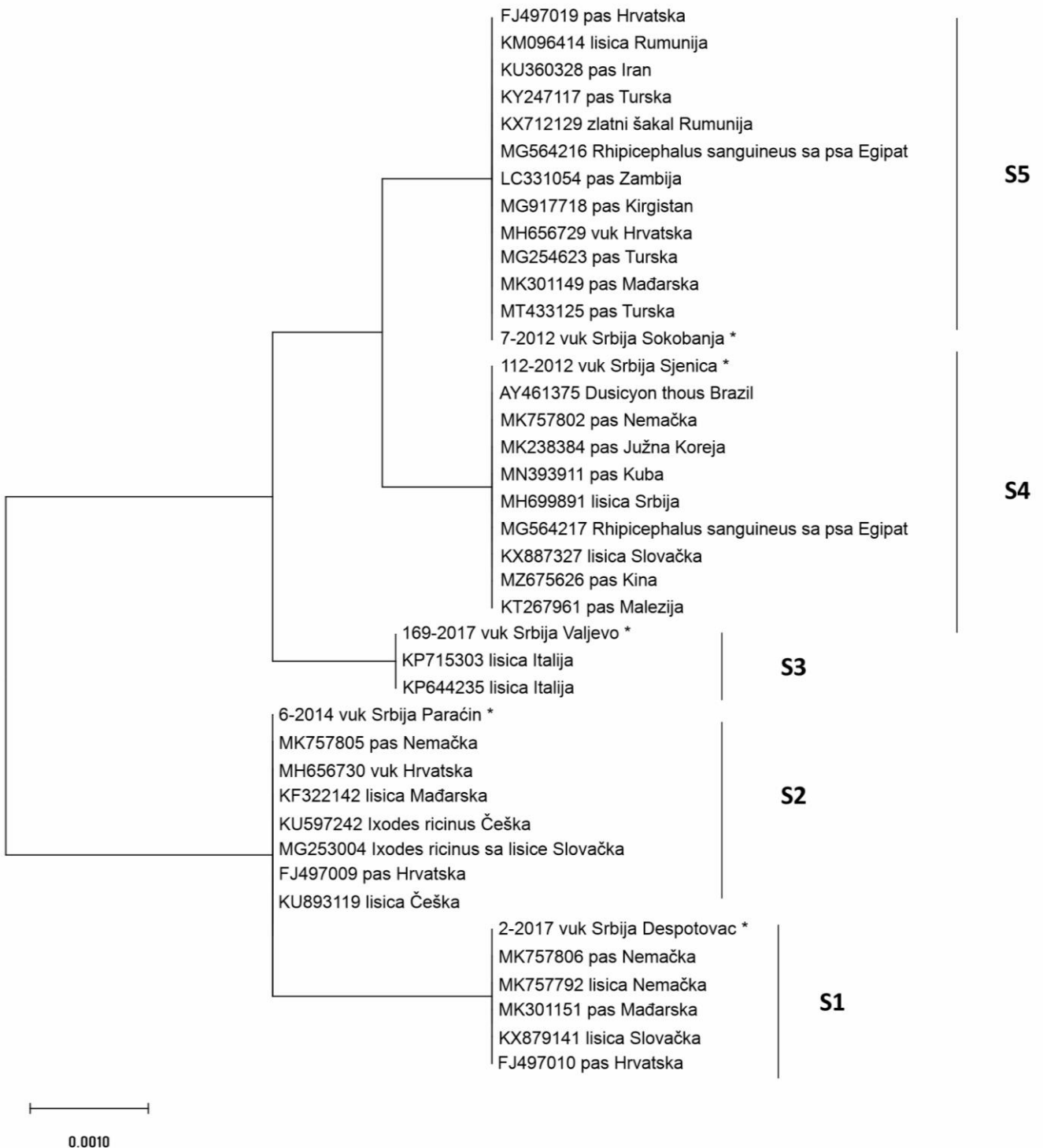
4.4.1.1. Filogenetske analize prisustva *Hepatozoon canis* u populaciji vuka

Filogenetske „neighbour-joining“ analize 18S rRNA sekvenci *Hepatozoon canis* su vršene na ukupno 30 sekvenci dužine 539 bp, kod kojih se na osnovu uočenih varijabilnih pozicija se izdvojilo pet različitih tipova sekvenci (S1-S5) *H. canis* (Slika 26).



Slika 26. „Neighbour-joining“ analiza 18S rRNA sekvenci *Hepatozoon canis* detektovanih u vukovima u Srbiji. Tipovi sekvenci (S1-S5) su označeni brojem grupe na desnoj strani slike. Za svaku životinju su naznačeni kolektorski brojevi i lokaliteti.

Za dalju analizu odabrano je pet reprezentativnih sekvenci dobijenih u ovoj studiji, po jedna iz svakog tipa sekvence. Na osnovu rezultata BLAST pretrage sa prethodno deponovanim sekvencama dostupnim u banci gena (GenBank®) sekvenca S1 tipa je pokazala 100% identičnost sa sekvencama *H. canis* u pasima iz Hrvatske, Mađarske i Nemačke (pristupni brojevi - FJ497010, MK301151, MK757806) i lisicama iz Slovačke i Nemačke (KKS879141, MK757792); reprezentativna sekvenca S2 tipa sa sekvencama *H. canis* u pasima iz Hrvatske i Nemačke (FJ497009, MK757805), lisicama iz Češke i Mađarske (KU893119, KF322142), vukovima iz Hrvatske (MH656730) i krpeljima *I. ricinus* iz Slovačke i Češke (MG253004, KU597242). Tip sekvence S3 poklapa se sa samo dve sekvence iz banke gena (GenBank®), obe poreklom iz lisica iz Italije (KP715303, KP644235). Reprezentativna sekvenca S4 tipa pokazala je 100% identičnost sa sekvencama *H. canis* u pasima iz Nemačke, Južne Koreje, Kube, Kine i Malezije (MK757802, MK238384, MN393911, MZ675626, KT267961), lisicama iz Srbije i Slovačke (MH699891, KKS887327) i jedne južnoameričke vrste lisica (*Dusicyon thous* Linnaeus, 1766) iz Brazila (AY461375) i krpelju *R. sanguineus* sa psa iz Egipta (MG564217). S5 tip sekvence identičan je sa sekvencama *H. canis* u pasima iz Irana, Zambije, Kirgistana, Turske, Mađarske i Hrvatske (KU360328, LC331054, MG917718, KI247117, MK301149, FJ497019), lisicama i šakalima iz Rumunije (KM096414, KKS712129), vukovima iz Hrvatske (MH656729) i *R. sanguineus* krpelju sa psa iz Egipta (MG564216) (Slika 27).



Slika 27. „Neighbour-joining“ analiza sekvenci fragmenta 18S rRNA gena *Hepatozoon canis* reprezentativnih sekvenci dobijenih u ovoj studiji i dostupnih u banci gena (GenBank®). Vrsta domaćina, pristupni broj i zemlja porekla dati su za svaku nukleotidnu sekvencu iz banke gena (GenBank®). Reprezentativne sekvence iz ove studije su označene svojim kolektorskim brojem i zvezdicom (*).

4.4.2. Diverzitet različitih genotipova *Hepatozoon canis* u populaciji šakala

Sekvencirano je ukupno 35 uzoraka šakala, 32 adultne jedinke i 3 juvenilne jedinke, PCR-pozitivnih na *H. canis*. Sekvenciranje je bilo uspešno za sve uzorke. Sekvence 18S rRNA gena *H. canis*, bile su dužine u rasponu od 606 do 622 bp, dok je poravnanje svih sekvenci bilo dužine 567 bp. Sve sekvence su deponovane u banci gena (GenBank®) pod pristupnim brojevima (PP711216 - PP711250) (Tabela 18). Analizom sekvenci detektovana je varijabilnost na tri pozicije u sekvencama *H. canis* poreklom iz šakala. Identifikovana su četiri različita tipa sekvenci. Dva tipa sekvenci su identična tipovima sekvenci prethodno identifikovanih kod vuka (S4 i S5), dok su druga dva jedinstvena tipa sekvenci označena kao S6 i S7 (Tabela 19).

Tabela 18. Deponovane sekvence *Hepatozoon canis* detektovane u analiziranom uzorku šakala

Pristupni broj	Lokalitet	Tip sekvence
PP711216	Veliko Gradište	S4
PP711217	Surčin	S4
PP711218	Velika Plana	S4
PP711219	Surčin	S4
PP711220	Pećinci	S4
PP711221	Zaječar	S4
PP711222	Golubac	S4
PP711223	Velika Plana	S4
PP711224	Pećinci	S4
PP711225	Niš	S4
PP711226	Aleksinac	S4
PP711227	Veliko Gradište	S4
PP711228	Bač	S4
PP711229	Pećinci	S4
PP711230	Smederevo	S5
PP711231	Surčin	S5
PP711232	Titel	S5
PP711233	Zemun	S5
PP711234	Ruma	S5
PP711235	Kovin	S5
PP711236 JUV	Barajevo	S5
PP711237	Surčin	S5
PP711238 JUV	Surčin	S5
PP711239	Surčin	S5
PP711240	Pećinci	S5
PP711241	Lazarevac	S5
PP711242	Bač	S5
PP711243	Smederevo	S5
PP711244	Šid	S6
PP711245	Bela Palanka	S6
PP711246 JUV	Pećinci	S6
PP711247	Svilajnac	S5
PP711248	Surčin	S7

PP711249	Čajetina	S5
PP711250	Čajetina	S4

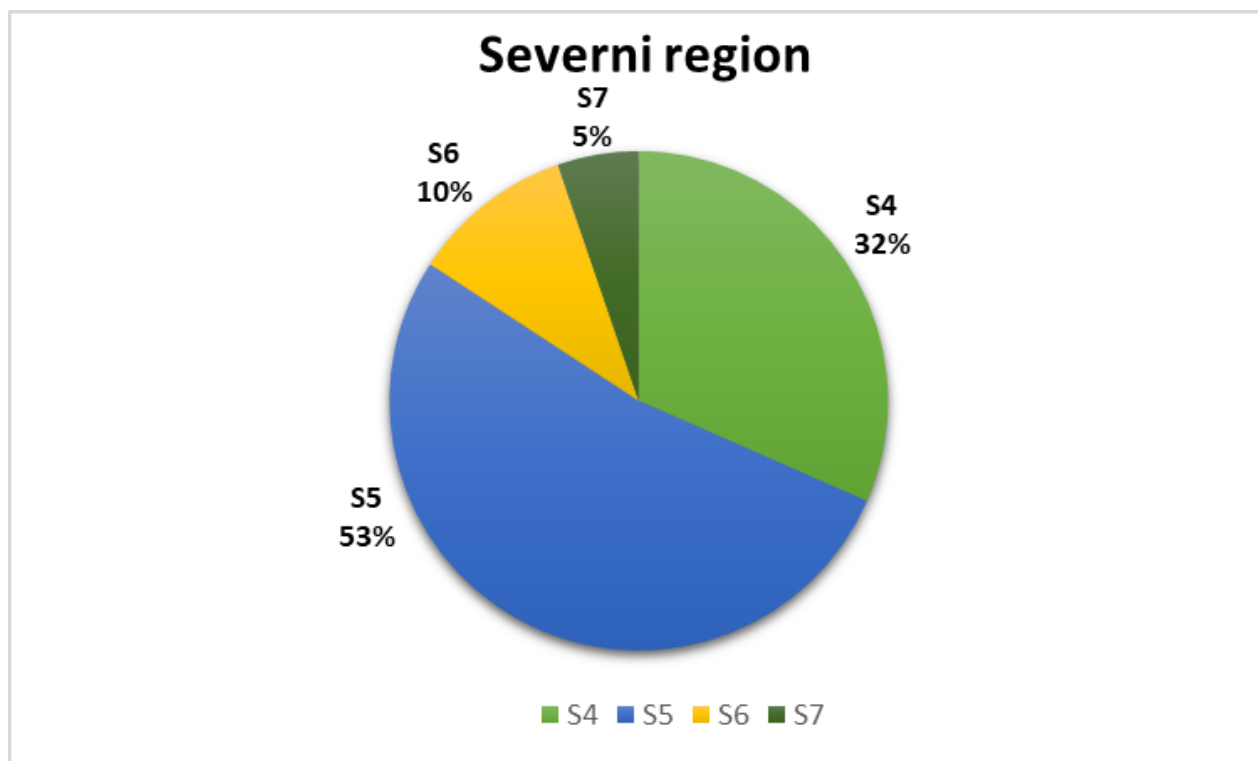
Skraćenica. JUV- juvenilna jedinka šakala

Tabela 19. Pozicija varijabilnih mesta u parcijalnim sekvencama 18S rRNK gena (567 bp)

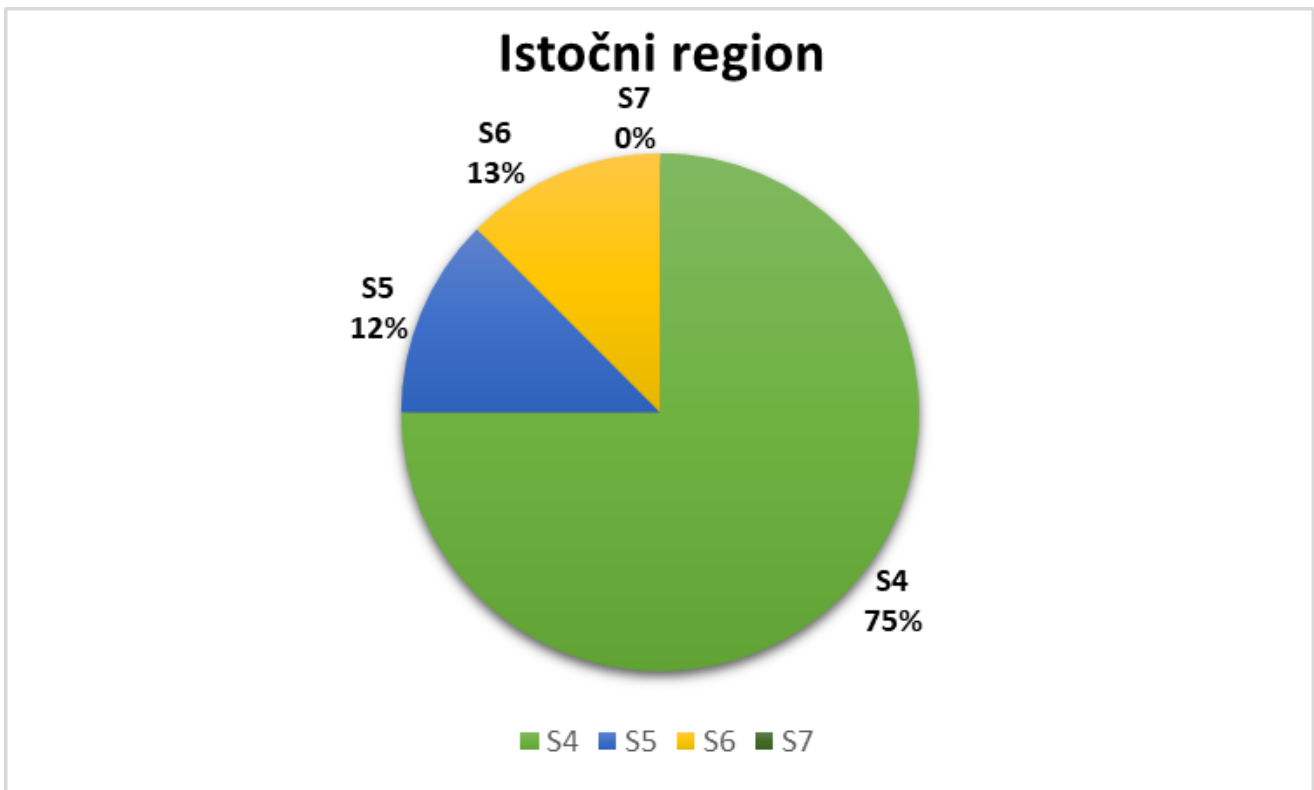
Tip sekvence	Pozicija varijabilnih mesta		
	85 bp	549 bp	550 bp
Konsenzus	A	T	A
S4	.	.	G
S5	.	.	A
S6	.	C	.
S7	G	.	.

