



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за фитомедицину и заштиту
животне средине**

Невена Благојевић

дипл. инж. пољопривреде

**АКАРИЦИДНИ ЕФЕКАТ АЗАДИРАКТИНА НА
АДУЛТНЕ ЈЕДИНКЕ КРПЕЉА ВРСТЕ *IXODES RICINUS***

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2024.



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ**



**Департман за фитомедицину и заштиту
животне средине**

Кандидат

дипл.инж. Невена Благојевић

Ментор

проф. др Александра Петровић

**АКАРИЦИДНИ ЕФЕКАТ АЗАДИРАКТИНА НА
АДУЛТНЕ ЈЕДИНКЕ КРПЕЉА ВРСТЕ *IXODES RICINUS***

Мастер рад

Нови Сад, 2024.

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА:

др Александра Петровић, ванредни професор

Ужа научна област: Зоологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Ментор-

др Дејан Првуловић, ванредни професор

Ужа научна област: Хемија и биохемија
Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Председник-

др Ивана Ивановић, доцент

Ужа научна област: Зоологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад

-Члан-

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	2
2.1 БИОЛОГИЈА И ЕКОЛОГИЈА КРПЕЉА	2
2.2 РАСПРОСТРАЊЕНОСТ КРПЕЉА И УТИЦАЈ КЛИМАТСКИХ ПРОМЕНА	8
2.3 ВЕКТОРСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ КРПЕЉА.....	12
2.4 КАКО СЕ ЗАШТИТИТИ ОД КРПЕЉА	14
2.5 АКАРИЦИДНИ ЕФЕКАТ АЗАДИРАКТИНА	14
3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА.....	19
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА.....	20
5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	22
6. ЗАКЉУЧАК	30
7. ЛИТЕРАТУРА	32
8. ПРИЛОГ	37

АКАРИЦИДНИ ЕФЕКАТ АЗАДИРАКТИНА НА АДУЛТНЕ ЈЕДИНКЕ КРПЕЉА ВРСТЕ *IXODES RICINUS* РЕЗИМЕ

Циљ рада је да се у лабораторијским условима утврди проценат акарицидне ефикасности азадирактина, компоненте етарског уља биљке ним (*Azadirachta indica*) на мужјаке и женке крпеља врсте *Ixodes ricinus* у односу на различите концентрације (10, 25, 50, 75 и 100%) и дужину трајања излагања (1, 2, 4 и 8 сати од апликације препарата). Резултати овог рада показују високу акарицидну ефикасност препарата на бази азадирактина и код мужјака и код женки крпеља врсте *I. ricinus* када су тестиране више концентрације, од 75 и 100%. При овим концентрацијама уочен је морталитет од 100% у свим понављањима и код мужјака и код женки већ након четири сата од примене препарата. Применом једнофакторијалне анализе варијансе израчунато је да постоји висока статистичка значајност између броја угинулих јединки као зависно променљиве и концентрације примењеног препарата као независног предиктора. Остале независне детерминанте као што су пол крпеља, време оцене или број понављања нису показале постојање статистички значајних разлика.

Кључне речи: азадирактин, акарициди, крпељи, *Ixodes ricinus*

ACARICIDAL EFFECT OF AZADIRACHTIN ON ADULT TICKS OF THE SPECIES *IXODES RICINUS* SUMMARY

The aim of this study was to determine the acaricidal efficiency of azadirachtin, a component of the neem (*Azadirachta indica*) essential oil, on *Ixodes ricinus* adults in relation to different concentrations (10, 25, 50, 75 and 100%) and exposure duration (1, 2, 4 and 8 hours from the application). The results have revealed high acaricidal efficiency of the azadirachtin in both, *I. ricinus* males and females when higher concentrations, 75 and 100% were tested. At these concentrations, 100% mortality was observed in all repetitions, in males and females, four hours after the preparation was administrated. One-way analysis of variance emphasized a high statistical significance between the number of the dead specimens as a dependent variable and the concentration of the applied preparation as an independent predictor. Other independent determinants such as the gender, the time of the assessment, or the number of the repetitions did not show any statistically significant differences.

Key words: azadirachtin, acaricides, ticks, *Ixodes ricinus*

1. УВОД

Arachnida су пауколике животиње које припадају групи зглавкара са хелицерама. Ова таксономска категорија обухвата бројне редове, међу којима је и ред Acarina у који се убрајају гриње, прегљеви и крпељи. Око 60.000 врста је описано до данас, од којих су највећи број предатори или ектопаразити, међутим, има и оних са копрофагним начином исхране. Пауколике животиње су биле први зглавкари који су настанили копно, првенствено захваљујући трансформацији листоликих шкрга у листолика плућа и развоју трахејног система (Ђukić и сар., 2018).

Иксодидни крпељи представљају хематофагне артропode чији се медицински значај огледа у могућности да преносе узрочнике врло тешких паразитских, вирусних и бактеријских обољења како на људе, тако и на домаће животиње (Lalošević и сар., 2011). Род *Ixodes*, представља највећи род тврдих крпеља, који обухвата чак 241 врсту. Најважније врсте у Европи и Азији су: *I. ricinus* (Linnaeus, 1758) и *I. persulcatus* (Schulze, 1930). Ове две врсте крпеља су међу главним векторима у преношењу великог броја узрочника хуманих обољења (Jongejan и Uilenberg, 2004). Узрочници обољења које преносе крпељи представљају велики проблем и јавног здравља, али и здравља животиња широм света. *I. ricinus* је главни вектор у преношењу вирусних и бактеријских зооноза у Европи. Присуство ове врсте је првенствено повезано са мешовитим листопадним шумама. Недавно је дошло до уочавања бројних, стабилних популације крпеља на европским урбаним зеленим површинама које су од значаја за јавно здравље због изложености људи, али и домаћих животиња. У одржавању популација крпеља у урбаним стаништима главну улогу играју ситни и средњи сисари, птице, животиње које су пратиоци човека, али и крупнији сисари (Rizzoli и сар., 2004)

Етарско уље биљке ним (*Azadirachta indica* L.) може безбедно да се користи за контролу крпеља код животиња. Такође, ово етарско уље има бактерицидно и фунгицидно дејство и може да ублажи инфекције изазване убодом крпеља.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1 БИОЛОГИЈА И ЕКОЛОГИЈА КРПЕЉА

Ixodes ricinus је најчешћи вектор узрочника различитих обољења у Европи. Ова врста крпеља паразитира на великом броју дивљих врста кичмењака, као и другим случајним домаћинима, као што су људи, стока и кућни љубимци. Преноси широк спектар патогена, укључујући бактерије, спирохету *Borrelia burgdorferi* s.l., али и вирус крпељског енцефалитиса (Alkische и сар., 2017).

Класификација врсте *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Слика 1.) је следећа:

Тип: Arthropoda

Класа: Arachnida

Ред: Acari

Породица: Ixodidae

Род: *Ixodes*

Врста: *Ixodes ricinus*



Слика 1. Обичан крпељ - *Ixodes ricinus* (извор: <https://pixabay.com>)

Ред Acarina обухвата преко 20.000 врста крпеља, али и гриња, односно прегљева. Већина врста су као ектопаразити, значајни у хуманој, али и у ветеринарској медицини, као и у сточарској и биљној производњи.

Врсте из ове групе одликују ситне димензије, које се налазе на граници уочљивости, свега 0,5 до 1 mm, без јасно видљиве сегментације тела, али се према распореду екстремитета, запажају следећи региони: протеросома (обухвата гнатосому и проподосому) и хистеросома (која обухвата матаподосому и опистосому) (Ђukić и сар., 2018).

Крпеље сврставамо у 3 породице: Ixodidae (Слика 2. А), Nuttalliellidae (Слика 2. В) и Argasidae (Слика 2. С). Најбројнију групу, са чак 720 врста, чини породица Ixodidae, односно тврди крпељи. У ову групу убрајамо следеће родове: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Cornupalpatum*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor*, а најбројнији род, чине управо *Ixodes* у који се убраја чак 249 врста (Guglielmone и сар., 2014). Не мање важни, породица меких крпеља, односно *Argasidae*, којој припада 186 врста разврстаних у родове: *Argas*, *Antricola*, *Carios*, *Ornithodoros*, као и *Otobius*. У породицу Nuttalliellidae, сврстана је само једна врста, која води порекло са подручја јужне Африке, а то је *Nuttalliella namaqua* (Bedford, 1931).

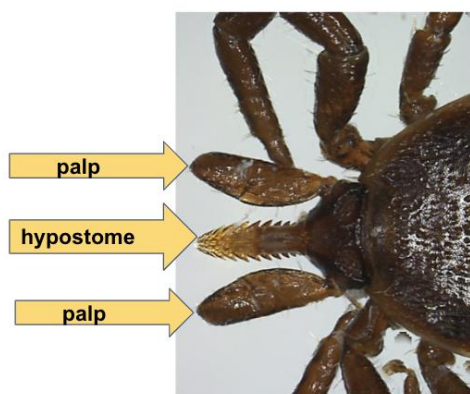
Што се морфологије тиче, када је реч о породици Ixodidae, тело им је састављено од "лажне главе" (*capitulum*, *gnathostoma*) и овалног задњег дела који је дорзовентрално спљоштен (*idiosoma*). Меки крпељи, односно Argasidae се од тврдых крпеља разликују у низу како биолошких, тако и морфолошких својстава:

- Тврди крпељи: *capitulum* се налази са предње стране, одозго је јасно уочљив,
- Меки крпељи: *capitulum* се код њих налази са вентралне стране, па гледано одгоре није уочљив.

Capitulum носи усни апарат (Слика 3.) који се састоји од базе (*basis capituli*), парних клешта (*cheliceræ*), хипостома (*hypostom*) и једног пара палпи (*palpus*). Хипостом се налази у средњем делу, прекривен је зубићима који су савијени ка унутра. Такође, грађа и структура усног апарата могу да потпомогну приликом идентификације рода и врсте крпеља.