Skraćenica. T-timin, A-adenin, G-guanin, C-citozin.

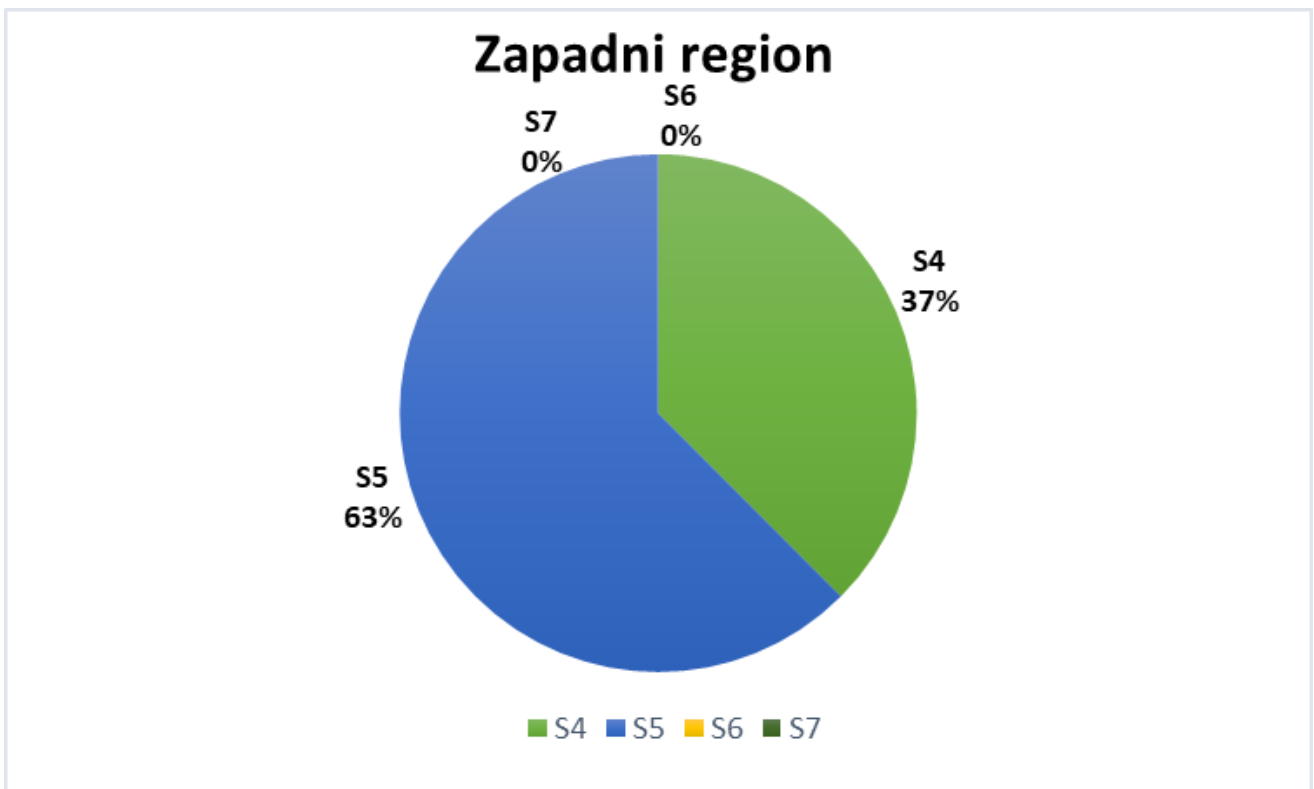
Na osnovu registrovanih tipova sekvenci u uzorku vuka u Srbiji, gde je genetska raznolikost patogena bila veća (S1-S5) nego kod šakala (S4-S7), identifikovano je da su S4 i S5 identični kod ove dve vrste kanida. Od svih identifikovanih sekvenci, 14/35 (40%) su pripadale S4 tipu, 16/35 (45,7%) S5 tipu, 3/35 (8,57%) S6 tipu, a jedna je pripadala S7 tipu sekvenci. Regionalno, 19 sekvenci je poreklom iz severne Srbije, 8 iz zapadne Srbije i 8 iz istočne Srbije. Svi tipovi sekvenci su prisutni na severu, tri (S4, S5, S6) tipa su prisutna na istoku, a dva (S4, S5) na zapadu. S5 tip je dominirao u severnom (53%) i zapadnom (63%) regionu, dok je S4 tip dominirao na istoku (75%). U severnom regionu tip sekvence S4 (32%) i S6 (10%) su bile druga, odnosno treća po zastupljenosti, u istočnom regionu to su sekvence S6 (13%) i S5 (12%), a u zapadnom S4 sekvenca (37%) (Slike 28 - 30).



Slika 28. Distribuciju tipova sekvenci S4-S7 u severnom regionu



Slika 29. Distribuciju tipova sekvenci S4-S7 u istočnom regionu



Slika 30. Distribuciju tipova sekvenci S4-S7 u severnom regionu

4.4.2.1. Filogenetske analize sekvenci *Hepatozoon canis* u analiziranom uzorku šakala

Filogenetske analize su vršene na ukupno 35 sekvenci dužine 567 bp, gde se na osnovu uočenih varijabilnih pozicija izdvaja četiri različita tipa sekvenci (S4-S7) *H. canis*. Sekvence *H. canis* poreklom iz šakala, preliminarnom BLAST analizom pokazale su podudarnost sa ranije objavljenim sekvencama iz Srbije, uključujući one poreklom iz vukova, lisica, pasa, žutogrlog miša *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834 i krpelja *R. sanguineus*. Kombinovani skup podataka od 77 sekvenci gena 18S rRNA *H. canis* (35 iz ove studije i 42 ranije objavljenih) podvrgnuta je filogenetskoj analizi (Slika 31, Slika 32).

Filogenetske analize „maximum likelihood“ i Bajesova statistika svih sekvenci uključenih u studiju dale su uglavnom slične rezultate (Slika 31, Slika 32). Filogenetska analiza otkrila je tri velika klastera (Slika 31). Prvi klaster, je bio heterogen (29/77, 37,66%), i sekvence izolovane iz šakala su pokazale 100% identičnost sa sekvencama izolovanim iz vuka (pristupni brojevi - OP012778, OP012787, OP012799, OP012801), lisica (MH699886, MH699888, MH699885, MH699892, MH699887, MH699891, MH699889, MH699884, MH699890) i jednom iz *A. flavicollis* (OQ262961), sve su pripadale S4 tipu. Drugi klaster (24/77, 31,17%) je bio raznolik i sadržao je sekvence iz šakala, vuka (OP012782, OP012788, OP012777, OP012798, OP012794) i jednog krpelja (*R. sanguineus*) (MZ146329), gde je dominirao S5 tip, uz samo tri prisutne sekvence šakala klasifikovane kao S6 tip. Treća klada (21/77, 27,27%) je bila monofiletska, sastojala se od sekvenci izolovanih iz vuka, u kojoj je dominirao S2 tip sekvenci (OP012775, OP012773, OP012783, OP012784, OP012793, OP012781, OP012780, OP012791, OP012797, OP012802, OP012774, OP012776, OP012795, OP012786, OP012789, OP012785, OP012796), uz samo četiri prisutne S1 sekvence (OP012790, OP012800, OP012779, OP012792). Tri sekvence se nisu uklapale u ove klastera i klasifikovane su kao S3 izolovana iz vuka (OP012798), S7 izolovana iz šakala u toku ove studije i S8 izolovana iz psa (MZ930460). Treba napomenuti da je jedini izuzetak između dva filogenetska stabla uočen u položaju jedne sekvence koja potiče od vuka (prema br. OP012798). U filogenetskom stablu „maximum likelihood“, ova sekvenca je identifikovana kao tip sekvence S3, dok je u Bajesovom stablu klasifikovana u tip sekvence S4.



Slika 31. Filogenetsko stablo „maximum likelihood“ konstruisano korišćenjem 77 sekvenci gena fragmenata 18S rRNA *H. canis*. Stablo je ukorenjeno odgovarajućim sekvencama *Hepatozoon felis*. Brojevi na granama označavaju bootstrap vrednosti ≥ 50 . Sekvence izolovane iz šakala su uokvirene narandžastom bojom.



Slika 32. Bajesovo filogenetsko stablo konstruisano korišćenjem 77 18s rRNA fragmentnih sekvenci gena *H. canis*. Stablo je ukorenjeno korišćenjem četiri sekvence *H. felis* (OK931338, OL852087, MZ475977 i MZ475980). Brojevi na granama označavaju posteriorne verovatnoće. Sekvence izolovane iz šakala su označene crvenom bojom.

5. DISKUSIJA

U okviru ove studije je prvi put sistematično analizirano prisustvo i genetički diverzitet patogena *Hepatozoon canis* kod vuka i šakala na širokom prostoru njihovog areala u Srbiji. Studije ovog karaktera su veoma značajene jer mogu ukazati na ulogu koju vukovi i šakali imaju u enzootskim ciklusima kruženja patogena *H. canis* na prostoru koji se istražuje. Prethodna istraživanja su pokazala da divlje kanide, uključujući vuka, lisicu, šakala i rakunolikog psa, igraju značajnu ulogu kao domaćini i rezervoari za različite patogene koji se prenose vektorima (Duscher et al., 2015; Sukara et al., 2018; Juwaid et al., 2019; Ebani et al., 2023). Njihovo široko rasprostranjenje, brza prilagodljivost i interakcije sa domaćim životinjama i ljudima čine ih ključnim faktorima u epidemiologiji bolesti koje prenose vektori kao što su krpelji, buve i komarci.

U današnje vreme širenju bolesti koje prenose vektori, izvan njihovog prirodnog areala aktivno doprinose klimatske promene koje se dešavaju usled povećane emisije gasova staklene bašte (Medlock & Leach, 2015; Ogden & Lindsay, 2016; Bouchard et al., 2019; de Souza & Weaver, 2024). Usled rasta srednje godišnje temperature mnogi vektorski organizmi šire svoje rasprostranjenje na sever (odnosno na jug na južnoj hemisferi), tako da se sve veći broj vektorski prenosivih bolesti registruje sa većom učestalošću kod životinja unutar područja gde ranije nisu registrovane, ili su samo sporadično bile prisutne. Tako je u porastu i pojava većeg broja krpeljski prenosivih bolesti uzrokovanih patogenima koji ranije nisu bili potvrđeni u pojedinim delovima Evrope (Semenza & Suk, 2018). Klimatske promene su jedan od razloga za širenje *H. canis*. Veruje se da uz dejstvo drugih faktora (npr. putovanje kućnih ljubimaca sa vlasnicima), širenje geografskog područja *Rhipicephalus sanguineus* usled klimatskih promena i globalnog zagrevanja znatno doprinosi i širenju *H. canis* (Dantas-Torres et al., 2015; Dantas-Torres, et al., 2017; Hansford et al., 2018).

Poslednjih godina, hepatozoonoza, kao krpeljski prenosiva bolest, pokazuje sve veći trend širenja kod kanida širom sveta. Taj trend širenja je posebno izražen na prostoru Evrope (Tołkacz et al., 2023). Pseći krpelj *R. sanguineus* je prepoznat kao primarni vektor odgovoran za prenošenje *H. canis* (Baneth et al., 2007), uzročnika ove bolesti. Ova vrsta krpelja je široko rasprostranjena u Evropi i parazitira na velikom broju divljih životinja (Dantas-Torres, 2010). Za razliku od drugih krpeljski prenosivih patogena, *H. canis* se na pse i druge kanide prenosi ingestijom zaraženog krpelja (Baneth et al., 2007; Baneth 2011). Pretpostavke su da do unosa dolazi prilikom čišćenja krzna i/ili iritacije izazvane svrabom.

Međutim, značaj vuka u transmisiji patogena koji se prenose iksodidnim krpeljima do sada nije bio u značajnijem fokusu istraživanja, i zato se malo zna o njegovoj ulozi u enzootskom ciklusu krpeljski prenosivih bolesti. Velika mobilnost vuka, široki areali, velike individualne teritorije (eng. *home range*), predatorske navike i česti kontakti sa ljudima, psima i drugim domaćim životinjama (Jeđrzejewski et al., 2012) čine ih potencijalno važnim rezervoarom zoonoza. Vuk deli većinu parazita i patogena sa domaćim psima (Popiołek et al., 2007; Alsarraf et al., 2023) i divljim kanidama (Almberg et al., 2012). Primer tome mogu da budu infekcije krpeljski prenosivih patogena poput *Borrelia* spp. i *Babesia* spp., koje su detektovane kod vuka u Evropi (Kloch et al., 2005; Jara et al., 2016; Battisti et al., 2020), zatim *Anaplasma phagocitophilum* i *Babesia canis* koje su registrovane kod vuka u većem broju zemalja (Karbowiak et al., 2008; Erdélyi et al., 2014; Jara et al., 2016; Hodžić et al., 2020; Wymazał et al., 2024). Na prostoru Srbije studije o prisustvu parazita u populaciji vuka započete su poslednjih desetak godina pri čemu je njihov glavni fokus bio na analizama gastrointestinalnih parazita, trihinele i dirofilarije (Cvetković et al., 2011; Penezić et al., 2014; Teodorović et al., 2014; Ćirović et al., 2015b; Pavlović et al., 2017; Gajić et al., 2019; Uzelac et al., 2019).

Kao i vukovi, šakali su takođe prepoznati kao važni domaćini za veliki broj patogena, u prilog tome bi moglo ići pre svega njihova plastičnost i oportunističnost. Preferencija ka staništima na nižim nadmorskim visinama, sposobnost uspostavljanja populacija u blizini ljudskih naselja (Ćirović et al., 2016) i bliski filogenetski odnosi sa psima (Galov et al., 2015; Ninausz et al., 2023) povećavaju verovatnoću interakcije između ove dve vrste kanida. Uzimajući u obzir ove činjenice, šakali bi mogli postati najznačajniji rezervoari bolesti od zoonotskog značaja među evropskim kanidama. Širenje areala (Trouwborst et al., 2015; Krofel et al., 2017), visoke brojnosti i gustine lokalnih populacija (Šálek et al., 2014) u nekim delovima areala idu u prilog ovoj tezi. Šakal je identifikovan kao domaćin za veliki broj patogena uključujući niz onih koji se prenose vektorima, kao što su *Ehrlichia canis* Donatien & Lestoquard 1935, *A. phagocitophilum*, patogeni iz grupe rikecija koji izazivaju pegavu groznicu (Waner et al., 1999), *Dirofilaria* spp. (Penezić et al., 2014; Ionică et al., 2016), *Thelazia callipaeda* Railliet & Henry, 1910 (Mihalca et al., 2016), *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 (Hervás et al., 1996; Ćirović et al., 2014b), *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. i *Leishmania* spp. (Sukara et al., 2018), *H. canis* (Duscher et al., 2013; Farkas et al., 2014).

Ova doktorska disertacija je prva studija o *H. canis*, patogenu koji se prenosi krpeljima u populaciji vuka u Srbiji, takođe, treća takva studija u svetu. Ova činjenica govori u prilog tome koliko je malo izučavan značaj vuka kao potencijalnog rezervoara, kao i njegov doprinos u širenju ovog patogena. Nešto bolja istraženost u ovom pogledu karakteriše šakala. Nekoliko studija sprovedenih na prostorima jugoistočne i centralne Evrope daje prikaz prisustva i prevalencije *H. canis* u populacijama šakala (Duscher et al., 2013, 2014b; Farkas et al., 2014). U okviru studije Duscher i saradnici (2014b) analizirali su veliki uzorak šakala poreklom iz Srbije (206/311), testirane jedinke su imale visoku prevalenciju. Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da je *H. canis* u Srbiji široko rasprostranjen i da su registrovane prevalencije kod vuka i šakala visoke. Prema ranije objavljenoj studiji o prisustvu *H. canis* u populacijama šakala sa područja Mađarske, Srbije i Austrije, prevalencija kod šakala iz Srbije je bila 67,5%, što je u skladu sa rezultatima iz ove studije (Duscher et al., 2014b). Istraživanjem prisustva *H. canis* u vuku i šakalu utvrđeno je da je parazit široko rasprostranjen na prostoru Srbije. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Juwaid-a i saradnika (2019).