Слика 2. А) Ixodidae, В) Argasidae, С) Nuttalliellidae (извор: www.wikipedia.org)



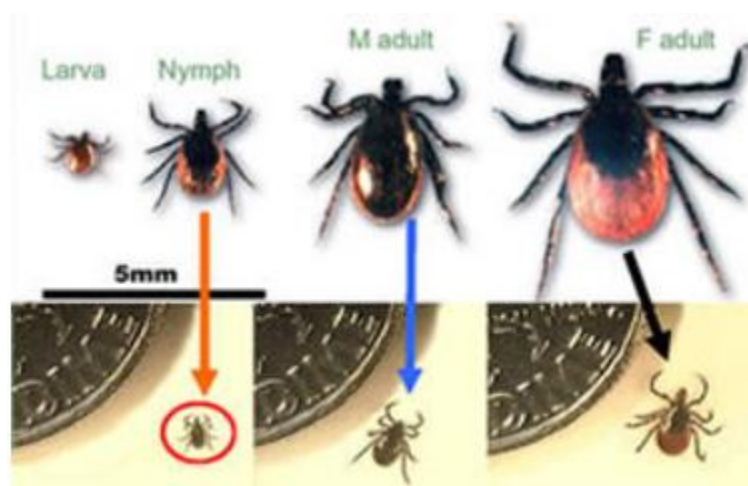
Слика 3. Грађа усног апарата тврдих крпеља (извор: <https://ticks.rutgers.edu>)

Одрасли крпељи и нимфе поседују 4 пара ногу, док ларве имају 3 пара. Ноге крпеља су грађена од следећих чланака: *coxa*, *trochanter*, *femur*, *tibia*, *tarsus* и *praetarsus*. Дисајни отвори су смештени вентрално, иза четвртог пара ногу. Полни отвор код ларви и нимфи није видљив, а код одраслих врста крпеља се налази иза четвртог пара ногу, на вентралној страни. Полни отвор, заједно са очврснулом полном плочицом, која затвара полни отвор и полном браздом, чини полне структуре које су од таксономског значаја. На леђној страни, тврди крпељи имају чврст штит, односно *scutum*. Код женки, ларви и нимфи, *scutum* заузима скоро једну трећину леђне површине, док код мужјака, он покрива целу леђну страну.

Меки крпељи не поседују *scutum*, али имају тешки кожаст интегумент који је присутан у свим стадијумима, осим у стадијуму ларве.

Тврди крпељи имају карактеристичну полукружну аналну бразду која је закривљена испред аналног отвора, а код осталих крпеља се налази иза аналног отвора, или у потпуности одсуствује.

Што се животног циклуса крпеља тиче, већину свог живота проводе слободни у свом станишту, а тај слободни стадијум смењују са паразитским стадијумом током којег узимају крвни оброк. Постоје четири животна стадијума током њиховог циклуса развића, а то су: јаје (инактивно стање), ларва, нимфа и одрасла (адултна) јединка (Нид, 2018) (Слика 4.).



Слика 4. Стадијуми крпеља током циклуса развића (извор: www.zzjzvpz.hr)

Ларва, нимфа и адулт представљају покретне стадијуме крпеља. Они траже одговарајућег домаћина, те се након усвајања крвног obroка отпуштају и падају на тло, настављајући даље свој развој. Дужина циклуса развића зависи од врсте крпеља, али и броја домаћина. Циклус развића може бити моноксен, када се читав циклус завршава на једном домаћину, затим диоксен, на два домаћина, или пак триоксен, који подразумева смену три различита домаћина исте или различите врсте. Крпељи из породице Ixodidae, захтевају три домаћина, те свој циклус развића обично завршавају током годину дана.

Усвајање крвног obroка је неопходно за сваки развојни стадијум. Женка је у стању да положи око 3.000 јаја, која се обично могу уочити на скровитим местима, испод труле вегетације или лишћа, или у неким од пукотина које су настале природним, или намерним путем. Из јаја излазе покретне ларве које имају 3 пара ногу, те је тада потребно да пронађу домаћина. Домаћини могу да им буду птице, или ситни мишолоки глодари.

Крпељи имају два начина која користе у проналаску домаћина, а то су активан и пасиван начин. Активне врсте активно траже домаћина. Пасивне врсте мирују у

свом окружењу и зависе од животиња које ће туда да прођу. Већина крпеља се попне на врх травке или гранчице приликом потраге за домаћином. Постави се у специфичан положај, положај "трагања" са испруженим првим паром ногу. Угљен диоксид, покрети домаћина, као и топлота, представљају стимулансе за постављање крпеља у овај положај. Када адекватан домаћин додирне њихов предњи пар ногу, крпељи се брзо пењу на тело, причврсте и буше кожу у циљу усвајања крвног оброка. После три до седам дана, након усвајања довољне количине крви, ларве се отпуштају на тло и пресвлаче у наредни стадијум, који се зове стадијум нимфе. Нимфе поседују четири пара ногу и асексуални су стадијум, као и ларва. следи усвајање крвног оброка, на новом домаћину, те се након тога преображавају у адултни стадијум (Слика 5.).



Слика 5. Животни циклус крпеља (извор: www.zzjzpirot.org.rs)

Полни диморфизам је уочљив само код одраслих јединки. Женке се од мужјака разликују по облику и величини леђног штита, присуства *area porosae*, али и по грађи капитулума, посебно рострума.

Женски полни систем чине један оваријум са парним јајоводима који се спајају у утерус. Оваријум је цеваст орган, танких зидова и шупље форме. На оба краја, оваријум се сужава у јајовод који се протеже ка напред. Јајоводи се дистално спајају у непарни јајовод или утерус, који је цевастом структуром повезан са цервикалним делом вагине. Ова цев има улогу у складиштењу сперматофора и сперматиде. Такође, свки крпељи поседују тубуларне акцесорне полне жлезде, које својим

екскретима покривају јаја пре него се она положи. Иксодидни крпељи поседују и лобуларну акцесорну полну жлезду чији секрет воштаног типа обавија јаја током проласка кроз вагину, а који је делимично отпоран на воду.

Мушки полни органи се састоје из цевастих тестиса. Они се пружају од нивоа гениталног отвора до нивоа задње ивице четвртог пара кокси. Апикало, наставак тестиса је у парне изводе *vasa efferentia* који се спајају даље у један *vasa deferens*, који се потом излива у генитални отвор преко ејакулаторног канала.

Женке привлаче мужјаке приликом производње агрегационог феромона и кад су оне на домаћину, али и кад нису. Сходно томе, копулација може да се одвија и пре почетка исхране женки. До три дана од копулације, женке које су насисане испољавају појачану активност ка тражењу домаћина (Ivanović, 2014).

Одрасла женка или мужјак су у потрази за трећим домаћином у току овог развојног циклуса. Исхрана траје од 8 до 12 дана, након чега женка бива оплођена на домаћину. Након тога, женка се отпушта са домаћина и тражи погодно место на тлу да би положила јаја. Код *Ixodes* врста, парење се такође може одвијати и док се крпељи још увек налазе на вегетацији. Преовипозициони период је кратак, а након њега женка *I. ricinus* у просеку положи 2.500 јаја у току само једног циклуса. У зависности од величине крвног оброка који је женка усвојила, величине јаја и врсте крпеља, зависи и број јаја који ће да се положи. Након што су јаја положена, исцрпљена женка умире. Овим се завршава развојни циклус крпеља. Уколико дође до прекида развојног циклуса, крпељ може да преживи целу зиму у стадијуму хибернације. Циклус развића је обично компетиран у току једне године, али се може пролонгирати и на период од три године (Rose, 2017).

Шумовита европска подручја обилују крпељима од раног пролећа, па све до касне јесени. Крпељи сами по себи не проузрокују болест, међутим, уколико је крпељ заражен бактеријом, или пак вирусом, онда се тај узрочник може пренети убодом крпеља и узроковати болести код људи или животиња. (Krajinović и Krajinović, 2018).

2.2 РАСПРОСТРАЊЕНОСТ КРПЕЉА И УТИЦАЈ КЛИМАТСКИХ ПРОМЕНА

Крпељи су активни када је дневна температура изнад 7 °C. Климатске промене утичу на географску дистрибуцију и диверзитет врста артропода, што заузврат утиче на географско распрострањење и епидемиологију удружених векторских болести. До данас, ефекте климатских промена на просторну дистрибуцију *I. ricinus* истраживало је неколико студија.

Географска распрострањеност ове врсте, повезана је са климатским факторима као што су: влажност, температура ваздуха, земљишта и воде, као и до врсте вегетације. Неке студије су откриле да је географска распрострањеност и појава врсте *I. ricinus* на вишим надморским висинама померена са повећањем температуре на глобалном нивоу. Током претходног века годишња температура је порасла за 0,7 °C глобално и предвиђа се да ће током 21. века порастати за још 1,1 °C. Очекује се да ће загревање утицати на векторе и домаћине, који ће заузврат утицати на векторски преносиве патогене. Такође, очекује се да ће глобално загревање променити физиологију вектора, циклус развића, способност преживљавања, настањивање погодних, али и нових станишта, као и интеракцију између вектора, домаћина и патогена. (Alkishe и сар., 2017).

Познато је да се распрострањеност *I. ricinus* мења у Европи, како у зависности од надморске висине, тако и географске ширине. Сви животни стадијуми ове врсте трагају за домаћином путем технике „заседе“, при чему, одржавајући се на вегетацији, чекају да домаћин прође. Током потраге крпељи губе влагу. Из тог разлога, мора периодично да се спусти са вегетације на земљу, како би се рехидрирали. Приземна вегетација представља погодну средину, која омогућава опстанак крпеља (Ivanović, 2014).

I. ricinus поседује чулне ћелије које су осетљиве на светлост, а које се налазе на леђној страни тела. Такође, поседује и чулне органе који се називају Хелерови органи. Ови органи им омогућавају откривање промена у окружењу, као што су температура, угљен диоксид, светлост, влажност и вибрација. На тај начин, крпељи препознају које време је погодно за потрагу за домаћином, али и његово присуство у блиској околини.

Генерално, крпељи се хране тако што усвајају крвни оброк паразитирајући на великом броју топлокрвних и хладнокрвних кичмењака. Јувенилни стадијуми могу

да се пронађу на домаћинима свих величина, од сисара и ситних птица, до крупних, као што су папкари и копитари. Одрасли стадијуми се искључиво хране на крупнијим домаћинима, попут јелена и говеда. Бројност домаћина и локални састав фауне утиче у многоме на бројност крпеља и њихову исхрану. Број и врсте погодних домаћина варирају у односу на различите географске регионе, а појава и стопе обољења варирају у зависности од сезонских образаца активности тражења, доступности домаћина и успешно остварених контаката са домаћином (Alkishe и сар., 2017).

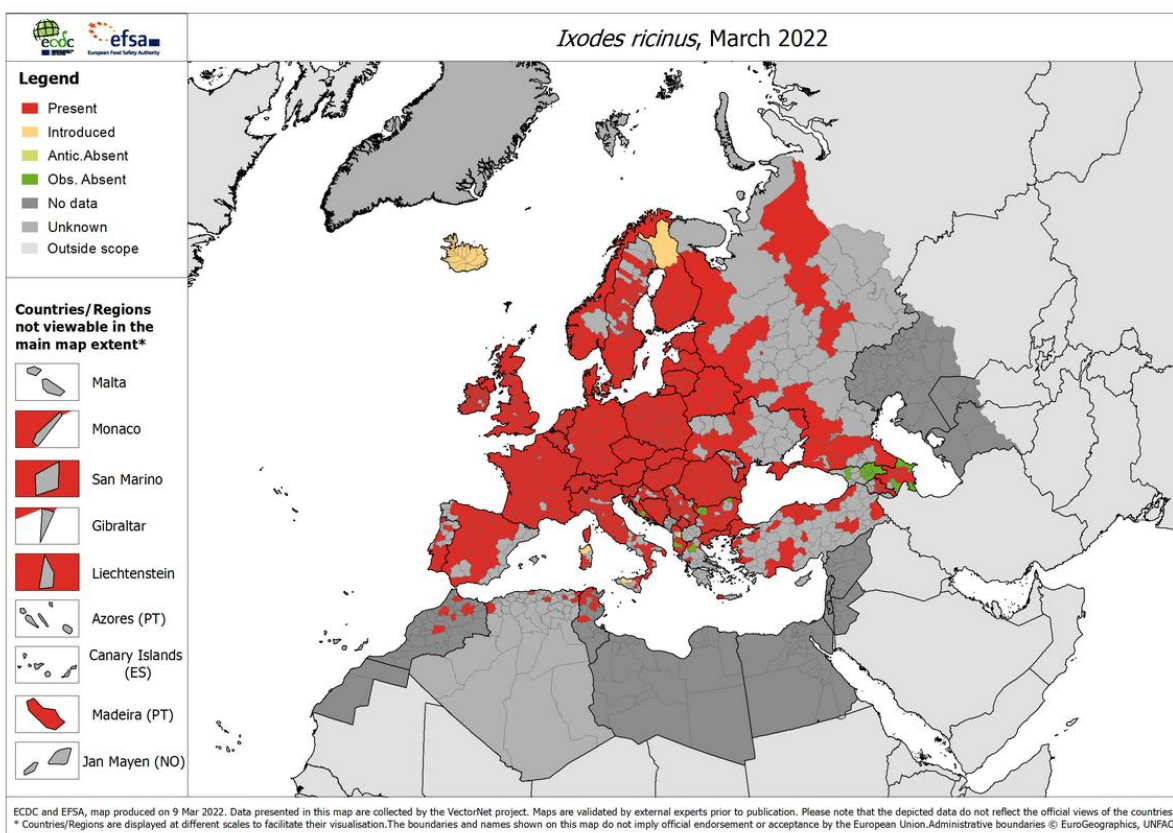
I. ricinus је врста која је осетљива на промене климатских услова. Захтева да релативна влажност буде најмање 80% како би преживели током периода ван домаћина. Због тога је распрострањење *I. ricinus* ограничено на области умерених до великих количина падавина са вегетацијом која задржава високу влажност. Карактеристична станишта која му погодују варирају широм Европе, а укључују четинарске и листопадне шуме, мочваре, паркове и пашњаке (Ivanović, 2014).

Климатске промене имају велики утицај на опстанак крпеља, сезонску активност, али и на њихову бројност. Топла пролећа и блаже зиме резултују раном појавом крпеља у сезони. Период великих врућина и суше током лета или пролећа може довести до тога да крпељи престану са потрагом за домаћином (Alkishe и сар., 2017).

Крпељи северног и умереног климатског поднебља су адаптирани за преживљавање на температурама испод нуле. Хладније зиме могу да утичу на преживљавање ситних сисара који су погодни домаћини, те наредне године може да дође до смањења бројности потенцијалних домаћина за крпеље, а тиме и бројности популације крпеља (Ivanović, 2022).

Врсту *I. ricinus* можемо да пронађемо широм подручја Европе: од запада ка истоку, од Ирске до Урала, те од севера ка југу, од Шведске, па до Северне Африке. Ова врста показује изузетно бројне и стабилне популације широм Европе, али се све чешће пријављује присутност и на новим локацијама у Европи (Слика 6.). Према наводима Alkishe и сар. (2017), постоје докази да се из године у годину услед климатских промена бројност ове врсте повећала у ендемским подручјима где је иначе била присутна са стабилним популацијама. Такође, са повећањем надморске висине смањује се бројност ове врсте крпеља. Највећа надморска висина, на којој је забележена овипозиција, била је 1150 m надморске висине (Laaksonen и сар., 2017), а стопа преживљавања и пиљења јаја опада са порастом надморске висине. Такође,

мањи је број потенцијалних домаћина на већим надморским висинама (Кјæг и сар., 2019).



Слика 6. Распрострањеност врсте *I. ricinus* (извор: www.ecdc.europa.eu)

Швајцарске студије, истичу да оријентација и експозиција планинских екосистема такође утичу на бројност ове врсте, па чак и када је реч о надморској висини. На 1450 m надморске висине у Швајцарској, густина нимфи се разликује од оних нађених на северној и на јужној страни падине планине. Густина се смањивала са висином падине окренуте ка југу, али се повећавала са висином северне стране планине (Кјæг и сар., 2019). Студије рађене у Јужном Велсу доказују да су током топлијег периода, односно током летњих месеци популације *I. ricinus* биле чешће на падинама које су окренуте ка источној и западној страни, што се може променити са годишњим добима (Medlock и сар., 2008). У областима Италије, крпељи су далеко мање заступљени изнад 1300 m надморске висине. Према Estrada-Рења и сар. (2006), у севернијим подручјима ова врста се јавља до 1450 m надморске висине, у Швајцарској до 1560, а у Аустрији од 1080 до 1270 m надморске висине. С обзиром да је лимитирајући фактор за ову врсту релативна влажност ваздуха, у сувљим

деловима Европе се јавља изнад 700 m надморске висине, а у Медитеранским областима и Грчкој, нису пронађени крпељи ове врсте испод 600 m надморске висине. Према Medlock и сар. (2013) постоји вероватноћа да се због утицаја атлантског океана, односно веће влажности ваздуха на западу крпељи ове врсте налазе од нивоа мора па до 2000 m надморске висине. Што се више крећемо ка истоку, који је изложенији утицају Средоземног мора и медитеранској клими, тј. сувљим пределима, *I. ricinus* је присутан само на великим надморским висинама.

Пример из нашег окружења, односно Босне и Херцеговине, говори о томе да је висински праг ове врсте током 1950. године био мањи од 800 m надморске висине, али се током 1960. године повећао на 900, све до 1190 m надморске висине током 2010. године (Omeragić, 2011). Поред бројних абиотичких фактора који утичу на бројност и распрострањење ове врсте, значајан фактор има и вегетацијски покривач. *I. ricinus* се често среће у областима где је вегетациони период прелазно 180 дана, али ретко где је преживљава уколико је овај период мањи од 160 дана. Такође, са мање од 125 дана прекривености снегом, ова је врста била константно присутна, док је изнад 175 дана прекривености снегом, ова врста изостајала са станишта. Период вегетације који је продужен, али и зиме које су благе, погодују бољем преживљавању крпеља ове врсте али и већој бројности популација Medlock и сар. (2013).

Боље разумевање и мапирање ширења *I. ricinus* је од великог значаја за процену ризика од ширења узрочника различитих обољења које преноси ова векторска врста. (Medlock и сар. 2013).

Крпељи насељавају скоро све делове света. Можемо их пронаћи у умереним, а поготово тропским и субтропским пределима. *I. ricinus* је раширен широм Европе, у условим где влада умерена клима, између 39° и 65° географске ширине, од Португала па до Русије. Ова врста се може пронаћи чак и у деловима северне Африке, али је ограничена на влажније и хладније области под медитеранском климом. На северу, простире се до Скандинавије. Ова врста има широк ареал распрострањености, што казује да се веома добро прилагођава различитим условима еколошке природе (Ivanović, 2014).

2.3 ВЕКТОРСКИ ПОТЕНЦИЈАЛ КРПЕЉА

Крпељи могу да преносе различите врсте патогена који узрокују крпељски менингоенцефалитис, ерлихиозу, бабезиозу, Лајмску болест, нека рикецијска обољења, анаплазмозу, туларемију. Свака од ових болест, има значајан морбидитет и морталитет. Пораст инциденце бројних крпељима преносивих болести, представља посебан проблем, као и ширење географских подручја на којима се поједине векторске врсте крпеља могу срести. Од великог медицинског и ветеринарског значаја су све болести које изазивају крпељима преношени узрочници. Данас се многе европске земље суочавају са проблемом да крпељима преносиве болести представљају велики здравствени проблем (Caуol и сар., 2017).

Крпељи имају широк спектар домаћина, поготово из групе сисара, али се могу пронаћи на птицама и нешто ређе на појединим врстама гмизаваца (Ћернуј и сар., 2020).