Iako se distribucije vuka i šakala u Srbiji u dobroj meri preklapaju, postoji značajna razlika u preferenciji staništa koje ove dve vrste kanida naseljavaju. Vuk preferira šumovite, brdske i planinske predele u istočnim, zapadnim i južnim delovima zemlje, dok su šakali, kao oportunisti prisutni na skoro celoj teritoriji Srbije, gde preferiraju niže nadmorske visine i staništa obrasla gustom vegetacijom, šumom i žbunastom vegetacijom, obrasle obale reka i močvara, poljoprivredne predele i suburbane zone. Gustine populacije šakala jasno se razlikuju u odnosu na nadmorsku visinu. U nižim predelima u kojima dominiraju antropogeno izmenjeni predeli gustine lokalnih populacija šakala su izuzetno visoke (oko 1,1 grupa/10 km²) (Šálek et al., 2014), dok je znatno niža u planinskim predelima. Na osnovu razlika u preferenciji staništa, odnosno klimatskih i geografskih odlika koji su karakteristični za ta staništa i koja mogu u većoj ili manjoj meri pogodovati krpeljima ili patogenu može se objasniti razlika u prevalenciji *H. canis* kod vuka i šakala. Učestalost pojavljivanja *H. canis* u analiziranom uzorku šakala je za oko 21% bila veća u odnosu na vuka (prevalencija kod vuka 57,94%, kod šakala 78,95%).

Eksplozivni rast, velika brojnost koja se procenjuje na više od 20000 jedinki sa tendencijom daljeg širenja, kao i velika gustina populacije šakala u Srbiji (Ćirović et al., 2018) mogu u velikoj meri objasniti veću prevalenciju *H. canis* kod ove kanide. Dok je populacija vuka u Srbiji stabilna, ali manje brojna, oko 700-800 jedinki (Milenković et al., 2007) pa je to mogući razlog manje prevalencije patogena.

U evropskim populacijama vuka nema mnogo literaturnih podataka o prevalencijama patogena *H. canis*. Postoje samo dve studije koja su publikovane na vuku, u Nemačkoj (46%) (Hodžić et al., 2020) i Italiji

(75,8%) (Battisti et al., 2020). Većina studija je pokazala da su šakali i lisice veoma podložni infekciji *H. canis*, sa prevalencijama i do 90% u nekim delovima Evrope, a rezultati sugerišu da ove dve vrste kanida mogu biti potencijalni rezervoari za *H. canis* (Cardoso et al., 2014; Duscher et al., 2014b; Farkas et al., 2014; Najm et al., 2014; Hodžić et al., 2015; Mitková et al., 2017; Hodžić et al., 2018a, Juwaid et al., 2019). Sprovedene studije o prisustvu *H. canis* kod šakala u Evropi dokumentovale su visoku prevalenciju (60%) u Mađarskoj (Farkas et al., 2014), dok je jedna jedinka, slučajno stradala u saobraćaju, testirana i bila pozitivna na *H. canis* u Austriji (Duscher et al., 2013). Takođe, visoka prevalencija detektovana je kod vuka u Nemačkoj (46%) (Hodžić et al., 2020) i Italiji (75,8%) (Battisti et al., 2020). U poređenju sa vukom i šakalom, registrovane prevalencije kod lisice su značajno varirale među evropskim zemljama, a najviše su bile u Španiji (100% i 91%) (Criado-Fornelio, et al., 2018; Ortuño et al., 2022), Nemačkoj (77,6%) (Helm et al., 2020), Portugalu (75,6%) (Cardoso et al., 2014), Srbiji (61,2%) (Juwaid et al., 2019) i Austriji (58,3%) (Duscher et al., 2014a). Ranije sprovedene studije su zabeležile niske prevalencije *H. canis* kod pasa (20,42%; 18,18%; 1,81%) (Helm et al., 2020; Dordio et al., 2021; Sukara et al., 2023) i mačaka (1,7%; 0,51%) (Criado-Fornelio, et al., 2009; Giannelli et al., 2017).

Osim kod autohtonih divljih kanida (vuka, šakala i lisice), u Srbiji je registrovano prisustvo *H. canis* kod različitih vrsta životinja, uključujući krpelje *I. ricinus* (Potkonjak et al., 2016) i *R. sanguineus* (Banović et al., 2021), pse (Gabrielli et al., 2015; Sukara et al., 2023) i žutogrlog miša *A. flavicollis* (Veinović et al., 2024), što bi ovog patogena činilo izuzetno prilagodljivim različitim vrstama domaćina koje postaju deo transmisionog ciklusa *H. canis*.

U analiziranim uzorcima vuka i šakala na području Srbije u ovoj studiji registrovane su razlike u prevalenciji u odnosu na pol. Na ukupnom uzorku vuka prevalencije u odnosu na pol su bile različite. Kod ženki ona je iznosila 54,55%, a kod mužjaka 60,32%. I kod šakala postojala je razlika u prevalenciji između polova, ali je u odnosu na vuka imala drugačiji obrazac, pa je kod ženki (80%) bila nešto veća nego kod mužjaka (78,13%). Statističke analize nisu pokazale značajnost između polova unutar vrsta. Generalno posmatrano prevalencije kod mužjaka i ženki šakala su bile znatno veće nego kod mužjaka i ženki vukova. Svakako buduća istraživanja bi trebalo da rasvetle ove dobijene razlike između polova kod vuka i šakala, pošto su dobijeni rezultati za vuka značajno drugačiji od podataka iz Nemačke gde je prevalenca bila slična za ženke (46,2%) i mužjake (45,9%) (Hodžić et al., 2020).

U okviru ove studije uključene su samo adultne jedinke vuka, dok je u uzorku šakala bilo 13,16% juvenilnih jedinki (štenaca). Sve analizirane juvenilne jedinke su bile starosti od 3-7 meseci. Šest od 15 analiziranih štenaca šakala (40%) je bilo pozitivno na *H. canis*. Ova činjenica ukazuje da se šakali zaraže još kao štenci, verovatno kada timare svoje krzno i slučajno progutaju zaraženog krpelja (Baneth et al., 2003). U okviru studije Sukara i saradnici (2018) prikupljeno je ukupno 118 krpelja sa jedinki šakala u Srbiji, procentualna zastupljenost vrsta krpelja bila je 54,2% *I. ricinus*, 39,8% *D. reticulatus*, 5,9% *H. concinna*. Pored ingestije zaraženog krpelja (Baneth et al., 2011; 2017), visok procenat pozitivnih štenaca, koji su bili starosti od samo 3-7 meseci, na *H. canis* takođe može ukazivati i na potencijalno transplacentnu transmisiju sa majke na potomstvo (Murata et al., 1993; Hodžić et al., 2018a; Schäfer et al., 2022a). Transplacentalni prenos *H. canis*, dokumentovan je kod pasa i lisica u nekoliko studija (Murata et al., 1993; Hodžić et al., 2018; Schäfer et al., 2022a). Ovaj način transmisije je značajan jer omogućava da se parazit direktno prenese sa zaražene majke na njeno potomstvo, zaobilazeći potrebu za vektorom koji će ga preneti sa jednog na drugog domaćina. Transmisija se javlja kada patogen prođe kroz placentnu barijeru tokom trudnoće i inficira fetus.

I u odnosu na prostorni aspekt registrovane su određene razlike u prevalencijama kod vuka i šakala. Za potrebe studije koja je sprovedena na populaciji vuka, Srbija je podeljena na osnovu položaja Velike i

Južne Morave na dva regiona - istočni i zapadni region. Prevalencija *H. canis* kod vuka u Srbiji bila je veća u istočnom regionu 72,7% nego u zapadnom regionu 47,6%. Postojanje ovako velikih razlika između istočnog i zapadnog regiona je uslovalo postojanje statističke značajnosti u njihovim prevalencijama. Slično vuku, za potrebe studije sprovedene na populaciji šakala, Srbija je podeljena na tri regiona - severni, istočni i zapadni, u odnosu na položaj Dunava, Save, Velike i Južne Morave. Najveća prevalencija zabeležena je u zapadnom regionu 95,6%, zatim u istočnom regionu 84,8%, potom severnom regionu 68,9%. Numeričke analize su pokazale postojanje statistički značajnih razlika između ova tri regiona.

Rezultati ukazuju da su najveće prevalence kod vuka i šakala bile u periodu 2012. odnosno 2013. godine. Razlog tome bi mogli da budu klimatski uslovi iz tog perioda koji su pogodovali razvoju i brojnosti populacija krpelja i njihovoj inficiranosti. Kako kod nas ne postoji sistemski populacioni monitoring krpelja koji podrazumeva procene brojnosti i gustine populacija, ovo objašnjenje može biti prihvaćeno samo na nivou hipoteze. U budućim istraživanjima krpeljski prenosivih patogena, svakako treba obratiti posebnu pažnju na populaciono-ekološke aspekte različitih vrsta krpelja koji imaju medicinski i/ili veterinarski značaj. Praćenje populacione dinamike krpelja tokom vremena svakako može delom rasvetliti različite prevalencije mnogih iksoidnih patogena u populacijama njihovih domaćina. Sa prostorno-vremenskog aspekta, zabeležena je izvesna fluktuacija prevalencija tokom 11 analiziranih godina kod šakala (2010-2020. godina), odnosno 10 kod vuka (2010-2019. godina). U toku 2012. godine zabeležena je najviša prevalencija patogena kod vuka u zapadnom regionu (50%), dok je 2014. godina sa najvišom prevalencijom u istočnom regionu (75%). Kod šakala, zapadni region je takođe imao najvišu prevalenciju patogena u toku 2012. godine (100%), severni region u toku 2013. godine (82,35%), istočni u toku 2016. (100%). Kao i na nivou cele Srbije, osobenosti i razlike regionalne klime koji su bile tokom ovih godina mogu biti razlog različitim prevalencijama koje su registrovane na nivou regiona.

Prevalencije *H. canis* kod vuka bile su najveće u vreme zimskih meseci, u toku januara (75%) u istočnom regionu, u toku februara (50%) u zapadnom regionu. Slični rezultati dobijeni su i kod šakala, gde je najveća prevalencija uočena u decembru (86,66%) u istočnom regionu i u januaru u zapadnom (100%) i severnom regionu (85,71%). Ovako visoke prevalencije bi mogle biti uslovljene veličinom uzorka. Naime najveći broj uzoraka vuka i šakala je poreklom iz zimske sezone, kada se ove životinje najviše i love. I ove razlike bi trebalo proveriti budućim istraživanjima i to pre svega prikupljanjem većeg broja životinja tokom proleća, leta i jeseni, i na taj nači izbalansirati veličinu uzorka što će svakako doprineti kvalitetu dobijenih rezultata.

Filogenetske analize sprovedene u okviru ove studije imale su za cilj da se analizira genetička varijabilnost *H. canis* kod vuka i šakala kao i da se proceni srodnost između *H. canis* 18S rRNA sekvenci preuzetih iz banke gena (GenBank®) i novodobijenih sekvenci iz ovih istraživanja. Dobijeni rezultati u okviru ovih istraživanja pokazali su veći genetički diverzitet u sekvencama 18S rRNA gena *H. canis* poreklom iz vuka (ukupno pet tipova sekvenci S1-S5) u poređenju sa onima iz šakala (ukupno četiri tipa sekvence S4-S7). Ove razlike se mogu pripisati faktorima kao što su specifičnost i adaptacija domaćina, dinamika populacije domaćina, dinamika prenosa i geografska specifičnost regiona. Veći diverzitet sekvenci ukazuje na vuka kao primarnog domaćina koji deli dužu evolucionu istoriju interakcije sa *H. canis*. Geografsko područje i preklapanje populacija vuka i šakala u Srbiji razlikuju se između regiona, što dovodi do razlika u izloženosti različitim sojevima parazita ili uslovima životne sredine koji pogoduju prenošenju patogena. Naime na području severnog regiona vuk je samo sporadično prisutan (krajnji jugoistok Banata), dok je šakal široko rasprostranjen.

Dakle, pored visoke prevalencije *H. canis* kod vuka, uočena je i visoka genetička varijabilnost ovog patogena u Srbiji. Identifikovane sekvence su pokazale varijabilnost na pet pozicija na osnovu kojih je

registrovano pet tipova sekvenci (S1-S5). U zapadnom regionu su zastupljeni svi tipovi sekvenci (S1-S5), dok su u istočnom regionu zastupljena četiri tipa (S1, S2, S4 i S5). U oba regiona dominantan je S2 tip sekvence, a postojale su neznatane razlike u pogledu distribucije tipova sekvenci između regiona, gde su dominantne sekvence na zapadu S3 i S4, a na istoku S1, S2 i S5. Prvi put u Srbiji su registrovani različiti tipovi sekvenci *H. canis*, dok prethodne studije nisu pokazale veliku genetičku varijabilnost ovog patogena. U studiji Hodžić i saradnici (2020) dokumentovano je prisustvo samo dva različita genotipa *H. canis* kod vukova u Nemačkoj.

Filogenetske analize sekvenci *H. canis* detektovanih kod šakala pokazale su prisustvo četiri različita tipa sekvenci (S4-S7) u kombinaciji sa tri varijabilna mesta, što ukazuje na visok genetički diverzitet *H. canis* kod šakala u Srbiji. Interesantan fenomen je da je diverzitet tipova sekvenci u regionima bio suprotan prevalenciji patogena u ovim regionima. Najveći diverzitet je registrovan u severnom regionu, gde su se pojavila sva četiri tipa sekvenci (S4-S7), srednji nivo diverziteta je detektovan u istočnom regionu (S4-S6), a najmanja raznovrsnost je pronađena u zapadnom regionu (S4-S5). Slični nalazi bili su i kod vuka u Srbiji, gde je diverzitet sekvenci bio veći u zapadnom regionu, a prevalenca manja i obratno.

S4 tip sekvence patogena *H. canis* detektovan kod vuka u Srbiji je identičan sa nukleotidnim sekvencama *H. canis* koje su izolovane iz lisica u Srbiji (Juwaid et al., 2019) kao i sa delom sekvenci šakala koje su dobijene u sklopu ove disertacije. Imajući u vidu da je ovaj tip sekvence prisutan kod sve tri autohtone kanide u Srbiji, mogao bi potencijalno biti osnovni tip sekvence koji je kasnije diverzifikovao kroz promenu domaćina od lisice, do šakala i vuka. Nije moguće tačno odrediti primarni izvor infekcije kod kanida, ali ovaj nalaz ukazuje na mogući zajednički obrazac prenošenja patogena *H. canis*. S obzirom da je ovaj tip sekvence registrovan i kod žutogrllog miša (*A. flavicollis*), mogući put transmisije patogena bi bio putem plena. Potrebna je detaljnija studija kako u Srbiji tako i na nivou Evrope, koja bi potvrdila obrasce prenošenja i diverzifikaciju sekvenci *H. canis* kod divljih kanida.