У више европских земаља, **крпељски енцефалитис** (tick-borne encephalitis, ТВЕ) је један од најзначајнијих инфекција централног нервног система. Вирус ТВЕV, као и узрочници жуте грознице, јапанског енцефалитиса и денга вируса, припадају групи флавивируса (Ivanović, 2022).

До данас, позната су три подтипа ТВЕV: далекоисточни, сибирски и европски. Европски сој преноси *I. ricinus*, док далекоисточни и сибирски преноси *I. persulcatus*. Вирус ТВЕV се преноси трансстадијално, из једног развојног стадијума у следећи, али и трансваријално, са женке на јаја. Међутим, опстанак вируса највише зависи од његовог преноса између зараженог крпеља и његовог потенцијалног домаћина (Ivanović, 2022). Сем током исхране крпеља, установљен је и алиментарни пут преноса. Овде се ради о преносу путем непрокуваног млека, или сира, који су направљени од свежег млека козе или овце. До данас, нема забележених описа преноса вируса са човека на човека. Од ТВЕ, годишње на глобалном нивоу оболи око 10.000 људи. Симптоми ове болести су: температура, главобоља, општа слабост, мучнина, болови у леђима и екстремитетима, такорећи, слични су симптомима грипа. Ови симптоми се испољавају у првој фази болести, симптоматску фазу. Након ње долази друга фаза болести, која се јавља само код једне трећине болесника. За ову фазу је карактеристична захваћеност централног нервног система (Randolph, 2008).

Лајмска болест или Лајм борелиоза, може да се јави и код људи, али и код домаћих животиња. Може да се јави без карактеристичних симптома, те је нажалост, често лечена и дијагностификована као нека друга болест. Клинички симптоми, нису специфични, могу изгледати као низ различитих болести, због чега се ова болест назива великим имитатором (Savić-Jevđenić и сар., 2007). Ова болест обично нема смртни исход, али може да изазове много проблема који могу да доведу до смањења продуктивности домаћих животиња, али и болести које прати клиничка слика, код људи, паса и коња. Код људи, обично се јављају симптоми попут грипа, али нажалост, може бити озбиљни и попут Алцхајмерове болести. Код животиња, болест може да изгледа као хронични артритис или пак грозница. Код људи и животиња, уколико се не примени одговарајуће терапија, може да изазове оштећење зглобова, проблеме са срцем и бубрезима, али и неуролошке компликације (Ivanović, 2022). У нашим регионима, крпељ врсте *I. ricinus* је потврђени вектор узročника Лајмске болести – спирохете *Borrelia burgdorferi* (Ivanović и сар., 2022).

Ерлихиоза / анаплазмоза оба обољења, иако су проузрокована различитим узročницима, имају сличне симптоме и лабораторијске налазе. Хуману моноцитну ерлихиозу изазива *Ehrlichia chaffeensis*, док хуману гранулоцитну анаплазмозу изазива *Anaplasma phagocytophilum*. Већина оболелих од ерлихиозе у Европи имају блажу клиничку слику, а први симптоми се јављају након 7 до 30 дана. Симптоми су слични грипу, а ређе се може јавити и осип (Krajinović и сар., 2018). Анаплазмозу карактерише неспецифична клинична слика, која подсећа на инфекцију горњих дисајних путева. У зависности од имунолошког стања зараженог, зависи и тежина клиничке слике (Ivanović и сар., 2022).

Бабезиозу проузрокује протозоа *Babesia spp.* Једна је од најчешћих узročника анималних инфекција широм света. Године 1957. описан је први случај ове болести. У Европи је од доминантног значаја врста *B. divergens* која се примарно налази код говеда, а која даје тежу клиничку слику са леталним исходом од 42%. У нашој земљи постоје ензоотска подручја бабезиозе говеда, коња и оваца. Врста домаћина није довољан критеријум да за идентификацију врсте бабезија, обзиром на то да многе врсте могу да инфицирају различите домаћине. Пример је *B. microti*, која може да зарази човека и глодаре. Бабезија може да се јави код великог броја врста кичмењака.. Бабезиоза је још позната и као крпељска грозница паса, а често се јавља истовремено са Лајмском болешћу (Mitrović и сар. 2004).

2.4 КАКО СЕ ЗАШТИТИТИ ОД КРПЕЉА

Да би се успешно заштитили од крпеља, неопходно је да избегавамо станишта у којима се крпељи могу срести. То су пре свега високе траве, шуме, ливаде и пашњаци. Уколико боравимо у природи, неопходно је носити дуге рукаве, а ногавице упасати у чарапе. Препоручљиво је носити одећу светлије боје, како би се крпељи на време уочили. Препоручљиво је такође и коришћење репелената, који ће одбити крпеља и спречити га да се закачи. Репеленти могу бити у облику спреја, стика, креме, прашка. Такође, веома је важно заштитити и љубимце неким од репелената током боравка у природи.

Након повратка из природе, врло је важно да се прегледамо од потенцијалног присуства крпеља. Посебно обратити пажњу на препоне, предео испод колена, испод пазуха, предео испод груди, леђа, али и косу и уши, односно иза ушију.

Уколико имамо двориште, неопходно је водити рачуна о хигијени истог. Неопходно је едовно косити траву, уклањати смеће и оплао лишће, а по потреби се могу примењивати и одређена хемијска средстава – акарициди, који су намењени сузбијању крпеља.

2.5 АКАРИЦИДНИ ЕФЕКАТ АЗАДИРАКТИНА

Ним (*Azadirachta indica* A.Juss., 1830) је брзорастуће дрво из породице махагонија (*Meliaceae*) (Слика 7.). Цењено је као лековита биљка и као извор органских пестицида. Бележи се да вероватно води порекло са Индијског потконтинента и из сувих области широм јужне Азије. Ова биљка се дуго користи у народној и ајувердској медицини, а такође је у примени и у козметици и органској пољопривреди.

Ним дрво, може да досегне висину од 15 до 30 метара. Поседује сложене, зимзелене листове који опадају током периода екстремних суша. Мали мирисни бели цветови су позиционирани у гроздовима у пазуху листова. Плод је глатка жуто – зелена коштуница, пулпе слатког укуса (Слика 8.). Познато је да се ним обично узгаја из семена, али може да се размножава из корена или из резница. Веома је отпорна и издржљива биљка која расте на каменитим и сиромашним земљиштима. Иако је веома отпорна, не толерише веома влажна станишта, нити превише ниске температуре (<https://www.britannica.com>).

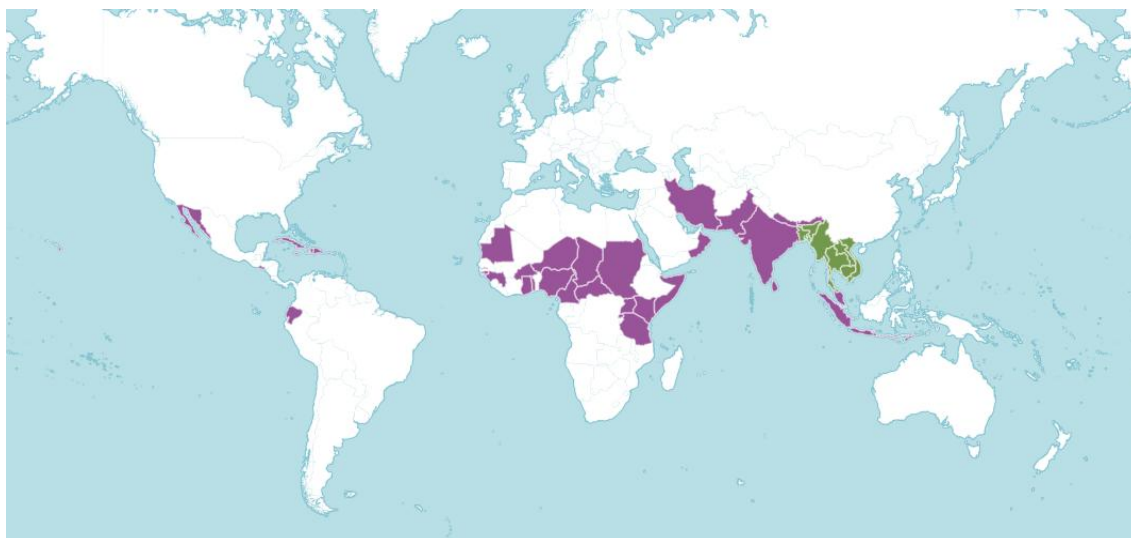


Слика 7. Ним (*Azadirachta indica* A.Juss., 1830)
(извор: <https://powo.science.kew.org/taxon/1213180-2>)



Слика 8. Изглед плода, цвета и листа ним биљке
(извор: www.agroklub.rs/eko-proizvodnja)

Као аутохтона врста, ним расте у тропским регионима попут Индије, Бангладеша, Пакистана и Непала, где се налази у изобиљу (Schmutterer, 1990) (Слика 9.).



Слика 9. Географско распрострањење биљке ним
(извор: <https://powo.science.kew.org/taxon/1213180-2>)

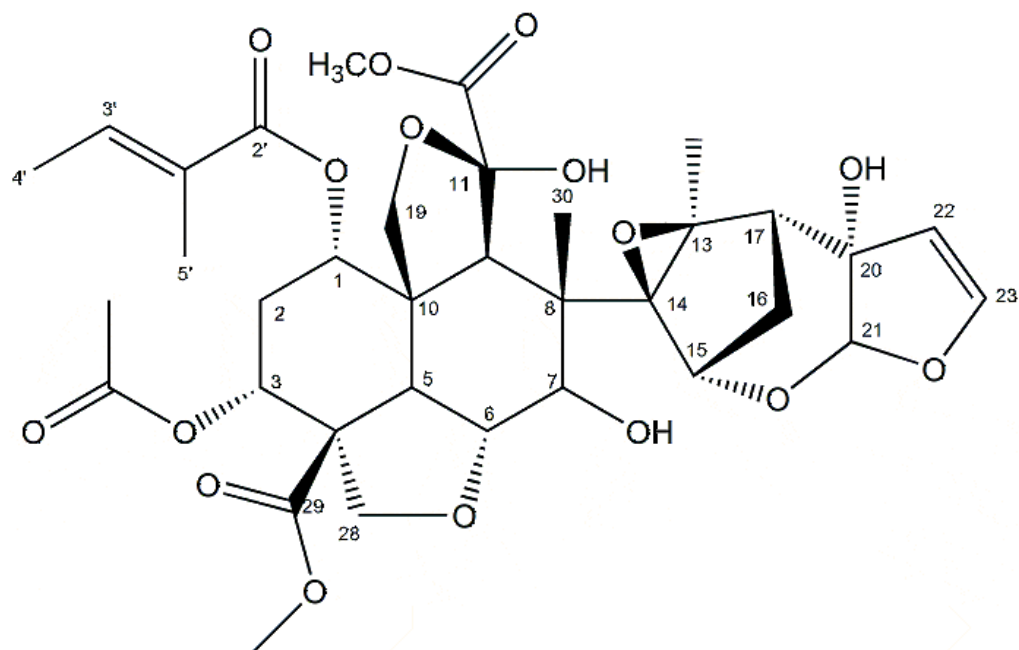
A. indica има широку терапеутску улогу због високог садржаја различитих биоактивних компоненти. Најважнија активна супстанца је азадирактин, а остали су нимболинин, нимбин, нимбидин, нимбидол, натријум-нимбинат, гедунин, саланин и кверцетин. Листови садрже биоактивна једињења као што су нимбин, нимбанен, 6-десацетилнимбинен, нимбандиол, нимболид, аскорбинска киселина, н-хексаконазол, 7-десацетил-7-бензоилазади-радион, 7-десацетил-7-бензоилгедунин, кверцетин и β -ситостерол (Biswas и сар., 2002). Полифенолни флавоноиди изоловани из свежих листова нима показују бактерицидно и фунгицидно својство, а семе садржи високопотентне састојке као што су азадирактин и гедунин (Biswas и сар., 2002). Азадирактин има антиинфламаторну, антиартритичну, антипиретичну, хипогликемијску, антигастричну, фунгицидну, бактерицидну и антитуморску активност. Biswas и сар. (2002) дају преглед различитих терапеутских улога азадирактина и других активних састојака етарског уља биљке ним. Тачан молекуларни механизам деловања састојака које садржи ним у превенцији патогенезе појединих обољења није потпуно истражен, али се сматра да *A. indica* показује терапеутску улогу због богатог извора антиоксиданаса и других биоактивних компоненти (азадирактин, нимболинин, нимбин, нимбидин, саланин и кверцетин) (Biswas и сар., 2002) (Табела 1.).

Табела 1. Важне хемијске компоненте изоловане из семена или листова ним биљке (према Mehlhorn и сар., 2011)

Назив	Хемијска група	Активност
Азадирахтол	Тритерпеноиди	Инхибиција исхране
Мелантриол	Тритерпеноиди	Инхибиција исхране
Азадирон група	Тетранортритерпеноиди	Фунгицидно, инсектицидно, инхибиција исхране
Гедунин група	Тетранортритерпеноиди	Инхибиција исхране, антималярик
Виласинин група	Тетранортритерпеноиди	Инхибиција исхране
Нимбин група	Тетранортритерпеноиди	Инхибиција исхране
Саланин група	Тетранортритерпеноиди	Инхибиција исхране, регулатори раста
Азадирактин и аналози	Тетранортритерпеноиди	Инхибиција исхране, регулатори раста
Нимбион, маргалон	Дитерпеноиди	Антибиотици
Флавоноиди, танини	Не-терпеноиди	Ларвициди, инсектициди

Акарицидно дејство ове биљке се објашњава присуством активног састојка – азадирактина (Слика 10.), који показује токсични ефекат кроз смањивање количине укупних протеина и липида паразитских бескичмењака неопходних за одржавање нормалног животног циклуса и пресвлачења јединки у наредне стадијуме. Према Abdel-Shafy и сар. (2002), установљено је да је екстракт биљке ним веома ефикасан у контроли новоиспиљених и нехрањених ларви крпеља са највишом стопом морталитета (100%) . Слични ефекти су постигнути и забележени при коришћењу других биљних екстраката, попут: *Acanthus ebracteatus* Vahl, *Acorus calamus* L., 1753, *Annona squamosa* L., *Luffa acutangula* (L.) Roxb., *Stemona collinsae* Craib., које су према овим ауторима изазвале већи ларвицидни ефекат, од 90 до 100% (Abdel-Shafy и сар., 2002).

Важно је истаћи, да је ним безопасан по здравље људи и животиња, а токсични ефекат се може оставрити уколико се уље ове биљке користи у већој количини (<https://lekovitasvojestva.com>). Висок степен акарицидног деловања азадирактина потврђен је од стране великог броја аутора: Rembold и сар. (1986), Williams (1993), Sivaramakrishnan и сар. (1996), Benavides и сар. (2001), Abdel-Shafy и Zayed (2002), Handule и сар. (2002), Webb и David (2002); Al-Rajhy и сар. (2003), Garboui и сар. (2006) и Каауа и сар. (2007).



Слика 10. Структурна формула азадирактина (извор: <https://plantaanalytica.com>)

3. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак рада је утврђивање процената акарицидне ефикасности препарата на бази азадирактина – компоненте етарског уља биљке ним (*Azadirachta indica*, A.Juss., 1830) на мужјаке и женке крпеља врсте *Ixodes ricinus* у функцији времена, од момента примене препарата, те након 1, 2, 4 и 8 часова, у односу на пет различитих концентрација (10, 25, 50, 75 и 100%) препарата раствореног у дестилованој води.

Циљ рада је да се у лабораторијским условима утврди проценат акарицидне ефикасности азадирактина, компоненте етарског уља ним биљке на мужјаке и женке крпеља врсте *Ixodes ricinus* у односу на различите концентрације и дужину трајања излагања, статистички обраде и тестирају добијени подаци, као и да се упореде са резултатима других сличних студија.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Прикупљање крпеља за извођење огледа, је вршено у шумама и парковима у околини Новог Сада методом флег-часа (Dantas-Torres и сар., 2013). Метода се заснива на коришћењу памучних тканина димензија 90 x 125 cm (за ниску вегетацију) и 90 x 65 cm (за високу, жбунасту вегетацију, висине од 30 до 100 cm). Сакупљање је вршено док се не прикупи довољан број крпеља који су неопходни за извођење огледа. Сакупљени крпељи су одлагани у пластичне посуде са перфорираним поклопцима како би се обезбедила довољна вентилација, а са комадом вате натопљеном водом како би се спречило исушивање јединки и обезбедили оптимални услови за преживљавање током транспорта до лабораторије и до употребе крпеља у експерименту. Сакупљене врсте крпеља и њихови развојни стадијуми су детерминисани до нивоа врсте на основу идентификационог кључа према Estrada-Pena и сар. (2004). За потребе огледа, издвојене су само адултне јединке крпеља врсте *I. ricinus*.

Верификација акарицидног деловања препарата AZADIROKO NEEM Cake[®] (на бази деривата семена биљке *Azadirachta indica*) вршено је према методама предложеним од стране Abdel-Shafy и Zayed (2002), Sindhu и сар. (2012), Kröber и сар. (2013) и Adenubi и сар. (2018). У огледу су коришћене петри посуде (дијаметра 90x14,5 mm), чије је дно прекривено филтер хартијом, са горње стране постављена памучна газа и са свих страна заштићене парафилмом како би се спречило излажење крпеља. На филтер хартију која се налази у доњем делу петри посуде наноси се 5 ml препарата у различитим концентрацијама, а затим се интродукују крпељи, по пет мужјака и пет женки. За потребе огледа препарат је разблажен дестилованом водом у пет концентрација: 10, 25, 50, 75 и 100% и примењен у три понављања. Контролна група је тестирана употребом дестиловане воде. Јединке крпеља су одржаване у стању гладовања 48 сати пре почетка огледа, у лабораторијским условима при температури од 21 до 23°C, релативној влажности ваздуха од 40 до 50% и са природним

светлосним режимом. Током огледа, угинуће крпеља је констатовано ако након благог додира четкицом нису показали било какав вид реакције или покрета током 60 секунди.

Угинуће крпеља је читавано након једног, два, четири и осам часова од апликације препарата. Акарицидна ефикасност препарата је изражена у процентима према Шнајдер-Орели формули (Puntener, 1981) за одређивање коригованог процента морталитета:

$$M\%_{korigovano} = \frac{M\%_t - M\%_c}{100 - M\%_c} \times 100$$

где је:

$M\%_{korigovano}$ – кориговани проценат смртности (морталитета),

$M\%_t$ – проценат смртности (морталитета) у третираним групама,

$M\%_c$ - проценат смртности (морталитета) у контроли.

Добијени резултати су статистички анализрани ANOVA-ом и post hoc Fisher-овим НЗР тестом коришћењем програма Statistica 14.0.0.15 (TIBCO, Универзитетска лиценца) и приказани табеларно и графички. Статистичка значајност је тумачена као значајна у случају $p < 0,05$, односно високо значајна у случају $p < 0,01$.

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Резултати добијени испитивањем акарицидне ефикасности азадирактина, компоненте етарског уља ним у лабораторијским условима, изражен преко експонирања одређеног броја крпеља у петри посудама различитим концентрацијама препарата (10, 25, 50, 75 и 100%) и очитан у предвиђеним временским интервалима, приказани су у Табели 2. за мужјаке и Табели 3. за женке крпеља врсте *I. ricinus*.