U eksperimentalnoj studiji Sloboda i saradnici (2008) su ukazali upravo na još jedan potencijalni vid transmisije *H. canis*, izazivajući infestaciju zmijsa tkivom zaraženih glodara. Visoka genetička varijabilnost *H. canis* u Srbiji, dobijena tokom ove studije, može biti uzrokovana ishranom vuka. Prirodni plen vuka u Srbiji su srne (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) i divlje svinje (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), a ređe zec (*Lepus europaeus*) i sitni glodari (Ćirović et al., 2019). U prilog ovome ide nedavno sprovedena studija koja je utvrdila prisustvo *H. canis* u slezini srna i divokoza (Uiterwijk et al., 2023). Prisustvo ovog patogena karakterističnog za familiju pasa kod divljih preživara je iznenađujuće samo na prvi pogled. Naime, ove vrste su poznate i kao uobičajeni domaćini krpelja, uključujući *R. sanguines*, koji je dominantni vektor *H. canis* (Castillo-Contreras, et al., 2021; Accorsi et al., 2022) što objašnjava pojavu ovog patogena i kod divljih preživara. Tako se osnovano može pretpostaviti da i neke druge vrste mogu biti očekivani domaćini za *H. canis*. U prvom redu bi to mogla biti divlja svinja koja je omnivorna vrsta u čijoj ishrani dominiraju biljke (93%), ali hrani se i hranom animalnog porekla, uključujući gmizavce, male glodare i leševе divljih životinja, za koje je poznato da mogu biti izvor infekcije *Hepatozoon* spp. (Rund et al., 2019; Ferrari et al., 2022) i na taj način imaju potencijal da doprinesu lancu transmisije i vrste *H. canis*. Uzimajući sve navedeno u obzir, postoji mogućnost da se vuk može zaraziti ingestijom zaraženih krpelja zajedno sa tkivom plena (posebno kožom). Nekoliko trofičkih nivoa u lancu ishrane, zajedno sa višestrukim putevima prenosa, mogli bi doprineti visokoj varijabilnosti patogena kod vuka kao vršnog predatora, što je i primećeno u toku ove studije. Ovaj put transmisije otvara nova pitanja i daje prostor za dalja istraživanja i identifikaciju ovog patogena kod drugih životinjskih vrsta, što bi moglo pružiti dokaze koji bi podržali ovaj vid transmisije.

Najčešći tip sekvence *H. canis* detektovan kod šakala bio je S5 tip koji je registrovan i kod krpelja *R. sanguineus*, zatim S4 tip koji je zabeležen kod žutogrllog miša (*A. flavicollis*). Na osnovu ovih nalaza

može se pretpostaviti da i kod šakala transmisija putem zaraženog plena može imati značajnu ulogu u enzootskim ciklusima. U poređenju sa vukovima, lisice i šakali su omnivori koji su veoma prilagođeni koegzistenciji sa ljudima u antropogenim sredinama (Kobryn et al., 2023). U takvim sredinama, prehrambene navike ovih vrsta se u izvesnoj meri preklapaju, oni preferiraju sisare male i srednje veličine (kao što su glodari i zečevi) (Lanszki et al., 2006; Penezić & Ćirović, 2015). I za šakala i za lisicu mali mišoliki glodari predstavljaju glavni prirodni plen (Penezić & Ćirović, 2015). Shodno tome, zbog svojih navika u ishrani, divlje kanide bi se mogle zaraziti putem plena, što je ranije dokazano kod nekih vrsta roda *Hepatozoon* (Smith et al., 1994; Lainson et al., 2003; Sloboda et al., 2008; Johnson et al., 2009a, 2009b; Viana et al., 2012). Značaj ovog vektikalnog prenosa *H. canis* u enzootskim ciklusima je svakako značajna tema za buduća istraživanja u ovoj oblasti.

Dosadašnje studije u Srbiji su potvrdile visoku prevalenciju *H. canis* kod lisice (61,2%) (Juwaid et al., 2019), dok rezultati ove studije pokazuju i visoku prevalenciju *H. canis* kod vuka (57,94%) i šakala (78,95%). Ovakvi rezultati ukazuju na postojeći rizik od transmisije *H. canis* iz silvatičkog ciklusa u gradska, urbana područja. Uprkos ovoj pretpostavci, sekvenca S8 tip (MZ930460), poreklom iz psa iz Srbije (Sukara et al., 2023), do sada nije otkrivena u analiziranim divljim kanidama. Treba napomenuti da postoje veoma limitirani podaci o prevalenciji *H. canis* kod (domaćih) pasa. Stoga se može zaključiti da su neophodna dalja istraživanja većih razmera koja bi trebala da daju više informacija o potencijalnom značaju divljih kanida kao izvora zaraze za domaće pse. Ona bi svakako bacila više svetla na eventualne veze između silvatičkog i urbanog ciklusa *H. canis* i boljim procenama rizika od inficiranja pre svega domaćih životinja.

Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije sugerišu moguću pojavu zajedničkog obrasca prenošenja između kohabitirajućih populacija vuka i drugih domaćih i divljih kanida u Srbiji. Čini se da je uloga vuka u enzootskom ciklusu *H. canis* slična onoj kod lisica i šakala, koji se tradicionalno smatraju glavnim rezervoarom ovog protozojskog parazita i potencijalnim izvorom infekcije za simpatričke kanide. Ova studija može doprineti boljem razumevanju epidemiologije *H. canis*, kao i dinamike prenosa patogena među populacijama divljih kanida. Međutim, potrebna su dalja istraživanja da bi se procenila moguća vertikalna i horizontalna transmisija *H. canis* na relaciji između divljih životinja i domaćih životinja i da bi se razjasnio potencijalni uticaj patogena na zdravstveni status i očuvanje divljih kanida.

Prisustvo *H. canis* u populacijama vuka i šakala u Srbiji ima važne zdravstvene aspekte ali i konzervacione konsekvence. *Hepatozoon canis* je protozojski parazit koji se prvenstveno prenosi krpeljima i može izazvati hepatozoonozu, bolest koja utiče na zdravlje domaćina, potencijalno smanjenje reproduktivnog uspeha, što može oslabiti populaciju predatora i uticati na njihovu stopu preživljavanja. Vuk i šakal kao predatori igraju ključnu ulogu pomažući u održavanju ravnoteže njihovih ekosistema. Potencijalni pad populacija ovih kanida uzrokovan patogenom *H. canis* može dovesti do povećanja vrsta plena, što može uzrokovati prekomernu ispašu i degradaciju staništa. Zato se može reći da je održavanje zdravih populacija predatora od velikog značaja za očuvanje biodiverziteta. Prisustvo *H. canis* moglo bi potencijalno da ugrozi genetički diverzitet i opšte zdravlje populacija vuka i šakala. Prevalencija *H. canis* može poslužiti kao indikator zdravlja životne sredine, ukazivajući na brojnost krpelja i drugih vektora. Visoke stope infekcije mogu takođe ukazivati i na promene u dinamici ekosistema, kao što je povećana brojnost krpelja usled klimatskih promena ili promena staništa. Mere kao što su kontrola brojnosti krpelja u prirodnim ekosistemima i zaštita staništa mogu biti ključne na smanjivanje prevalencije *H. canis* u prirodnim populacijama domaćina, a samim tim i njihovog zdravstvenog stanja. Kontinuirane studije, praćenje prevalencija *H. canis* u populacijama vuka, šakala i lisice mogu pružiti dragocene podatke za procenu rizika prenosa na domaće pse. Razumevanje dinamike prenosa, interakcija domaćin-parazit i potencijalnih uticaja na populacije domaćina je od suštinskog značaja za održanje njihovih zdravih populacija.

6. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije po prvi put u Srbiji je analizirana prevalencija *Hepatozoon canis* u populacijama vuka i šakala na širokom prostoru njihovog rasprostranjenja u Srbiji, kao i značaj ove dve vrste divljih kanida kao potencijalnih rezervoara ovog patogena koji se sa jednog na drugog domaćina dominantno prenosi krpeljima, najčešće smeđim psećim krpeljom *Rhipicephalus sanguineus*. Prema rezultatima koji su dobijeni u ovim istraživanjima mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Po prvi put u Srbiji utvrđena je visoka prevalencija 62/107 (57,94%) *H. canis* u analiziranom vuka u Srbiji.
2. Ovom studijom registrovana je i visoka prevalencija 90/114 (78,95%) *H. canis* kod šakala u Srbiji i time potvrđeni ranije publikovani rezultati.
3. Potvrđene visoke prevalencije kod vuka i šakala u Srbiji ukazuju na njihov značaj kao rezervoara u ciklusu kruženja patogena *H. canis* u prirodi.
4. Relativno visoka registrovana prevalenca kod juvenilnih šakala (40%) može ukazivati na transplacentalni vid prenošenja ovog patogena.
5. U geografskom pogledu, različiti obrasci prevalencija *H. canis* registrovani su na području Srbije. Kod vuka veća prevalencija je bila u istočnom regionu (72,7%) u odnosu na zapadni region (47,6%). Kod šakala najveća prevalencija zabeležena je u zapadnom regionu (95,6%), zatim u istočnom regionu (84,8%), potom severnom regionu (68,9%).
6. Pored visoke prevalencije *H. canis* kod vuka, uočena je i visoka genetička varijabilnost *H. canis*. Identifikovane sekvence su pokazale varijabilnost na pet pozicija gde je registrovano pet tipova sekvenci (S1-S5).
7. U geografskom pogledu svi tipovi sekvenci (S1-S5) su zastupljeni u zapadnom regionu, dok su četiri tipa (S1, S2, S4 i S5) zastupljena u istočnom regionu. S2 tip sekvence je dominantan u oba regiona, dok su sekvence S3 i S4 su zastupljenije u zapadnom regionu, a S1, S2 i S5 u istočnom regionu.
8. Filogenetske analize 18S rRNA sekvenci *H. canis* detektovanih kod šakala pokazale su prisustvo četiri različita tipa sekvence (S4-S7) u kombinaciji sa tri varijabilna mesta, što takođe ukazuje na visok genetički diverzitet *H. canis* kod šakala u Srbiji.
9. U geografskom pogledu najveći diverzitet je registrovan u severnom regionu, gde su se registrovana sva četiri tipa sekvenci (S4-S7), nešto manji diverzitet je detektovan u istočnom regionu (S4-S6), a najmanja raznovrsnost je uočena u zapadnom region (S4-S5).
10. Rezultati dobijeni u toku ove doktorske disertacije pokazali su veći genetički diverzitet u sekvencama 18S rRNA gena *H. canis* poreklom iz vuka u poređenju sa onima iz šakala. Ove razlike se mogu pripisati faktorima kao što su kao specifičnost i adaptacija domaćina, dinamika populacije domaćina, dinamika prenosa i geografske specifičnosti regiona.
11. S4 tip sekvence patogena *H. canis* detektovan u sklopu ove disertacije kod vuka i šakala u Srbiji je identičan sa nukleotidnim sekvencama *H. canis* koje su ranije otkrivene kod lisica iz Srbije. Ova činjenica ukazuje na mogući zajednički obrazac prenošenja patogena *H. canis* između tri autohtone kanide u Srbiji.

7. LITERATURA

- Abd Rani, P.A., Irwin, P.J., Coleman, G.T., Gatne, M., Traub, R.J. (2011). A survey of canine tick-borne diseases in India. *Parasit. Vector.* **4**, 141.
- Accorsi, A., Schiavetti, I., Listorti, V., Dellepiane, M., Masotti, C., Ercolini, C., Guardone, L., Razzuoli, E. (2022). Hard Ticks (Ixodidae) from Wildlife in Liguria, Northwest Italy: Tick Species Diversity and Tick-Host Associations. *Insects.* **13**, 199.
- Aguirre A.A. (2009). Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasit Vectors.* **2**, S7.
- Akyuz, M., Kirman, R., Guven, E. (2020). Morphological and molecular data of *Hepatozoon ursi* in two brown bears (*Ursus arctos*) in Turkey. *Folia Parasitol.* **67**, 032.
- Alanazi, A.D., Nguyen, V.L., Alyousif, M.S., Manoj, R.R.S., Alouffi, A.S., Donato, R., Sazmand, A., Mendoza-Roldan, A.J., Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2020). Ticks and associated pathogens in camels (*Camelus dromedarius*) from Riyadh Province, Saudi Arabia. *Parasit. Vectors.* **13**, 110.
- Alić, A., Šupić, J., Goletić, T., Rešidbegović, E., Lutvikadić, I., Hodžić, A. (2021). A unique case of fatal coinfection caused by *Leptospira* spp. and *Hepatozoon canis* in a Red Fox Cub (*Vulpes vulpes*). *Pathogens.* **11**, 11
- Allen, K.E., Johnson, E.M., Little, S.E. (2011). *Hepatozoon* spp. infections in the United States. *Vet Clin N Am Small Anim Pract.* **41**, 1221-38.
- Almberg, E.S., Cross, P.C., Dobson, A.P., Smith, D.W., Hudson, P.J. (2012). Parasite invasion following host reintroduction: a case study of Yellowstone's wolves. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* **367**, 2840-2851.
- Alsarraf, M., Dwuznik-Szarek, D., Hildebrand, J., Mierzejewska, E.J., Kloch, A., Kot, K., Kurek, K., Nowak, S., Mysłajek, R.W., Myśliwy, I., Popiołek, M., Rodo, A., Alsarraf, M., Tołkacz, K., Topolnytska, M., Wężyk, D., Bajer A. (2023). Occurrence of *Dirofilaria repens* in wild carnivores and their role as reservoirs for this zoonotic parasite in Poland. *Parasitol. Res.*, **122**, 1229-1237.
- Andersone, Ž. & Ozoliņš, J. (2004). Food habits of wolves *Canis lupus* in Latvia. *Acta Theriol.* **49**, 357-367.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Radbea, G., Rubel, F., Waldenström, J., Dobler, G., Chițimia-Dobler, L. (2017a). *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol. Res.* **116**, 2291-7.
- Andersson, M.O., Tolf, C., Tamba, P., Stefanache, M., Waldenström, J., Dobler, G., Chițimia-Dobler, L. (2017b). Canine tick-borne diseases in pet dogs from Romania. *Parasit Vectors.* **10**, 155.
- Ansorge, H., Kluth, G., Hahne, S. (2006). Feeding ecology of wolves *Canis lupus* returning to Germany. *Acta Theriol.* **51**, 99-106.
- Arnold, J., Humer, A., Heltai, M., Murariu, D., Spassov, N., Hackländer, K. (2012). Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mamm. Rev.* **42**, 1-11.
- Attipa, C., Maguire, D., Solano-Gallego, L., Szladovits, B., Barker, E.N, Farr, A., Baneth, G., Tasker, S. (2018). *Hepatozoon canis* in three imported dogs: a new tickborne disease reaching the United Kingdom. *Vet Rec.* **183**, 716.
- Bajer, A., Pawelczyk, A., Behnke, J.M., Gilbert, F.S., Sinski E. (2011). Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol.* **122**, 43-54.
- Bajer, A., Welc-Falęciak, R., Bednarska, M., Alsarraf, M., Behnke-Borowczyk, J., Siński, E., Behnke, M.J. (2014). Long-term spatiotemporal stability and dynamic changes in the haemoparasite community of bank voles (*Myodes glareolus*) in NE Poland. *Microb. Ecol.* **68**, 196-211.