Табела 2. Број уинулих мужјака *I. ricinus* након примене препарата на бази азадирактина

	Време	1 сат			2 сата			4 сата			8 сати			Укупно на крају огледа		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
концентрација	понављање	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	10%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
	25%	0	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	2	2	1
	50%	1	1	0	1	1	0	2	2	3	1	0	1	5	4	4
	75%	1	3	2	2	1	1	2	1	1	0	0	1	5	5	5
	100%	3	4	3	1	1	2	1	0	0	0	0	0	5	5	5

Табела 3. Број уинулих женки *I. ricinus* након примене препарата на бази азадирактина

	Време	1 сат			2 сата			4 сата			8 сати			Укупно на крају огледа		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
концентрација	понављање	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	10%	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2
	25%	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	2	2	1
	50%	1	1	1	1	1	0	2	1	2	1	1	1	5	4	4
	75%	1	2	2	2	2	1	2	1	2	0	0	0	5	5	5
	100%	4	4	3	1	1	2	0	0	0	0	0	0	5	5	5

Резултати овог огледа показују високу акарицидну ефикасност препарата на бази азадирактина – компоненте старског уља биљке ним и код мужјака и код женки крпеља врсте *I. ricinus* када су тестиране више концентрације, од 75 и 100%. При овим концентрацијама уочен је морталитет од 100% у свим понављањима и код мужјака и код женки већ након четири сата од примене препарата и интродукције крпеља.

Изречунат кориговани проценат морталитета преко Шнајдер-Орели формуле (Puntener, 1981) приказан је на Графику 1. за мужјаке и на Графику 2. за женке крпеља врсте *I. ricinus*.

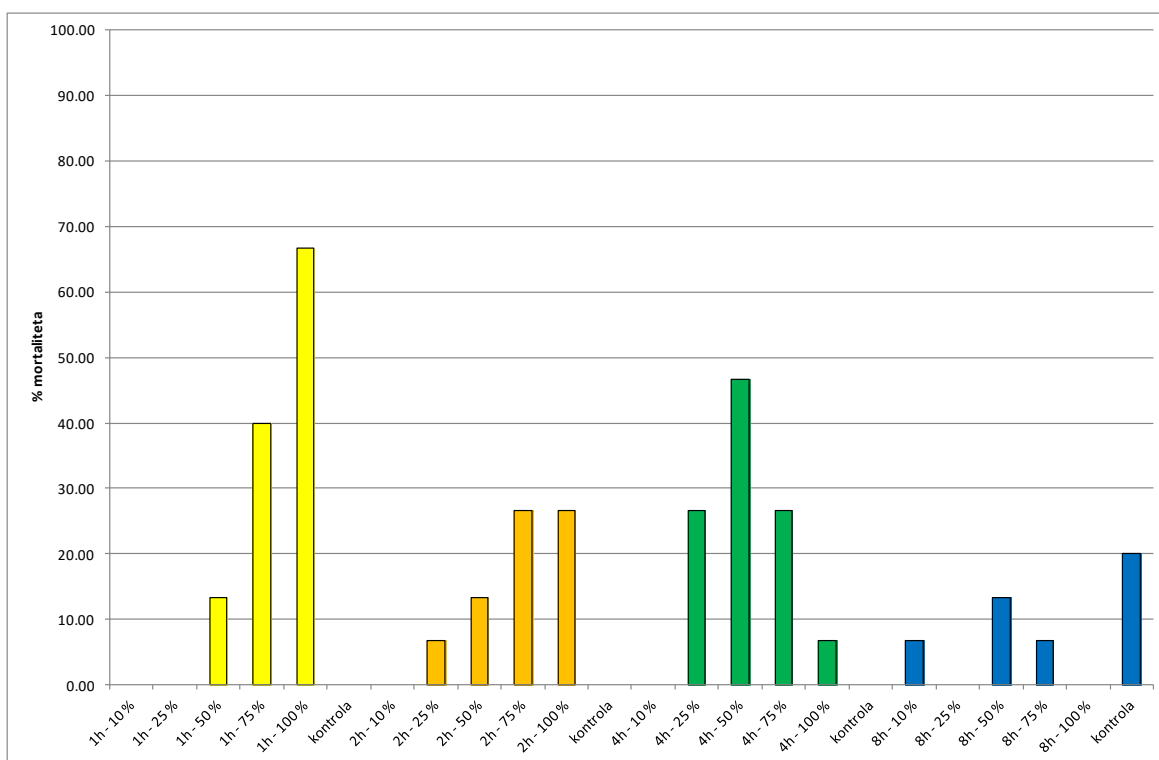


График 1. Кориговани проценат морталитета мужјака крпеља врсте *I. ricinus* након примене препарата на бази азадирактина

Највиши проценат морталитета мужјака *I. ricinus*, од 66,67%, евидентиран је један сат након примене 100% концентрисаног препарата на бази азадирактина. Након примене препарата у концентрацији од 10% није констатовано угинуће мужјака, осим једне јединке, након осам часова трајања огледа, што је највероватније узроковано физиолошком исцрпљеношћу тестираног организма. При концентрацијама од 25% препарата констатована је смртност од свега 30% мужјака.

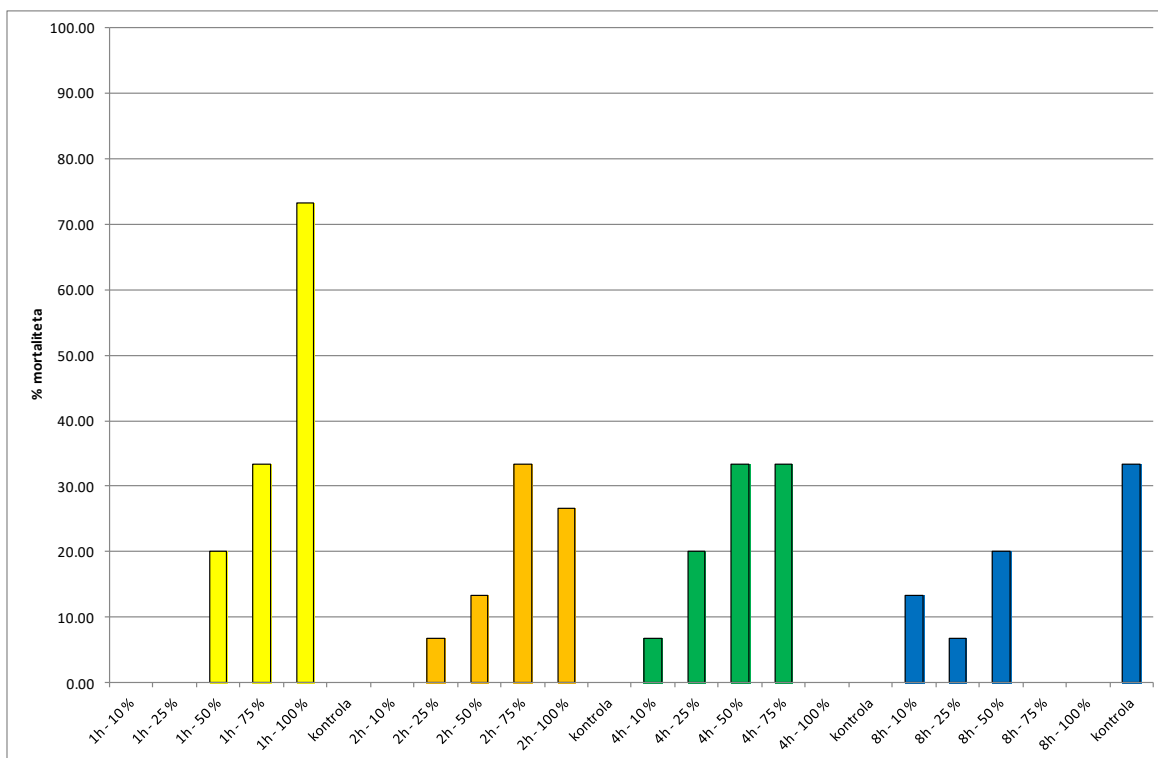


График 2. Кориговани проценат морталитета женки крпеља врсте *I. ricinus* након примене препарата на бази азадирактина

Након примене 50% разблаженог препарата, констатује се укупни морталитет мужјака од 86,67% у последњем читавању, тј. након осам часова, док у истом временском интервалу, 75% растворен препарат показује 100% морталитет.

Слично мужјацима, и код женки се највиши проценат морталитета констатује један сат након примене 100% концентрисаног препарата на бази азадирактина (73,33%). Међутим, за разлику од мужјака, при концентрацијама од 75% препарата на бази азадирактина, моратлитет од 100% се констатује већ након четири сата од апликације препарата. При примени раствора од 50 и 75% уочен је исти проценат морталитета као код мужјака, тј. 86,67% након осам часова и 100% након четири сата. Препарат разблажен до 10% своје концентрације показао је врло ниску акарицидну ефикасност, од свега 20%.

У свим контролним групама проценат морталитета је износио 0% све до осмог сата извођења огледа, када је код мужјака констатован морталитет од 20%, а код женки 33,33% што се може објаснити физиолошком исцрљеношћу тестираних јединки.

Применом једнофакторијалне анализе варијансе (АНОВА) и Fisher-овог NZR post hoc теста, израчунато је да постоји висока статистичка значајност између броја

угинулих јединки као зависно променљиве и концентрације примењеног препарата као независног предиктора: ($p=0,000001$ за $p<0,01$). Остале независне детерминанте као што су пол крпеља, време оцене огледа или број понављања нису показале постојање статистички значајних разлика.

Примена Fisher-овог теста најмање значајних разлика (НЗР), селектује постојање две хомогене групе са сличним резултатима: прву, којој одговара угинуће констатовано у контролној групи и концентрацијама препарата на бази азадирактина од 10 и 25%, и другу, при концентрацијама препарата од 50, 75 и 100% (График 3.).

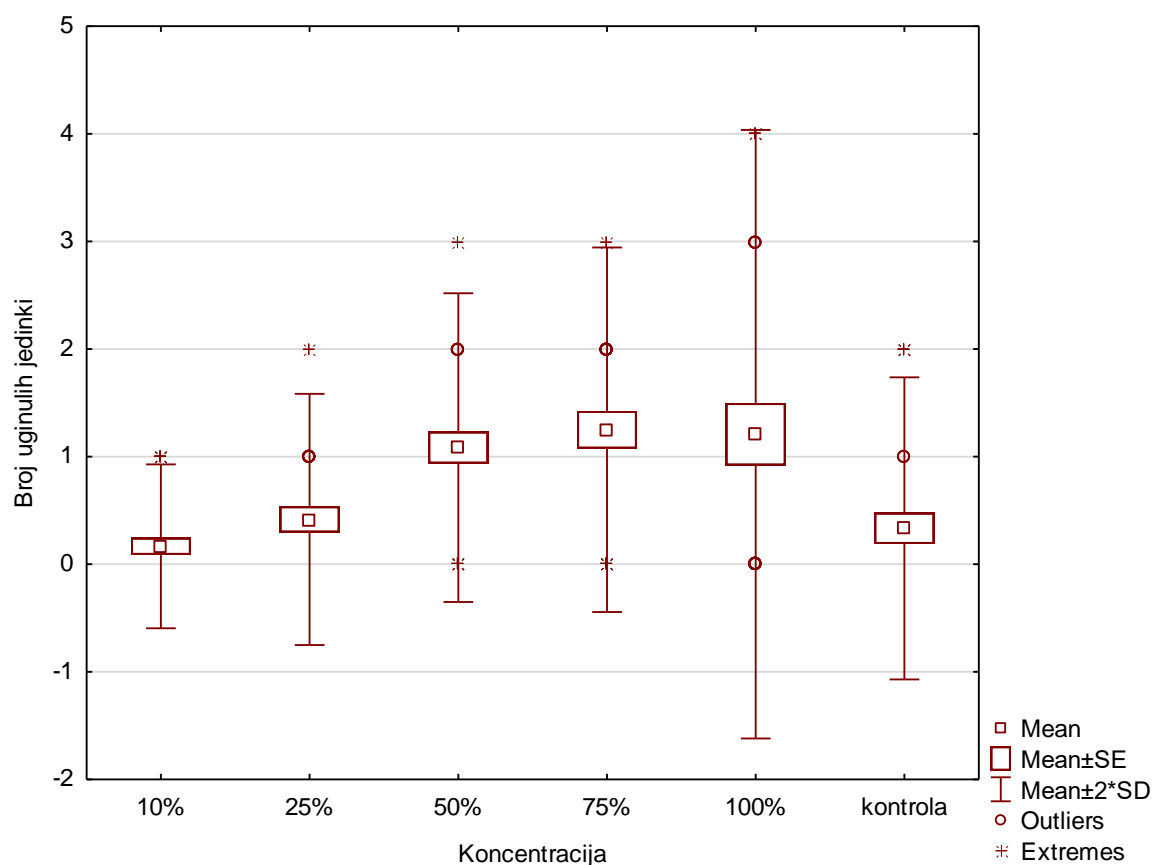


График 3. Број угинулих јединки крпеља врсте *I. ricinus* у зависности од примењене концентрације препарата на бази азадирактина

Добијени подаци су у складу са резултатима које су објавили Handule и сар. (2002) према којима је етарско уље биљке ним у концентрацији од 40% било најефикасније и са највишом токсичношћу, док је концентрација од 10% показала најмању токсичност за ларве крпеља врсте *Rhipicephalus pulchellus* (Gerstäcker, 1873). Више концентрације овог етарског уља показале су виши проценат морталитета јединки

врсте *R. pulchellus* у односу на ниже концентрације, што је слично нашим резултатима где су више концентрације имале и веће акарицидно деловање на адултне јединке *I. ricinus*. Исти аутори препоручују да је концентрација од 30% етарског уља биљке ним најефикаснија и најекономичнија у односу на остале испитиване концентрације.

Према Al-Rajhy и сар. (2003), азадирактин је веома моћан инсектицид који утиче на исхрану, развој и пресвлачење ларви инсеката различитих редова при веома ниским концентрацијама, међутим ниске концентрације овог уља или немају ефекат или је он занемарљив када су у питању тестови на крпељима. Како наводе Handule и сар. (2002) азадирактин омета метаморфозу крпеља, при чему они угињавају, тако да нема репродукције и појаве следеће генерације, што је основа његовог акарцидног, овоцидног и ларвицидног деловања код различитих врста крпеља.

Према Каауа и сар. (2007), азадирактин, главни биоактивни састојак ним семена, утиче на хеморецепторе артропода, спречавајући исхрану и овипозицију, као и на мејозу, физиологију мишића, функцију дигестивног тракта и биолошких ритмова. Његов примарни начин деловања је кроз инхибицију ослобађања проторакотропних хормона и алатропина. Блокадом ових морфогених пептидних хормона нарушава се секреција егдизона и јувенилног хормона у хемолимфи, што утиче на метаморфозу, репродукцију и развој.

Поред свог израженог акарицидног деловања, препарати на бази азадирактина имају и изражено репелентно деловање према крпељима различитих врста. Како наводи Благојевић (2021), етарско уље на бази азадирактина има више од 50% репелентне ефикасности на мужјаке *I. ricinus* након три минута од примене, а опада са временом када су све испитиване концентрације у питању (10, 25, 50, 75 и 100%). Осам сати након апликације препарата, концентрације од 50% и 75% имају репелентно деловање од 50% и 56,67%, док чисто етарско уље (100%) показује репелентност од 66,67% на мужјаке *I. ricinus* (Благојевић, 2021).

Abdel-Shafy и Zayed (2002) су доказали да високе концентрације азадирактина у препаратима имају овицидно деловање на оплођена јаја крпеља врсте *Hyalomma anatolicum excavatum* Koch, 1844, као и акарицидно дејство на адulte који нису усвојили крвни оброк у првих 24 сата од апликације препарата. Choudhury (2009) истиче да азадирактин има и ларвицидно дејство које зависи од концентрације и времена примене препарата. При концентрацији етарског уља биљке ним од 0% (контрола) није регистровано угинуће, док је индекс морталитета од 100% уочен при

концентрацијама од 20, 40, 60, 80 и 100% након 24 сата код ларви врсте *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844).

Сличан проценат морталитета који је констатован у овом истраживању код оба пола адултних јединки крпеља врсте *I. ricinus* (График 4.) се подудара са наводима Touré и сар. (2012), који у својој судији након примене препарата на бази азадирактина наводе да нису констатовали постојање статистички значајних разлика у погледу морталитета између мужјака и женки крпеља врсте *Am. variegatum*. Исти аутори наводе да је највиши проценат морталитета (97,8%) констатован при примени препарата на бази азадирактина у концентрацији од 30%.

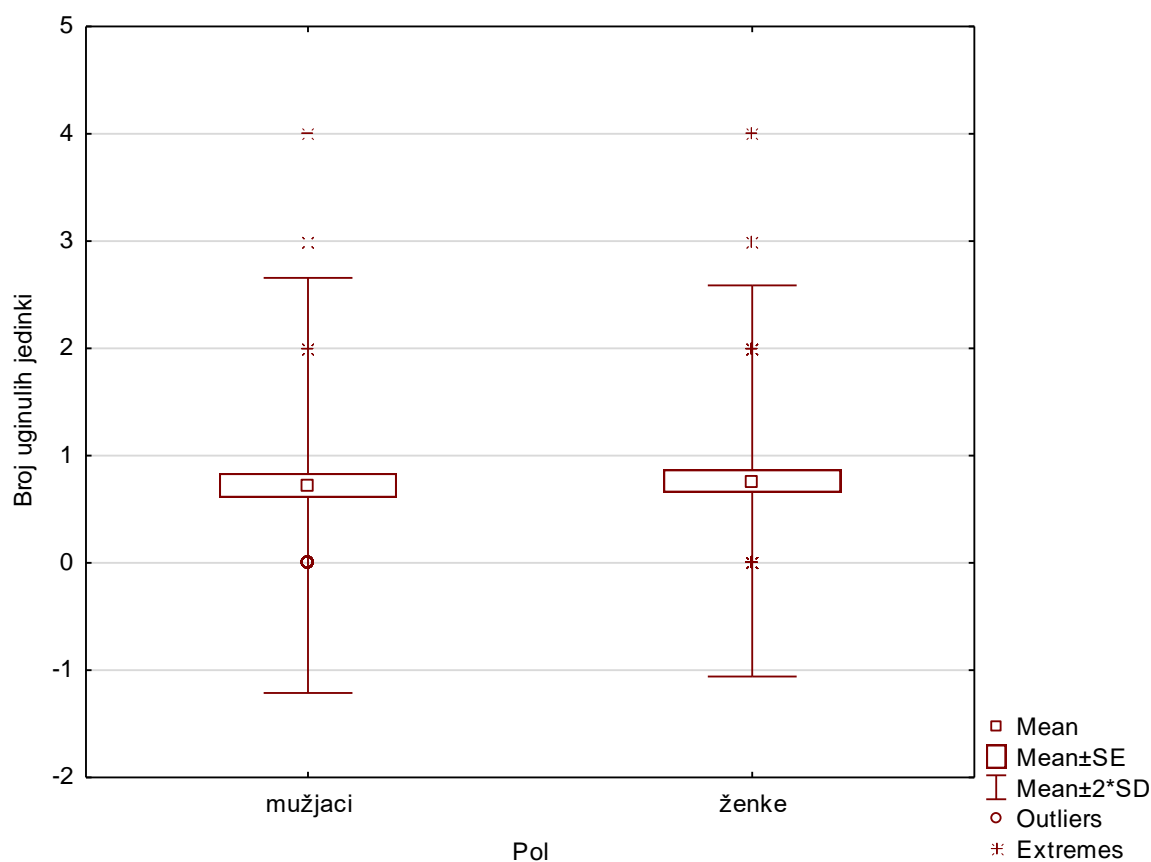


График 4. Број угинулих јединки крпеља врсте *I. ricinus* у зависности од пола јединки

Каауа и сар. (2007) наводе да је азадирактин имао акарицидно деловање на насисане и ненасисане ларве, нимфе и адултне женке врсте *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794), где се морталитет повећавао са повећањем концентрације азадирактина у раствору. Уз то, етарско уље семена нима значајно је смањило бројност испиљених јаја *R. appendiculatus* и *B. decoloratus*. Редукција је била виша код јаја која су

третирана са неразређеним (100%) у односу на разређено уље (25%) (Каауа и сар., 2007).