- Baker, E., Jensen, A., Miller, D., Garrett, K. B., Cleveland, C. A., Brown, J., Why, V.K., Gerhold, R. (2023). *Hepatozoon* spp. infection in wild canids in the eastern United States. *Parasit Vectors*. **16**, 372.
- Baltrūnaitė, L., Kitrytė, N., Križanauskienė, A. (2020). Blood parasites (*Babesia*, *Hepatozoon* and *Trypanosoma*) of rodents, Lithuania: part I. Molecular and traditional microscopy approach. *Parasitol Res*. **119**, 687-94.
- Baneth, G., Shkap, V., Presentey B.Z., Pipano, E. (1996). *Hepatozoon canis*: the prevalence of antibodies and gametocytes in dogs in Israel. *Vet. Res. Com*. **20**, 41–46.
- Baneth, G. & Weigler, B. (1997). Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. *J. Vet. Intern. Med*. **11**, 365-370.
- Baneth, G., Aroch, I., Tal, N., Harrus, S. (1998). Hepatozoon species infection in domestic cats: a retrospective study. *Vet. Parasitol*. **79**, 123-33.
- Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., Shkap, V. (2001). Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Parasitol*. **87**, 606-611.
- Baneth, G., Mathew, J.S., Shkap, V., Macintire, D.K., Barta, J.R., Ewing, S.A. (2003). Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* species. *Trends Parasitol*. **19**, 27-31.
- Baneth, G., Samish, M., Shkap, V. (2007). Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Parasitol*. **93**, 283-99.
- Baneth, G. (2011). Perspectives on canine and feline hepatozoonosis. *Vet. Par*. **181**, 3-11.
- Banović, P., Díaz-Sánchez, A.A., Galon, C., Foucault-Simonin, A., Simin, V., Mijatović, D., Papić, L., Wu-Chuang, A., Obregón, D., Moutailler, S., Cabezas-Cruz, A. (2021). A One Health approach to study the circulation of tick-borne pathogens: A preliminary study. *One Health*, **13**, 100270.
- Barandika, J.F., Espí, A., Oporto, B., Del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., García-Pérez, L.A., Hurtado, A. (2016). Occurrence and genetic diversity of piroplasms and other apicomplexa in wild carnivores. *Parasitol Open*. **7**, 284-90.
- Battisti, E., Zanet, S., Khalili, S., Trisciuglio, A., Hertel, B., Ferroglio, E. (2020). Molecular survey on vector-borne pathogens in alpine wild carnivorans. *Front. Vet. Sci*. **7**, 1.
- Boitani, L., Kaczensky, F., Alvares, H., Andrén, V., Balys, J.C., Blanco, G., Chapron, S., Chiriac, D., Čirovic, N., Drouet-Houguet, C., Groff, D., Huber, Y., Iliopoulos, O., Ionescu, I., Kojola, M., Krofel, M., Kutal, J., Linnell, A., Majic, P., Mannil, F., Marucco, D., Melovski, D., Mengüllüoğlu, J., Mergeay, S., Nowak, J., Ozolins, A., Perovic, G., Rauer, I., Reinhardt, R., Rigg, V., Salvatori, B., Sanaja, L., Schley, M., Shkvyria, P., Sunde, K., Tirronen, A., Trbojevic T.I., Trouwborst, A., von Arx, M., Wolf, M., Zlatanova, D., Patkó, L. (2022). Assessment of the conservation status of the Wolf (*Canis lupus*) in Europe. Document for the standing committee of the convention on the conservation of European wildlife and natural habitats; *T-PVS/Inf*. 45.
- Boitani, L., Phillips, M., Jhala, Y. 2023. *Canis lupus* (amended version of 2018 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T3746A247624660.
- Borkowski, J., Zalewski, A., Manor, R. (2011). Diet composition of golden jackals in Israel. *Ann. Zool. Fenn*. **48**, 108-118.
- Bouchard, C., Dibernardo, A., Koffi, J., Wood, H., Leighton, P.A., Lindsay, L.R. (2019). Increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes. *Can. Commun. Dis. Rep*. **45**, 83-9.
- Bošković, I., Florijančić, T., Šperanda, M., Šprem, N., Ozimec, S., Degmečić, D. (2013). Sezonski aspekti hranidbe čaglja (*Canis aureus* L.) u istočnoj Hrvatskoj. XX međunarodno savjetovanje Krmiva 2013. Opatija, Hrvatska, 155-156.

- Byrne, M. E., Webster, S. C., Lance, S. L., Love, C. N., Hinton, T. G., Shamovich, D., Beasley, J. C. (2018). Evidence of long-distance dispersal of a gray wolf from the Chernobyl Exclusion Zone. *Eur. J. Wildl. Res.* **64**, 1-5.
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J.D.C., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., López-Bao, J.V., Adamec, A., Álvares, F., Anders, O., Balčiauskas, L., Balys, B., Bedó, P., Bego, B., Blanco, J.C., Breitenmoser, U., Brøseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., Ciucci, P., Dutsov, A., Engleder, T., Fuxjäger, C., Groff, C., Holmala, K., Hoxha, B., Iliopoulos, Y., Ionescu, O., Jeremić, J., Jerina, J., Kluth, G., Knauer, F., Kojola, I., Kos, I., Krofel, K., Kubala, J., Kunovac, S., Kusak, J., Kutal, M., Liberg, O., Majić, A., Männil, P., Manz, R., Marboutin, E., Marucco, F., Melovski, D., Mersini, K., Mertzanis, Y., Mysłajek, R.W., Nowak, S., Odden, J., Ozolins, J., Palomero, G., Paunović, M., Persson, J., Potočnik, H., Quenette, P., Rauer, G., Reinhardt, I., Rigg, R., Ryser, A., Salvatori, V., Skrbinšek, T., Stojanov, A., Swenson, J.E., Szemethy, L., Trajçe, A., Tsingarska-Sedefcheva, E., Vána, M., Veeroja, R., Wabakken, P., Wölfl, P., Wölfl, S., Zimmermann, F., Zlatanova, D., Boitani, B. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*. **348**, 1517-1519.
- Cardoso, L., Cortes, H.C., Eyal, O., Reis, A., Lopes, A.P., Vila-Viçosa, M.J., Rodrigues A.P., Baneth, G. (2014). Molecular and histopathological detection of *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Parasit. Vectors*. **7**, 113.
- Cardoso, W.A., Perles, L., Picelli, A.M., Correa, J.K.C., André, M.R., Viana, L.A. (2022). *Hepatozoon* parasites (Apicomplexa: Hepatozoidae) in fish *Hoplias aimara* (Characiformes, Erythrinidae) from the Eastern Amazon, Brazil. *Parasitol Res.* **121**, 1041-6.
- Castillo-Contreras, R., Magen, L., Birtles, R., Varela-Castro, L., Hall, J.L., Conejero, C., Aguilar, X.F., Colom-Cadena, A., Lavín, S., Mentaberre, G., López-Olvera, R.J. (2021). Ticks on wild boar in the metropolitan area of Barcelona (Spain) are infected with spotted fever group rickettsiae. *Transbound. Emerg. Dis.* **69**, 82-95.
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J.D., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., López-Bao, J.V., Adamec, M., Álvares, F., Anders, O., Balčiauskas, L., Balys, V., Bedó, P., Bego, F., Blanco, J.C., Breitenmoser, U., Broseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., Ciucci, P., Dutsov, A., Engleder, T., Fuxjäger, C., Groff, C., Holmala, K., Hoxha, B., Iliopoulos, Y., Ionescu, O., Jeremić, J., Jerina, K., Kluth, G., Knauer, F., Kojola, I., Kos, I., Krofel, M., Kubala, J., Kunovac, S., Kusak, J., Kutal, M., Liberg, O., Majić, A., Mannil, P., Manz, R., Marboutin, E., Marucco, F., Melovski, D., Mersini, K., Mertzanis, Y., Mysłajek, R.W., Nowak, S., Odden, J., Ozolins, J., Palomero, G., Paunović, M., Persson, J., Potočnik, H., Quenette, P.Y., Rauer, G., Reinhardt, I., Rigg, R., Ryser, A., Salvatori, V., Skrbinšek, T., Stojanov, A., Swenson, J.E., Szemethy, L., Trajçe, A., Tsingarska-Sedefcheva, E., Vana, M., Veeroja, R., Wabakken, P., Wolf, M., Wolf, S., Zimmermann, F., Zlatanova, D., Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*. **346**, 1517-1519.
- Chhabra, S., Uppal, S.K., Singla, L.D. (2013). Retrospective study of clinical and hematological aspects associated with dogs naturally infected by *Hepatozoon canis* in Ludhiana, Punjab, India. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**, 483-6.
- Ćirović, Ć. (2000). Morphological Variability and Biogeographical Status of the Red Fox (*Vulpes Vulpes*) in Vojvodina. M.Sc. Thesis. Faculty of Biology, University of Belgrade.
- Ćirović, D., Milenković, M., Paunović, M. (2006). Morphometry of the golden jackal *Canis aureus* from Serbia, in: 80 Jahrestagung. Kiel, Germany, 9.
- Ćirović, D., Penezić, A., Milenković, M., Paunović, M. (2008). Present distribution and factors of range spread of golden jackal (*Canis aureus* L. 1758) in Serbia. Proceedings of the International Conference on Large Carnivores. Žagubica, Serbia.

- Ćirović, D., Penezić, A., Milenković, M., Paunović, M. (2014a). Winter diet composition of the golden jackal (*Canis aureus* L., 1758) in Serbia. *Mammal Biol.* **79**, 132-137.
- Ćirović, D., Chochlakakis, D., Tomanović, S., Sukara, R., Penezić, A., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2014b). Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal *Canis aureus* in Serbia. *Biomed Res. Int.* **2014**, 728516.
- Ćirović, D., Teodorović, V., Vasilev, D., Marković, M., Ćosić, N., Dimitrijević, M., Klun, I., Djurković-Djaković, O. (2015a). A large-scale study of the *Trichinella* genus in the golden jackal (*Canis aureus*) population in Serbia. *Vet. Parasitol.* **212**, 253–256.
- Ćirović, D., Pavlović, I., Penezić, A. (2015b). Intestinal helminth parasites of the grey wolf (*Canis lupus* L.) in Serbia. *Acta Vet. Hung.* **63**, 189-198.
- Ćirović, D., Penezić, A., Krofel, M. (2016). Jackals as cleaners: Ecosystem services provided by a mesocarnivore in human-dominated landscapes. *Biol. Conserv.* **199**, 51-55.
- Ćirović, D., Penezić, A., Plećaš, M., 2018. Šakal (*Canis aureus*) u predelima sa dominantnim antropogenim uticajem, in: Pokorný, B., Kmetec, U. (Eds.), 10. Slovenski lovski dan, Šakal v Sloveniji in Na Balkanu: Stanje in Upravljaljski Izzivi. Lovska zveza Slovenije, Koper, 6. oktobar 2018, 13-14.
- Ćirović, D. & Penezić, A. (2019). Importance of slaughter in winter diet of wolves (*Canis lupus*) in Serbia. *North-West. J. Zool.* **15**, 175-178.
- Ciucu, L., Martinescu, G., Miron, L.D., Roman, C., Acatrinei, D., Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P. (2021). Occurrence of *Babesia* species and co-Infection with *Hepatozoon canis* in symptomatic dogs and in their ticks in eastern Romania. *Pathogens.* **10**, 1339.
- Colwell, D.D., Dantas-Torres, F., Otranto, D., (2011). Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol.* **182**, 14-21.
- Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C. (2003). Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* **114**, 173-194.
- Criado-Fornelio, A., Ruas, J.L., Casado, N., Farias, N.A., Soares, M.P., Müller, G., Brum, J.G.V., Berne, M.E.A., Buling-Saranã, A., Barba-Carretero J.C. (2006). New molecular data on mammalian *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) from Brazil and Spain. *J. Parasitol.* **92**, 93-4.
- Criado-Fornelio, A., Buling, A., Pingret, J.L., Etievant, M., Boucraut-Baralon, C., Alongi, A., Agnone, A., Torina, A. (2009). Hemoprotozoa of domestic animals in France: prevalence and molecular characterization. *Vet. Parasitol.* **159**, 73-6.
- Criado-Fornelio, A., Martín-Pérez, T., Verdú-Expósito, C., Reinoso-Ortiz, S.A., Pérez-Serrano, J. (2018). Molecular epidemiology of parasitic protozoa and *Ehrlichia canis* in wildlife in Madrid (central Spain). *Parasitol Res.* **117**, 2291-8.
- Cvetković, J., Teodorović, V., Marucci, G., Vasilev, D., Vasilev, S., Ćirović, D., Sofronić-Milosavljević, Lj. (2011). First report of *Trichinella britovi* in Serbia. *Acta Parasitol.* **56**, 232-235.
- D'Amico, G., Dumitrache, M.O., Matei, I.A., Ionică, A.M., Gherman, C.M., Sándor, A.D., Modrý, D., Mihalca, A.D. (2017). Ixodid ticks parasitizing wild carnivores in Romania. *Exp. Appl. Acarol.* **71**, 139-149.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* **152**, 173-185.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* **3**, 26.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A., Otranto, D. (2011). Seasonal variation in the effect of climate on the biology of *Rhipicephalus sanguineus* in southern Europe. *Parasitol.* **138**, 527-536.
- Dantas-Torres, F. & Otranto, D. (2015a). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet. Parasitol.* **208**, 9-13.

- Dantas-Torres, F. (2015b). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* **4**, 452-61.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D. (2017). Hepatozoonosis. In: Marcondes C.B., editor. Arthropod borne diseases. Cham: Springer International Publishing, 363-8.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, E.D., (2008). Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* **13**, 6938-6946.
- de Miranda, R.L., de Castro, J.R., Olegario, M.M., Beletti, M.E., Mundim, A.V., O'Dwyer, L.H., Eyal, O., Talmi-Frank, D., Cury, M.C., Baneth, G. (2011). Oocysts of *Hepatozoon canis* in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from a naturally infected dog. *Vet. Parasitol.* **177**, 392-396.
- de Souza, W.M., & Weaver, S.C. (2024). Effects of climate change and human activities on vector-borne diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 1-16.
- de Waal, T. (2012). Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Vet. Parasitol.* **189**, 65-74.
- Demeter, A. & Spassov, N. (1993). *Canis aureus* Linnaeus, 1758 – Schakal, Goldschakal. pp 107-138. In: Stubbe, M. & Krapp, F., editors. Handbuch der Säugetiere Europas. AULA Verlag, Wiesbaden.
- Deplazes, P., Hegglin, D., Gloor, S., Romig, T., (2004). Wilderness in the city: the urbanization of *Echinococcus multilocularis*. *Trends Parasitol.* **20**, 77-84.
- Dezdek, D., Vojta, L., Curković, S., Lipej, Z., Mihaljević, Z., Cvetnić, Z., Beck, R. (2010). Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Vet. Parasitol.* **172**, 333-336.
- Dordio, A.M., Beck, R., Nunes, T., Pereira da Fonseca, I., Gomes, J. (2021). Molecular survey of vector-borne diseases in two groups of domestic dogs from Lisbon, Portugal. *Parasit. Vectors.* **14**, 163.
- Duscher, G., Winkelmayr, R., Prosl, H., (2005). Schwarzwildverbreitung in Gebieten mit Trichinellen-funden bei Füchsen in Österreich. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* **92**, 315-321.
- Duscher, G., Pleydell, D., Prosl, H., Joachim, A., (2006). *Echinococcus multilocularis* in Austrian foxes from 1991 until 2004. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Series B.* **53**, 138-144.
- Duscher, G.G., Kübber-Heiss, A., Richter, B., Suchentrunk, F. (2013). A golden jackal (*Canis aureus*) from Austria bearing *Hepatozoon canis* - import due to immigration into a non-endemic area? *Ticks Tick Borne Dis.* **4**, 133-137.
- Duscher, G.G., Fuehrer, H.P., Kübber-Heiss, A. (2014a). Fox on the run-molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. *Parasit Vectors.* **7**, 521.
- Duscher, G., Čirović, D., Heltai, M., Szabo, L., Lanszki, J., Bošković, I., Florijančić, T., Knauer, F., Suchentrunk, F. (2014b). Hepatozoonosis in golden jackal (*Canis aureus*) from southeastern and central Europe: Prevalence data from a first molecular screening. First International Jackal Symposium; University of Belgrade: Veliko Gradiste, Serbia, 70-71.
- Duscher, G.G., Leschnik, M., Fuehrer, H.P., Joachim, A. (2015). Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *Int. J. Par. Parasites Wildl.* **4**, 88-96.
- Ebani, V.V., Rocchigiani, G., Nardoni, S., Bertelloni, F., Vasta, V., Papini, R.A., Verin, R., Poli, A., Mancianti, F. (2017). Molecular detection of tick-borne pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. *Acta Trop.* **172**, 197-200.
- Ebani, V.V., Trebino, C., Guardone, L., Bertelloni, F., Cagnoli, G., Nardoni, S., Sel, E., Wilde, E., Poli, A., Mancianti, F. (2022). Occurrence of Bacterial and Protozoan Pathogens in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. *Animals.* **12**, 2891.
- Ebani, V.V., Nardoni, S., Mancianti, F. (2023). Arthropod-borne pathogens in wild canids. *Vet. Sci.* **10**, 165.
- Erdélyi, K., Mezősi, L., Vladov, S., Földvári G. (2014). Fatal acute babesiosis in captive wolves (*Canis lupus*) due to *Babesia canis*. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**, 281-283.

- Ewing, S.A., Du Bois, J.G., Mathew, J.S., Panciera, R.J. (2002). Larval Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) (Acari: Ixodidae) as host for *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina). *Vet. Parasitol.* **103**, 43-51.
- Farkas, R., Solymosi, N., Takács, N., Hornyák, Á., Hornok, S., Nachum-Biala, Y., Baneth, G. (2014). First molecular evidence of *Hepatozoon canis* infection in red foxes and golden jackals from Hungary. *Parasit. Vectors.* **7**, 303.
- Ferrari, G., Girardi, M., Cagnacci, F., Devineau, O., Tagliapietra, V. (2022). First record of *Hepatozoon* spp. in alpine wild rodents: Implications and perspectives for transmission dynamics across the food web. *Microorganisms.* **10**, 712.
- Fico, R., Morosetti, G., Giovannini, A. (1993). The impact of predators on livestock in the Abruzzo region in Italy. *Rev Sci Tech.* **12**, 39-50.
- Forlano, M., Scofield, A., Elisei, C., Fernandes, K.R., Ewing, S.A., Massard, C.L. (2005). Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. *Vet. Parasitol.* **134**, 1-7.
- Gabrielli, S., Kumlien, S., Calderini, P., Brozzi, A., Iori, A., Cancrini, G. (2010). The first report of *Hepatozoon canis* identified in *Vulpes vulpes* and ticks from Italy. *Vector Borne Zoon Dis.* **10**, 855-9.
- Gajić, B., Bugarski-Stanojević, V., Penezić, A., Kuručki, M., Bogdanović, N., Ćirović, D. (2019). First report of eyeworm infection by *Thelazia callipaeda* in grey wolf (*Canis lupus*) from Serbia. *Parasitol. Res.*, **118**, 3549-3553.
- Galfsky, D., Król, N., Pfeffer, M., Obiegala, A. (2019). Long-term trends of tick-borne pathogens in regard to small mammal and tick populations from Saxony, Germany. *Parasit. Vectors.* **12**, 131.
- Galov, A., Fabbri, E., Caniglia, R., Arbanasić, H., Lapalombella, S., Florijančić, T., Bošković, I., Galaverni, M., Randi, E. (2015). First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *R. Soc. Open Sci.* **2**, 150450.
- Geptner, V. G. & Naumov, N. P. (1967). Млекопитающие Советского Союза. Часть 2, Сирениая и Карнивога (морские коровы, волки и медведи). Наука, Москва.
- Geurden, T., Becskei, C., Six, R.H., Maeder, S., Latrofa, M.S., Otranto, D., Farkas, R. (2018). Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries. *Ticks Tick Borne Dis.* **9**, 1431-6.
- Ghafar, A., Cabezas-Cruz, A., Galon, C., Obregon, D., Gasser, R.B., Moutailler, S., Moutailler, S., Jabbar, A. (2020). Bovine ticks harbour a diverse array of microorganisms in Pakistan. *Parasit. Vectors.* **13**, 1.
- Gherman C.M., Mihalca A.D. (2017). A synoptic overview of golden jackal parasites reveals high diversity of species. *Parasit Vectors.* **10**, 1-40.
- Giannatos, G. (2004). Population status and conservation action plan for the golden jackal (*Canis aureus*) in Greece. WWF Greece, Athens.
- Giannatos, G., Karypidou, A., Legakis, A., Polymeni, R. (2010). Golden jackal (*Canis aureus* L.) diet in Southern Greece. *Mammal. Biol.* **75**, 227-232.
- Giannelli, A., Ramos, R. A. N., Di Paola, G., Mencke, N., Dantas-Torres, F., Baneth, G., Otranto, D. (2013). Transstadial transmission of *Hepatozoon canis* from larvae to nymphs of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* **196**, 1-5.
- Giannelli, A., Latrofa, M.S., Nachum-Biala, Y., Hodžić, A., Greco, G., Attanasi, A., Annoscia, G., Otranto, D., Baneth, G. (2017). Three different *Hepatozoon* species in domestic cats from southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* **8**, 721-4.
- Gimenez, C., Casado, N., Criado-Fornelio, A., de Miguel, F.A., Dominguez-Peñañiel, G. (2009). A molecular survey of Piroplasmida and Hepatozoon isolated from domestic and wild animals in Burgos (northern Spain). *Vet. Parasitol.* **162**, 147-50.

- Götsch, S., Leschnik, M., Duscher, G., Burgstaller, J.P., Wille-Piazzai, W., Joachim, A., (2009). Ticks and haemoparasites of dogs from Praia, Cape Verde. *Vet. Parasitol.* **166**, 171-174.
- Grillini, M., Simonato, G., Tessarin, C., Dotto, G., Traversa, D., Cassini, R., Marchiori, E., Frangipane di Regalbano, A. (2021). *Cytauxzoon* sp. and *Hepatozoon* spp. in domestic cats: a preliminary study in North-Eastern Italy. *Pathogens.* **10**, 1214.
- Guimarães, N., Bučko, J., Urban, P. (2019). The rise of a carnivore, the evolution of the presence of the golden jackal in Slovakia. *Folia Zool.* **68**, 66-71.
- Haji, I., Simuunza, M., Jiang, N., Chen, O. (2023). Tick populations and molecular detection of selected tick-borne pathogens in questing ticks from northern and central Tanzania. *Exp. Appl. Acarol.* **90**, 389-407.
- Hamel, D., Silaghi, C., Zapadynska, S., Kudrin, A., Pfster, K. (2013). Vector-borne pathogens in ticks and EDTA-blood samples collected from client-owned dogs, Kiev, Ukraine. *Ticks Tick Borne Dis.* **4**, 152-5.
- Hamšíková, Z., Silaghi, C., Rudolf, I., Venclíková, K., Mahříková, L., Slovák, M., Mendel, J., Blažejová, H., Berthová, L., Kocianová, E., Hubálek, Z., Schnittger, L., Kazimírová, M. (2016). Molecular detection and phylogenetic analysis of *Hepatozoon* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia and Czech Republic. *Parasitol Res.* **115**, 3897-904.
- Hansford, K.M., Pietzsch, M.E., Cull, B., Gillingham, E.L., Medlock, J.M. (2018). Potential risk posed by the importation of ticks into the UK on animals: records from the tick surveillance scheme. *Vet Rec.* **182**, 107-107.
- Harrington, F. H. (1981). Urine-Marking and Caching Behavior in the Wolf. *Behaviour.* **76**, 280-288.
- Hasani, S. J., Rakhshanpour, A., Enferadi, A., Sarani, S., Samiei, A., Esmailnejad, B. (2024). A review of Hepatozoonosis caused by *Hepatozoon canis* in dogs. *J. Parasit. Dis.* 1-15.
- Hatlauf, J., Bayer, K., Trouwborst, A., and Hackländer, K. (2021). New rules or old concepts? The golden jackal (*Canis aureus*) and its legal status in Central Europe. *Eur. J. Wildl. Res.* **67**, 25.
- Healing, T.D. (1981). Infections with blood parasites in the small British rodents *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* and *Microtus agrestis*. *Parasitol.* **83**, 179-89.
- Helm, C.S., Samson-Himmelstjerna, G.V., Liesner, J.M., Kohn, B., Müller, E., Schaper, R., Pachnicke, S., Schulze, C., Krücken, J. (2020). Identical 18S rRNA haplotypes of *Hepatozoon canis* in dogs and foxes in Brandenburg, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **11**, 101520.
- Heltai, M., Ćirović, D., Szabó, L., Penezić, A., Nagyapáti, N., Kurys, A., Lanszki, J. (2013, June). Golden jackal: opinions versus facts-experiences from Serbia and Hungary. 2nd International Symposium on Hunting: Modern Aspects of Sustainable Management of Game Populations.
- Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J.C. (1996). Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet. Rec.* **139**, 293-5.
- Hodžić, A., Alić, A., Fuehrer, H.P., Harl, J., Wille-Piazzai, W., Duscher, G.G. (2015). A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Parasit. Vectors.* **8**, 1-7.
- Hodžić, A., Alić, A., Prašović, S., Otranto, D., Baneth, G., Duscher, G.G. (2017). *Hepatozoon silvestris* sp. nov.: morphological and molecular characterization of a new species of Hepatozoon (Adeleorina: Hepatozoidae) from the European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). *Parasitol.* **144**, 650-61.
- Hodžić, A., Mrowietz, N., Cézanne, R., Bruckschwaiger, P., Punz, S., Habler, V.E., Tomsik, V., Lazar, J., Duscher, G.G., Glawischnig, W., Fuehrer, H.P. (2018a). Occurrence and diversity of arthropod-transmitted pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) in western Austria, and possible vertical (transplacental) transmission of *Hepatozoon canis*. *Parasitol.* **145**, 335-44.

- Hodžić, A., Alić, A., Duscher, G.G. (2018b). High diversity of blood-associated parasites and bacteria in European wild cats in Bosnia and Herzegovina: a molecular study. *Ticks Tick Borne Dis.* **9**, 589-93.
- Hodžić, A., Alić, A., Beck, R., Beck, A., Huber, D., Otranto, D., Baneth, G., Duscher, G.G. (2018c). *Hepatozoon martis* n. sp. (Adeleorina: Hepatozoidae): morphological and pathological features of a *Hepatozoon* species infecting martens (family Mustelidae). *Ticks Tick Borne Dis.* **9**, 912-20.
- Hodžić, A., Georges, I., Postl, M., Duscher, G.G., Jeschke, D., Szentiks, C.A., Ansorge, H., Heddergott, M. (2020). Molecular survey of tick-borne pathogens reveals a high prevalence and low genetic variability of *Hepatozoon canis* in free-ranging grey wolves (*Canis lupus*) in Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* **11**, 101389.
- Hoffmann, M., Arnold, J., Duckworth, J.W., Jhala, Y.W., Kamler, J.F., Krofel, M. (2018). *Canis aureus*. The IUCN Red List of Threatened Species. 2018: e. T118264161A146194820.
- Hornok, S., Tánzos, B., Fernández de Mera, I.G., 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*. *Vet Parasitol.* **196**, 189-93.
- Hornok, S., Boldogh, S.A., Takács, N., Kontschán, J., Szekeres, S., Sós, E., Sándor, D.A., Wang, Y., Tuska-Szalay, B. (2022). Molecular epidemiological study on ticks and tick-borne protozoan parasites (Apicomplexa: *Cytauxzoon* and *Hepatozoon* spp.) from wild cats (*Felis silvestris*), Mustelidae and red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in central Europe, Hungary. *Parasit. Vectors.* **15**, 174.
- Iliopoulos, Y., Sgardelis, S., Koutis, V., Savaris, D. (2009). Wolf depredation on livestock in Central Greece. *Acta Theriol.* **54**, 11-22.
- Inokuma, H., Okuda, M., Ohno, K., Shimoda, K., Onishi, T. (2002). Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Vet. Parasitol.* **106**, 265-271.
- Ionică A.M., Matei I.A., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Juránková, J., Ionescu, D.T., Mihalca, A.D., Modry, D., Gherman C.M. (2016). Role of golden jackals (*Canis aureus*) as natural reservoirs of *Dirofilaria* spp. in Romania. *Parasit. Vectors.* **9**, 240.
- James, S.P. (1905). On a parasite found in the white corpuscles of the blood of dogs. Office of the superintendent of government printing, India.
- Jara, R.F., Wydeven, A.P., Samue M.D.I. (2016). Gray wolf exposure to emerging vector-borne diseases in Wisconsin with comparison to domestic dogs and humans. *PLoS One*, **11**.
- Jędrzejewski, W.O., Schmidt, K., Theuerkauf, J.R., Jędrzejewska, B.A., Kowalczyk, R. (2007). Territory size of wolves *Canis lupus*: Linking local (Białowieża Primeval Forest, Poland) and Holarctic-scale patterns. *Ecography.* **30**, 66-76.
- Jędrzejewski, W., Niedziałkowska, M., Hayward, M. W., Goszczyński, J., Jędrzejewska, B., Borowik, T., Bartoń, K. A., Nowak, S., Harmuszkiewicz, J., Juszczak, A., Kałamarz, T., Kloch, A., Koniuch, J., Kotiuk, K., Mysłalek, R. W., Nedzyńska, M., Olczyk, A., Teleon, M., Wojtulewicz, M. (2012): Prey choice and diet of wolves related to ungulate communities and wolf subpopulations in Poland. *J. Mamm.* **93**, 1480-1492.
- Jhala, Y.V. & Moehlan, P.D. (2004). Golden Jackal *Canis aureus* Linnaeus, 1758. pp 156-161. In: Sillero-Zubiri, C., Hoffman, M., Macdonald, D.W., editors. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Jirku, M., Dostál, D., Robovský, J., Šálek, M. (2018). Reproduction of the golden jackal (*Canis aureus*) outside current resident breeding populations in Europe: Evidence from the Czech Republic. *Mammalia.* **82**, 592-595.

- Johnson, E.M., Allen, K.E., Panciera, R.J., Ewing, S.A., Little, S.E., Reichard, M.V. (2007). Field survey of rodents for Hepatozoon infections in an endemic focus of American canine hepatozoonosis. *Vet. Parasitol.* **150**, 27-32.
- Johnson, E.M., Allen, K.E., Panciera, R.J., Ewing, S.A. (2009a). Little SE. Experimental transmission of *Hepatozoon americanum* to New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and infectivity of cystozoites for a dog. *Vet. Par.* **164**, 162-6.
- Johnson, E.M., Panciera, R.J., Allen, K.E., Sheets, M.E., Beal, J.D., Ewing, S.A., Little, S.E. (2009b). Alternate pathway of infection with *Hepatozoon americanum* and the epidemiologic importance of predation. *J. Vet. Int. M.* **23**, 1315-8.
- Joly, K., Gurarie, E., Sorum, M.S., Kaczensky, P., Cameron, M.D., Jakes, A.F., Borg, L.B., Nandintsetseg, D., Hopcraft, C.G.J., Buuveibaatar, B., Jones, F.P., Mueller, T., Walzer, C., Olson, A.K., Payne, C.J., Yadamsuren, A., Hebblewhite, M. (2019). Longest terrestrial migrations and movements around the world. *Sci. Rep.* **9**, 15333.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., (2004). The global importance of ticks. *Parasitol.* **129**, S3-S14.
- Juwaid, S., Sukara, R., Penezić, A., Mihaljica, D., Veinović, G., Kavallieratos, N. G., Ćirović, D., Tomanović, S. (2019). First evidence of tick-borne protozoan pathogens, *Babesia* sp. and *Hepatozoon canis*, in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Serbia. *Acta Vet. Hung.* **67**, 70-80.
- Kaczensky, P., Chapron, G., von Arx, M., Huber, Dj. Andrén, H., Linnell, J. (2012). Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf and wolverine in Europe. *European Commission.* 1-72.
- Karbowiak G., Hapunik, J., Miniuk, M. (2008). The case of babesiosis in farmed wolf (*Canis lupus L*). *Wiad. Parazytol.* **54**, 243.
- Karbowiak, G., Majláthová, V., Hapunik, J., Petko, B., Wita, I. (2010). Apicomplexan parasites of red foxes (*Vulpes vulpes*) in northeastern Poland. *Acta Parasitol.* **55**, 210-4.
- Kauffman, K.L., Sparkman, A., Bronikowski, A.M., Palacios, M.G. (2017). Vertical transmission of *Hepatozoon* in the Garter Snake *Thamnophis elegans*. *J. Wildl. Dis.* **53**, 121-5.
- Kaya, F., & Baydar, E. (2024). Case Report of a Dog Heavily Infected With Hepatozoonosis. *MAKU J. Health Sci. Inst.* **12**, 63-68.
- Kegler, K., Nufer, U., Alic, A., Posthaus, H., Olias, P., Basso, W. (2018). Fatal infection with emerging apicomplexan parasite *Hepatozoon silvestris* in a domestic cat. *Parasit. Vectors.* **11**, 428.
- Khalifa, M.M. & Attia, M.M. (2024). Pathogenic effects of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) on pet dogs (*Canis familiaris*) with amplification of immunogenetic biomarkers. *Comp. Clin. Pat.* **33**, 223-230.
- Kloch, A., Bednarska, M., Bajer A. (2005). Intestinal macro- and microparasites of wolves (*Canis lupus L*) from north-eastern Poland recovered by coprological study. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**, 237-245.
- Kobryn, H.T., Swinhoe, E.J., Bateman, P.W., Adams, P.J., Shephard, J.M., Fleming, P.A. (2023). Foxes at your front door? Habitat selection and home range estimation of suburban red foxes (*Vulpes vulpes*). *Urban Ecosyst.* **26**, 1-17.
- Kowalczyk, R., Wudarczyk, M., Wójcik, J.M., Okarma, H. (2020). Northernmost record of reproduction of the expanding golden jackal population. *Mamm. Biol.* **100**, 107-111.
- Krofel, M., Giannatos, G., Ćirović, D., Stoyanov, S., Newsome, T. (2017) Golden jackal expansion in Europe: a case of mesopredator release triggered by continent-wide wolf persecution? *Hystrix.* **31**, 26-34.
- Kruzeniski, S.J., Tam, F.M., Burgess, H.J. (2013). Pathology in practice. Ehrlichia-Hepatozoon coinfection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **243**, 1705-7.

- Kryštufek, B., Murariu, D., Kurtonour, C. (1997). Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in Balkans and adjacent regions. *Mamm. Rev.* **27**, 109-114.
- Kumar, S. Stecher, G. Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., Mega, X. (2018). Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547-1549.
- Laakkonen, J., Sukura, A., Oksanen, A., Henttonen, H., Soveri, T. (2001). Haemogregarines of the genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina) in rodents from northern Europe. *Folia Parasitol.* **48**, 263-7.
- Lainson, R., Paperna, I., Naiff, R.D. (2003). Development of *Hepatozoon caimani* (Carini, 1909) Pless a, De Biasi, De Souza, 1972 in the *Caiman Caiman c. crocodilus*, the frog *Rana catesbeiana* and the mosquito *Culex fatigans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**, 103-13.
- Lalošević, D., Lalošević, V., Simin, V., Miljević, M., Čabrilo, B., Čabrilo, O.B. (2016). Spreading of multilocular echinococcosis in southern Europe: the first record in foxes and jackals in Serbia, Vojvodina Province. *Eur. J. Wildl. Res.* **62**, 793-796.
- Lanszki, J. & Heltai, M. (2002). Feeding habits of golden jackal and red fox in south western Hungary during winter and spring. *Mammal. Biol.* **67**, 129-136.
- Lanszki, J., Heltai, M., Szabo, L. (2006). Feeding habits and trophic niche overlap betw sympatric golden jackal (*Canis aureus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian ecoregion (Hungary). *Can. J. Zool.* **84**, 1647-1656.
- Lanszki, J. & Heltai, M. (2010). Food preferences of golden jackals and sympatric red foxes in European temperate climate agricultural area (Hungary). *Mammalia.* **74**, 267-273.
- Lanszki, J., Márkus, M., Újváry, D., Szabo, Á., Szemethy, L. (2012). Diet of wolves *Canis lupus* returning to Hungary. *Acta Theriol.* **57**, 189-193.
- Lanszki, J., Kurys, A., Helatai, M., Csanyi, S., Ács, K. (2015). Diet composition of the golden jackal in an area of intensive big game management. *Ann. Zool. Fenn.* **52**, 243-255.
- Lanszki, J., Schally, G., Heltai, M. and Ranc, N. (2018). Golden jackal expansion in Europe: First telemetry evidence of a natal dispersal. *Mamm. Biol.* **88**, 81-84.
- Lesiczka, P.M., Rudenko, N., Golovchenko, M., Juránková, J., Daněk, O., Modrý, D., Hrazdilová, K. (2023). Red fox (*Vulpes vulpes*) play an important role in the propagation of tick-borne pathogens. *Ticks Tick Borne Dis.* **14**, 102076.
- Li, J., Kelly, P., Guo, W., Zhang, J., Yang, Y., Liu, W., Wang, C. (2020). Molecular detection of Rickettsia, Hepatozoon, Ehrlichia and SFTSV in goat ticks. *Vet Par.* **20**, 100407.
- Lilliehöök, I., Tvedten, H.W., Pettersson, H.K., Baneth, G. (2019). *Hepatozoon canis* infection causing a strong monocytosis with intra-monocytic gamonts and leading to erroneous leukocyte determinations. *Vet. Clin. Pathol.* **48**, 435-40.
- Lloret, A., Addie, D.D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K. (2015). Hepatozoonosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Fel Med Surg.* **17**, 642-4.
- Macdonald, D.W. (1979). The flexible social system of the golden jackal, *Canis aureus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **5**, 17-38.
- Macdonald, D.W., Boitani, L., Barrasso, P. (1980). Foxes, wolves and conservation in the Abruzzo mountains. In *The Red Fox: Symposium on Behaviour and Ecology*, 223-235. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Macdonald, D. W. (2001). *The encyclopedia of mammals. Facts on file.* New York.
- Majláthová, V., Hurníková, Z., Majláth, I., Peťko, B. (2007). *Hepatozoon canis* infection in Slovakia: imported or autochthonous? *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 199-202.
- Markov, G. & Lanszki, J. (2012). Diet composition of the golden jackal in an agricultural environment. *Folia Zool.* **61**, 44-48.
- Mech, L. D. (2001). Managing Minnesota's recovered wolves. *Wildl. Soc. Bull.* **29**, 70-77.

- Mech, L.D. & Boitani, L. (2003). *Wolves. Behavior, ecology and conservation*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Mech, L. D. & Boitani, L. (2010). *Canis lupus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010.
- Medkour, H., Laidoudi, Y., Marié, J.L., Fenollar, F., Davoust, B., Mediannikov, O. (2020). Molecular investigation of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Southern France. *J. Wildl. Dis.* **56**, 837-850.
- Medlock, J.M., Leach, S.A. (2015). Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *Lancet Infect Dis.* **15**, 721-30.
- Meriggi, A., Brangi, A., Schenone, L., Signorelli, D., Milanese, P. (2011). Changes of wolf (*Canis lupus*) diet in Italy in relation to the increase of wild ungulate abundance. *Ethol. Ecol. Evol.* **23**, 195-210.
- Merino, S., Martínez, J., Masello, J.F., Bedolla, Y., Quillfeldt, P. (2014). First molecular characterization of a Hepatozoon species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting birds and description of a new species infecting storm petrels (Aves: Hydrobatidae). *J. Parasitol.* **100**, 338-43.
- Mierzejewska, E.J., Dwużnik, D., Koczwarska, J., Stańczak, Ł., Opalińska, P., Krokowska-Paluszak, M., Wierzbicka, A., Górecki, G., Bajer, A. (2021). The red fox (*Vulpes vulpes*), a possible reservoir of *Babesia vulpes*, *B. canis* and *Hepatozoon canis* and its association with the tick *Dermacentor reticulatus* occurrence. *Ticks Tick Borne Dis.* **12**, 101551.
- Mihalca A.D., Ionică, A.M., D'Amico, G., Daskalaki, A.A., Deak, G., Matei I.A., Simonca V., Iordache, D., Modry, D., Gherman, C.M. (2016). *Thelazia callipaeda* in wild carnivores from Romania: new host and geographical records. *Parasit. Vectors.* **9**, 350.
- Milenković, M. (1983). Jackal *Canis aureus* Linnaeus, 1758 (Mammalia, Canidae) in Eastern Serbia. Proceedings on the Fauna of SR Serbia, Serbian Academy of Sciences and Arts 2, Belgrade, 257-262.
- Milenković, M. (1987). The distribution of the jackal *Canis aureus* Linnaeus 1758 (Mammalia, Canidae) in Yugoslavia. Proceedings on the fauna of SR Serbia. **4**, 233-248.
- Milenković, M., Paunović, M., Čirović, D. (2007). Akcioni plan za očuvanje vuka *Canis lupus* L. 1758 u Srbiji. Faza I-Strateški plan. Institut za Biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd.
- Milutinović, M., Petrović, Z., Bobić, B., Pavlović, I. (1996). Ecological notes on ticks (Acari: ixodidae) collected in west Serbia, Yugoslavia. *Parasitol. Hungarica.* 67-74.
- Milutinović, M., Masuzawa, T., Tomanović, S., Radulović, Ž., Fukui, T., Okamoto, Y. (2008). *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* **45**, 171-183.
- Mitková, B., Hrazdilová, K., Steinbauer, V., D'Amico, G., Mihalca, A.D., Modrý, D. (2016). Autochthonous *Hepatozoon* infection in hunting dogs and foxes from the Czech Republic. *Parasitol Res.* **115**, 4167-71.
- Mitková, B., Hrazdilová, K., D'Amico, G., Duscher, G.G., Suchentrunk, F., Forejtek, P., Gherman, C.M., Matei, I.A., Ionică, A.M., Daskalaki, A.A., Mihalca, A.D., Votýpka, J., Hulva, P., Modrý, D. (2017). Eurasian golden jackal as host of canine vector-borne protists. *Parasit. Vectors.* **10**, 183.
- Modrý, D., Hofmannová, L., Papežík, P., Majerová, K., Votýpka, J., Hönič, V., Růžek, D., Hrazdilová, K. (2021). *Hepatozoon* in Eurasian red squirrels *Sciurus vulgaris*, its taxonomic identity, and phylogenetic placement. *Parasitol Res.* **120**, 2989-93.
- Moehlman, P.D. & Hofer, H. (1997). Cooperative breeding, reproductive suppression, and body mass in canid. pp 76-128. In: Solomon, N.G. & French, J.A., editors. Cooperative breeding in mammals. Cambridge University Press, Cambridge.

- Mukherjee, S., Goyal, S.P., Johnsingh, A.J.T., Leite Pitmen, M.R.P. (2004). The importance of rodents in the diet of jungle cat (*Felis chaus*), caracal (*Caracal caracal*) and golden jackal (*Canis aureus*) in Sariska Tiger reserve, Rajasthan, India. *J. Zool.* **262**, 405-411.
- Murata, T., Inoue, M., Tateyama, S., Taura, Y., Nakama, S. (1993). Vertical transmission of *Hepatozoon canis* in dogs. *J. Vet Med. Sci.* **55**, 867-8.
- Murata, T., Inoue, M., Taura, Y., Nakama, S., Abe, H., Fujisaki, K. (1995). Detection of *Hepatozoon canis* oocyst from ticks collected from the infected dogs. *J Vet Med Sci/Jpn Soc Vet Sci.* **57**, 111-112.
- Najm, N.A., Meyer-Kayser, E., Hoffmann, L., Pfister, K., Silaghi, C. (2014). *Hepatozoon canis* in German red foxes (*Vulpes vulpes*) and their ticks: molecular characterization and the phylogenetic relationship to other *Hepatozoon* spp. *Parasitol Res.* **113**, 2679-85.
- Newsome, T. M., Boitani, L., Chapron, G., Ciucci, P., Dickman, C. R., Dellinger, J. A., Lopez-Bao, J. V., Oeterson, R. O., Shores, C. R., Wirsing, A. J., Ropple, W. J. (2014). Food habits of the world's gray wolves. *Mamm. Rev.* **46**, 1-15.
- Ninausz, N., Fehér, P., Csányi, E., Heltai, M., Szabó, L., Barta, E., Kemenszky, P., Sándor, G., Jánoska, F., Horváth, M., Kusza, S., Frank, K., Varga, L., Stéger, V. (2023). White and other fur colourations and hybridization in golden jackals (*Canis aureus*) in the Carpathian basin. *Sci. Rep.* **13**, 21969.
- Ogden, N.H., Lindsay, L.R. (2016). Effects of climate and climate change on vectors and vector-borne diseases: ticks are different. *Trends Parasitol.* **32**, 646-56.
- Ortuño, M., Nachum-Biala, Y., García-Bocanegra, I., Resa, M., Berriatua, E., Baneth, G. (2022). An epidemiological study in wild carnivores from Spanish Mediterranean ecosystems reveals association between *Leishmania infantum*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. infection and new hosts for *Hepatozoon martis*, *Hepatozoon canis* and *Sarcocystis* spp. *Transbound. Emerg. Dis.* **69**, 2110-25.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Weigl, S., Latrofa, M.S., Stanneck, D., Decaprarriis, D., Capelli, G., Baneth, G. (2011). Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology and PCR. *Parasit. Vectors.* **4**, 55.
- Pacifico, L., Braf, J., Buono, F., Beall, M., Neola, B., Buch, J., Sgroi, G., Piantedosi, D., Santoro, M., Tyrrell, P. (2020). *Hepatozoon canis* in hunting dogs from Southern Italy: distribution and risk factors. *Parasitol Res.* **119**, 3023-3031
- Pavlović, I., Penezić, A., Ćosić, N., Burazerović, J., Maletić, V., Ćirović, D. (2017). The first report of *Linguatula serrata* in grey wolf (*Canis lupus*) from Central Balkans. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* **68**, 687-690.
- Pawelczyk, A., Bajer, A., Behnke, J.M., Gilbert, F.S., Sinski, E. (2004). Factors affecting the component community structure of haemoparasites in common voles (*Microtus arvalis*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitol Res.* **92**, 270-84.
- Penezić, A. & Ćirović, D. (2014). Seasonal variation of the golden jackals feeding habits in Serbia. First International Jackal Symposium, Veliko Gradište, Serbia, 34.
- Penezić, A., Pavlović, I., Selaković, S., Ćirović, D. (2014). First findings and prevalence of adult heartworms (*Dirofilaria immitis*) in wild carnivores from Serbia. *Parasitol. Res.* **113**, 3281-3285.
- Penezić, A. & Ćirović, D. (2015). Seasonal variation in diet of the golden jackal (*Canis aureus*) in Serbia. *Mammal. Res.* **60**, 309-317.
- Penezić, A. (2016). Ishrana šakala (*Canis aureus* L. 1758) na teritoriji Srbije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Popiołek, M., Szczęsna, J., Nowak, S., Mysłajek, R.W. (2007). Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus* L. from the western Beskidy Mountains in southern Poland *J. Helminthol.*, **81**, 339-344.
- Posada, D. J. (2008) Model Test: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1253-1256.

- Potkonjak, A., Gutiérrez, R., Savić, S., Vračar, V., Nachum-Biala, Y., Jurišić, A., Kleinerman, G., Rojas, A., Petrović, A., Baneth, G., Harrus, S. (2016). Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick Borne Dis.* **7**, 199-203.
- Raichev, E.G., Tsunoda, H., Newman, C., Masuda, R., Georgiev, D.M., Kaneko, Y. (2013). The reliance of the golden jackal (*Canis aureus*) on anthropogenic foods in winter in Central Bulgaria. *Mammal. Study.* **38**, 19-27.
- Ranc, N., Krofel, M., Čirović, D. (2018). *Canis aureus* - European regional assessment. The IUCN Red List of Threatened Species 2018.
- Ražen, N., Brugnoli, A., Castagna, C., Groff, C., Kaczensky, P., Kljun, F., Knauer, F., Kos, I., Krofel, M., Luštrik, R., Majić, A., Rauer, G., Righetti, D., Potočnik, H. (2016). Longdistance dispersal connects Dinaric-Balkan and Alpine grey wolf (*Canis lupus*) populations. *Eur. J. Wildl. Res.* **62**, 137-142.
- Reye, A.L., Hubschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P. (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 2923-2931.
- Rigó, K., Majoros, G., Szekeres, S., Molnár, I., Jablonszky, M., Majláthová, V., Majláth, I., Földvári, G. (2016). Identification of *Hepatozoon erhardovae* Krampitz, 1964 from bank voles (*Myodes glareolus*) and fleas in Southern Hungary. *Parasitol Res.* **115**, 2409-13.
- Romig, T., Bilger, B., Dinkel, A., Merli, M., Mackenstedt, U., (1999). *Echinococcus multilocularis* in animal hosts: new data from western Europe. *Helminthologia.* **36**, 185-191.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. (2012) 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* **61**, 539-542.
- Rotem, G., Berger, H., King, R., Saltz, D. (2011). The effect of anthropogenic resources on the space use patterns of golden jackals. *J. Wildl. Manag.* **75**, 132-136.
- Rubini, A.S., Paduan, K.S., Martins, T.F., Labruna, M.B., O'Dwyer, L.H. (2009). Acquisition and transmission of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Hepatozoidae) by the tick *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* **164**, 324-327.
- Rund, D., Neves, V., Quillfeldt, P. (2019). Molecular survey of *Hepatozoon* infection of *Teira dugesii* in the Azores. *Anim. Biodivers. Conserv.* **42**, 19-29.
- Saari, S., Näreaho, A., Nikander, S. (2018). Canine parasites and parasitic diseases. Academic press.
- Šálek, M., Červinka, J., Banea, O.C., Krofel, M., Čirović, D., Selanec, I., Penezić, A., Grill, S., Riegert, J. (2014). Population densities and habitat use of the golden jackal (*Canis aureus*) in farmlands across the Balkan Peninsula. *Eur. J. Wildl. Res.* **60**, 193-200.
- Savić, I.R., Paunović, M., Milenković, M., Stamenković, S. (1995). Diverzitet faune sisara (Mammalia) Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja, in: Stevanović, V., Vasić, V. (Eds.), Biodiverzitet Jugoslavije sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. Biološki fakultet i Ekolobri, Beograd, 517-554.
- Schäfer, I., Müller, E., Nijhof, A.M., Aupperle-Lellbach, H., Loesenbeck, G., Cramer, S., Naucke, T.J. (2022a). First evidence of vertical *Hepatozoon canis* transmission in dogs in Europe. *Parasites Vectors.* **15**, 296.
- Schäfer, I., Kohn, B., Nijhof, A.M., Müller, E. (2022b). Molecular detection of *Hepatozoon* species infections in domestic cats living in Germany. *J Fel Med Surgery.* **24**, 994-1000.
- Sebek, Z., Sixl, W., Stünzner, D., Valová, M., Hubálek, Z., Troger, H. (1980). Blood parasites of small wild mammals in Steiermark and Burgenland. *Folia Parasitol.* **27**, 295-301.
- Semenza, J.C. & Suk, J.E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbial. Lett.* **36**, fnx244.

- Sgroi, G., Iatta, R., Veneziano, V., Bezerra-Santos, M.A., Lesiczka, P., Hrazdilová, K., Annoscia, G., D'Alessio, N., Golovchenko, M., Rudenko, N., Modrý, D., Otranto, D. (2021). Molecular survey on tick-borne pathogens and *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from southern Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* **12**, 101669.
- Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., Macdonald, D.W. (2004). Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status survey and Conservation Action Plan, second edition. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Simpson, V.R., Panciera, R.J., Hargreaves, J., McGarry, J.W., Scholes, S.F., Bown, K.J., Birtles, R.J. (2005). Myocarditis and myositis due to infection with *Hepatozoon* species in pine martens (*Martes martes*) in Scotland. *Vet. Rec.* **156**, 442-6.
- Simpson, V.R., Birtles, R.J., Bown, K.J., Panciera, R.J., Butler, H., Davison, N. (2006). *Hepatozoon* species infection in wild red squirrels (*Sciurus vulgaris*) on the Isle of Wight. *Vet. Rec.* **159**, 202-5.
- Sloboda, M., Kamler, M., Bulantová, J., Votýpka, J., Modrý, D. (2008). Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? *Folia Parasitol.* **55**, 13-6.
- Smith, T.G., Desser, S.S., Martin, D.S. (1994). The development of *Hepatozoon sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitol Res.* **80**, 559-68.
- Smith, T.G. (1996). The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J. Parasitol.* **82**, 565-85.
- Soares Ferreira Rodrigues, A.F., Daemon, E., Massard, C.L. (2007). Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). *Parasitol. Res.* **100**, 347-50.
- Sørensen, O. & Lindsø, L. (2021). The golden jackal *Canis aureus* detected in Norway—Management challenges with naturally dispersed species new to the country. *Fauna.* **74**, 74-87.
- Stefanović, M., Bogdanowicz, W., Adavoudi, R., Martínez-Sosa, F., Doan, K., Flores-Manzanero, A., Srinivas, Y., Banea, C.O., Ćirović, D., D'Amico, G., Djan, M., Giannatos, G., Hatlauf, J., Hayrapetyan, V., Heltai, M., Homel, K., Hulva, P., Ionică, A.M., Jhala, Y.V., Juránková, J., Pilot, M. (2024). Range-wide phylogeography of the golden jackals (*Canis aureus*) reveals multiple sources of recent spatial expansion and admixture with dogs at the expansion front. *Biol. Conserv.* **290**, 110448.
- Stojanov, I., Pušić, I., Pavlović, I., Prodanov-Radulović, J., Miloš, K., Ratajac, R. (2014). Findings of ticks in some species of wild carnivores. In: 3rd Int. Symp. on Hunting, Zemun – Belgrade. Serbia, 26-28.
- Stoyanov, S. (2012). Golden jackal (*Canis aureus*) in Bulgaria. Current status, distribution, demography and diet. International symposium on hunting “Modern aspects of sustainable management of game population”, Zemun–Belgrade, Serbia, 22-24.
- Sukara, R., Chochlakis, D., Ćirović, D., Penezić, A., Mihaljica, D., Ćakić, S., Valčić, M., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tomanović, S. (2018). Golden jackals (*Canis aureus*) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick Borne Dis.* **9**, 1090-1097.
- Sukara, R., Andrić, N., Andrić, J.F., Mihaljica, D., Veinović, G., Ranković, V., Tomanović, S. (2023). Autochthonous infection with *Ehrlichia canis* and *Hepatozoon canis* in dogs from Serbia. *Vet. Med. Sci.* **9**, 111-118.
- Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Sréter, T. (2013). *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella spiralis* in golden jackals (*Canis aureus*) of Hungary. *Vet. Parasitol.* **197**, 393-396.
- Taryannikov, V.I. (1974). Feeding of *Canis aureus aureus* in the Syrdarja Basin. *Zool. Zhurnal.* **53**, 1539-1547.

- Teodorović, V., Vasilev, D., Ćirović, D., Marković, M., Ćosić, N., Djurić, S., Djurković-Djaković, O. (2014). The wolf (*Canis lupus*) as an indicator species for the sylvatic *Trichinella* cycle in the Central Balkans. *J. Wild. Dis.* **50**, 911-915.
- Tillmann, J.E. (2020). Der Goldschakal in Deutschland. *Naturschutz Und Landschaftsplan.* **52**, 428-434.
- Thomas, R., Santodomingo, A., Saboya-Acosta, L., Quintero-Galvis, J.F., Moreno, L., Uribe, J.E., Muñoz-Leal, S. (2024). *Hepatozoon* (eucoccidiorida: hepatozoidae) in wild mammals of the Americas: a systematic review. *Parasit Vectors.* **17**, 108.
- Tolnai, Z., Sréter-Lancz, Z., Sréter, T. (2015). Spatial distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. *Ticks Tick Borne Dis.* **6**, 645-8.
- Tolkacz, K., Kretschmer, M., Nowak, S., Mysłajek, W.R., Alsarraf, M., Wężyk, D., Bajer, A. (2023). The first report on *Hepatozoon canis* in dogs and wolves in Poland: clinical and epidemiological features. *Parasit. Vectors.* **16**, 313.
- Tomanović, S., Chochlakakis, D., Radulović, Ž., Milutinović, M., Ćakić, S., Mihaljica, D., Tselentis, Y., Psaroulaki, A. (2013a). Analysis of pathogen co-occurrence in hostseeking adult hard ticks from Serbia. *Exp. Appl. Acarol.* **59**, 367–376.
- Tomanović, S., Radulović, Ž., Ćakić, S., Mihaljica, D., Sukara, R., Penezić, A., Burazerović, J., Ćirović, D. (2013b). Tick species (acari: Ixodidae) of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Serbia, in: 2nd International Symposium on Hunting “modern Aspects of Sustainable Management of Game“. University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Novi Sad, 229-235.
- Tomassone, L., Berriatua, E., De Sousa, R., Duscher, G.G., Mihalca, A.D., Silaghi, C., Sprong, H., Zintl, A. (2018). Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. *Vet. Parasitol.* **251**, 17-26.
- Torina, A., Blanda, V., Antoci, F., Scimeca, S., D’Agostino, R., Scariano, E., et al., (2013). A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. *Transbound. Emerg. Dis.* **60**, 125-130.
- Trbojević, I. & Ćirović, D. (2016). Sexual dimorphism and population differentiation of the wolf *Canis lupus* based on morphometry in the Central Balkans. *North-West. J. Zool.* **12**, 349-355.
- Trouwborst, A., Krofel, M., Linnell, J.D. (2015). Legal implications of range expansions in a terrestrial carnivore: the case of the golden jackal (*Canis aureus*) in Europe. *Biodivers. Conserv.* **24**, 2593-2610.
- Tsokana, C. N., Sioutas, G., Symeonidou, I., Papadopoulos, E. (2024). Wildlife and parasitic infections: A One Health perspective in Greece. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis.* **6**, 100184.
- Turner, C.M. (1986). Seasonal and age distributions of *Babesia*, *Hepatozoon*, *Trypanosoma* and *Grahamella* species in *Clethrionomys glareolus* and *Apodemus sylvaticus* populations. *Parasitol.* **93**, 279-89.
- Uiterwijk, M., Vojta, L., Šprem, N., Beck, A., Jurković, D., Kik, M., Duscher, G.G., Hodžić, A., Reljić, S., Sprong, H., Beck, R. (2023). Diversity of *Hepatozoon* species in wild mammals and ticks in Europe. *Parasit Vectors.* **16**, 1-12.
- Usluca, S., Celebi, B., Karasartova, D., Gureser, A.S., Matur, F., Oktem, M.A., Sozen, M., Karatas, A., Babur, C., Mumcuoglu, Y.K., Ozkan, T.A. (2019). Molecular survey of *Babesia microti* (Aconoidasida: Piroplasmida) in Wild Rodents in Turkey. *J Med Entomol.* **56**, 1605-9.
- Uzelac, A., Klun, I., Ćirović, D., Penezić, A., Ćirković, V., Djurković-Djaković, O. (2019). Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in wild canids in Serbia. *Parasitol. Int.* **73**, 101973.
- Valkiūnas, G., Mobley, K., Iezhova, T.A. (2016). *Hepatozoon ellisgreineri* n. sp. (Hepatozoidae): description of the first avian apicomplexan blood parasite inhabiting granulocytes. *Parasitol Res.* **115**, 609-13.
- Vassilev, S. & Genov, P. (2002). On the reproduction of jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria. *Acta Zool. Bulg.* **54**, 87-92.

- Veinović, G., Sukara, R., Mihaljica, D., Penezić, A., Cirović, D., Tomanović, S. (2024). The Occurrence and Diversity of Tick-Borne Pathogens in Small Mammals from Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **24**, 5.
- Viana, L.A., Soares, P., Silva, J.E., Paiva, F., Coutinho, M.E. (2012). Anurans as paratenic hosts in the transmission of *Hepatozoon caimani* to caimans *Caiman yacare* and *Caiman latirostris*. *Parasitol Res.* **110**, 883-6.
- Vincent-Johnson, N., Baneth, G., Allen, E. K. (2022). Hepatozoonosis. In: Sykes, J. E.; Saunderson, W.B., editors. *Greene's infectious diseases of the dog and cat*. Elsevier Health Sciences, 1230-1247.
- Vojta, L., Mrljak, V., Curković, S., Zivcinkaj, T., Marinculić, A., Beck, R. (2009). Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia. *Int. J. Parasitol.* **39**, 1129-36.
- Vos, J. (2000). Food habits and livestock depredation of two Iberian wolf packs (*Canis lupus signatus*) in the north of Portugal. *J. Zool.* **251**, 457-462.
- Walter, G., Liebisch, A. (1980). Studies of the ecology of some blood protozoa of wild small mammals in North Germany (author's transl). *Acta Trop.* **37**, 31-40.
- Wandeler, P., Funk, S.M., Largiadèr, C.R., Gloor, S., Breitenmoser, U., (2003). The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Mol. Ecol.* **12**, 647-656.
- Waner, T., Baneth, G., Strenger, C., Keysary, A., King, R., Harrus, S. (1999). Antibodies reactive with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia phagocytophila* genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (*Canis aureus syriacus*) from Israel. *Vet. Parasitol.* **82**, 121-
- Watkins, B.M., Nowell, F. (2003). *Hepatozoon griseisciuri* in grey squirrels (*Sciurus carolinensis*): changes of blood leucocyte numbers resulting from infection. *Parasitol.* **127**, 115-20.
- Wilson, D.E. & Reeder, D.M. (2005). *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*, 3rd ed. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Wymazał, A., Nowak, S., Mysłajek, R. W., Bajer, A., Welc-Falęciak, R., Szewczyk, M., Kwiatkowska, I., Stępnia, M.K., Figura, M., Kloch, A. (2024). Tick-borne infections in wolves from an expanding population in Eastern Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* **15**, 102272.
- Zub, K., Theuerkauf, J., Jędrzejewski, W., Jędrzejewska, B., Schmidt, K., Kowalczyk, R. (2003). Wolf pack territory marking in the Białowieża Primeval Forest (Poland). *Behaviour*, 635-648.

Biografija autora

Milica K. Kuručki je rođena 08.11.1993. godine u Zrenjaninu. Osnovnu školu „Đura Jakšić“ završila je u Perlezu, srednju školu „Zrenjaninska gimnazija“ završila je u Zrenjaninu sa odličnim uspehom. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Opšta biologija upisala je školske 2012/2013. godine, a diplomirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 8,38. Iste godine nastavlja master akademske studije na Biološkom fakultetu, studijski program Biologija, modul Zoologija koji završava sa prosečnom ocenom 9,67 odbranom master rada „Ontogenetske promene oblika glave male zelene žabe (*Pelophylax lessonae*, Ranidae)“. Školske 2018/2019. godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu, studijski program Ekologija, modul Ekologija životinja i biogeografija. Od novembra 2018. godine Milica Kuručki je zaposlena na Katedri za ekologiju životinja i zoogeografiju, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu kao istraživač pripravnik na projektu „Enzootski transmisioni ciklusi patogenih mikroorganizama“ koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (173006). Zvanje istraživača saradnika stekla je u septembru 2021. godine. Milica Kuručki je bila član velikog broja nacionalnih projekata, a trenutno je član projekta „TalkToTick, Tailoring management of tick-borne diseases based on diversity of ticks and tick-borne pathogens“ u okviru programa PRIZMA, i član projekta „WORM_PROFILER, Worm Profiler: Surveillance and population genetics of Echinococcus in Serbia“ u okviru programa PROMIS, Fonda za nauku Republike Srbije. Autor je ili koautor 9 naučnih radova u međunarodnim vodećim časopisima iz M20 kategorije (jedan M21a, dva M21, četiri M22, i dva M23) i 3 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja, štampana u celini ili izvodu.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisana: **Milica Kuručki**

Broj indeksa: **E3002/2018**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Hepatozoon canis u populacijama vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) na teritoriji Srbije

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Milica Kuručki**

Broj indeksa: **E3002/2018**

Studijski program: **Ekologija**

Naslov rada: **Hepatozoon canis u populacijama vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) na teritoriji Srbije**

Mentori: **dr Duško Ćirović, dr Snežana Tomanović**

Potpisana **Milica Kuručki**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala 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:

***Hepatozoon canis* u populacijama vuka (*Canis lupus*) i šakala (*Canis aureus*) na teritoriji Srbije**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala 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 odlučila.

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.
-