Према наводима Mehlhorn и сар. (2011), водени раствори препарата на бази азадирактина имају снажно акарицидно деловање и доводе до угинућа крпеља из родова *Ixodes* и *Rhipicephalus* у року од 5 часова од апликације препарата, било да се препарат примењује прскањем или контактном, најчешће преко екстремитета крпеља, што се подудара са резултатима добијеним у овом истраживању (График 5.). Како наводе Mehlhorn и сар. (2011), чак и примена раствора на бази азадирактина у односу 1:66 доводи до угинућа крпеља из рода *Ixodes*, док при примени ове дозе, крпељи рода *Rhipicephalus* угињавају тек након што се препарат директно прскањем нанесе на њихову дорзалну површину.

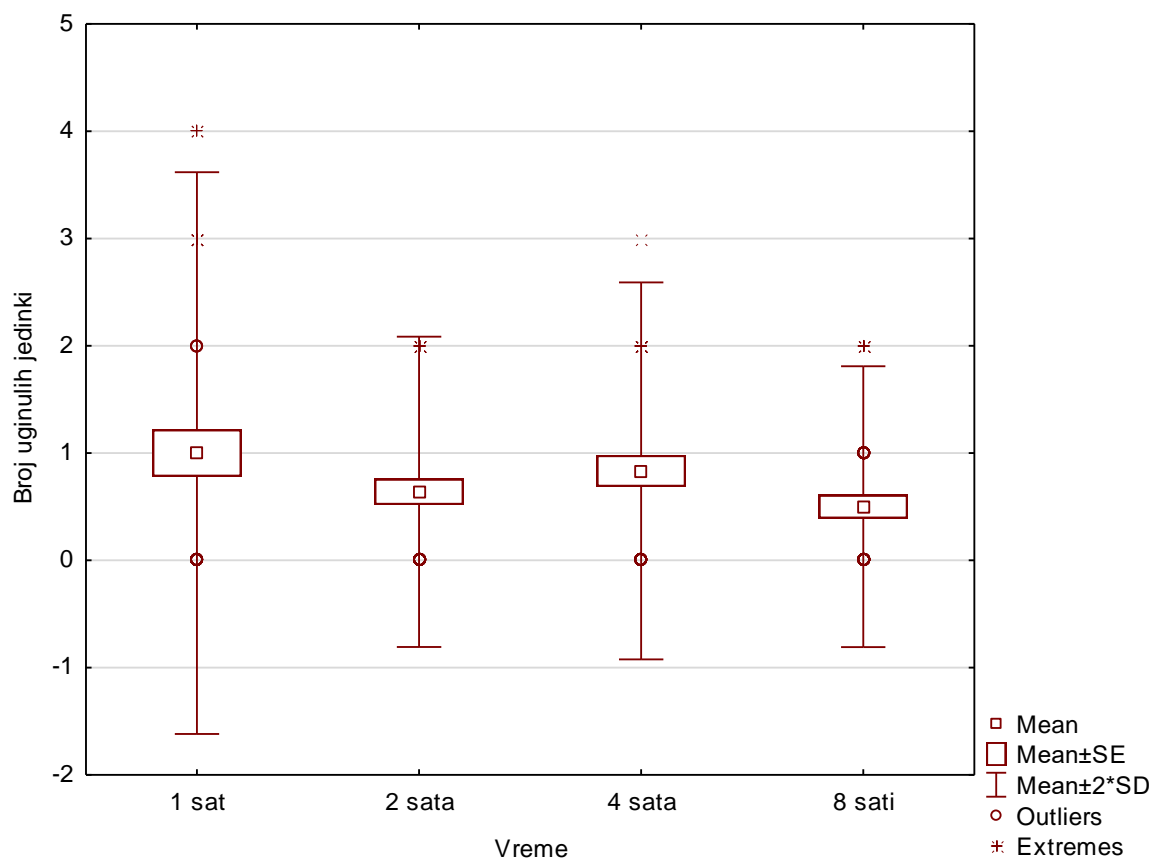


График 5. Број угинулих јединки крпеља врсте *I. ricinus* у зависности од времена читавања резултата

Према наводима Choudhury (2009) старско уље азадирактина се са сигурношћу може користити за сузбијање крпеља на животињама, јер нема регистрованих нежељених

дејстава. Штавише, етарско уље ним биљке поседује фунгицидно и бактерицидно својство, што може да делује на секундарне инфекције узроковане убодом крпеља. Како наводе Webb и David (2002), етарско уље нима са својом компонентом азадирактином може да се користити и за сузбијање крпеља на стоци, јер је јефтин и природан акарицид који такође може да има значајну улогу у смањењу неселективне употребе синтетичких хемикалија које су потенцијално опасне по здравље човека, животиња и животну средину. Каауа и сар. (2007) истичу да се примена етарског уља азадирактина може вршити и на пашњацима и ливадама за испашу стоке уз помоћ прскалица, што би смањило инфестацију домаћих животиња крпељима и другим ектопаразитима и потенцијално преношење патогена који угрожавају здравље људи и домаћих животиња.

6. ЗАКЉУЧАК

- Резултати овог истраживања показују високу акарицидну ефикасност препарата на бази азадирактина – компоненте етарског уља биљке ним (*Azadirachta indica* A.Juss., 1830) и код мужјака и код женки крпеља врсте *Ixodes ricinus* када су тестиране више концентрације, од 75 и 100%. При овим концентрацијама уочен је морталитет од 100% у свим понављањима и код мужјака и код женки већ након четири сата од примене препарата и интродукције крпеља.
- Највиши проценат морталитета мужјака *I. ricinus*, од 66,67%, евидентиран је један сат након примене 100% концентрисаног препарата на бази азадирактина.
- Након примене препарата у концентрацији од 10% није констатовано угинуће мужјака, осим једне јединке, након осам часова трајања огледа, што је највероватније узроковано физиолошком исцрпљеношћу тестираног организма.
- При концентрацијама од 25% препарата констатована је смртност од свега 30% мужјака.
- Након примене 50% разблаженог препарата, констатује се укупни морталитет мужјака од 86,67% у последњем читавању, тј. након осам часова, док у истом временском интервалу, 75% растворен препарат показује 100% морталитет.
- Код женки крпеља врсте *I. ricinus* највиши проценат морталитета се констатује један сат након примене 100% концентрисаног препарата на бази азадирактина (73,33%).
- При концентрацијама од 75% препарата на бази азадирактина, моратлитет женки *I. ricinus* од 100% се констатује већ након четири сата од апликације препарата.

- При примени раствора од 50 и 75% уочен је исти проценат морталитета као код мужјака, тј. 86,67% након осам часова и 100% након четири сата.
- Препарат разблажен до 10% своје концентрације показао је врло ниску акарицидну ефикасност, од свега 20%.
- У свим контролним групама проценат морталитета је износио 0% све до осмог сата извођења огледа, када је код мужјака констатован морталитет од 20%, а код женки 33,33% што се може објаснити физиолошком исцрљеношћу тестираних јединки.
- Применом једнофакторијалне анализе варијансе (АНОВА) и Fisher-овог теста, израчунато је да постоји висока статистичка значајност између броја уинулих јединки као зависно променљиве и концентрације примењеног препарата као независног предиктора. Остале независне детерминанте као што су пол крпеља, време оцене огледа или број понављања нису показале постојање статистички значајних разлика.
- Примена Fisher-овог теста најмање значајних разлика (НЗР), селекује постојање две хомогене групе са сличним резултатима: прву, којој одговара уинуће констатовано у контролној групи и концентрацијама препарата на бази азадирактина од 10 и 25%, и другу, при концентрацијама препарата од 50, 75 и 100%.
- Етраско уље изоловано из семена биљке ним са својом компонентом азадирактином може да се користити и за сузбијање крпеља, јер је економски исплатив и природан акарицид који може да допринесе смањењу неселективне употребе синтетичких хемикалија које су потенцијално опасне по здравље човека, животиња и животну средину.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Shafy S., Zayed A.A. (2002): In vitro acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 106: 89-96.
- Adenubi O.T., McGaw L.J., Eloff J.N., Naidoo V. (2018): *In vitro* bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Veterinary Parasitology*, 254: 160-171.
- Alkische A.A., Peterson A.T., Samy A.M. (2017): Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One*, 12 (12): e0189092.
- Al-Rajhy D.H, Alahmed A.M, Hussein H.I., Kheir S.M. (2003): Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science*, 59: 1250-1254.
- Benavides O.E., Hernandez M.G., Romero N.A., Castro A.H., Rodriguez B.J.L. (2001): Preliminary evaluation of neem (*Azadirachta indica*) extracts as alternative for cattle tick *Boophilus microplus* control. *Revista Colombiana de Entomología*, 27: 1-8.
- Biswas K., Chattopadhyay I., Banerjee R.K., Bandyopadhyay U. (2002): Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science Bangalore*, 82 (11): 1336-1345.
- Blagojević N. (2021): Repelentno delovanje azadiraktina na mužjake *Ixodes ricinus*. Diplomski rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Cayol C., Koskela E., Mappes T., Siukkola A., Kallio E.R. (2017): Temporal dynamics of the tick *Ixodes ricinus* in northern Europe: epidemiological implications. *Parasites & Vectors*, 10 (1): 16.
- Černý J., Lynn G., Hrnková J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. (2020): Management Options for *Ixodes ricinus* - Associated Pathogens: A Review of

- Prevention Strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (6): 1830.
- Choudhury M.K. (2009): Toxicity of Neem Seed Oil against the Larvae of *Boophilus decoloratus*, A One-Host Tick In Cattle. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71 (5): 562-563.
 - Dantas-Torres F., Paolo Lia R., Capelli G., Otranto D. (2013): Efficiency of flagging and dragging for tick collection. *Experimental and Applied Acarology*, 61(1): 119-127.
 - Đukić N., Horvatović A., Kataranovski D., Maletin S., Matavulj M., Pujin V., Sekulić R., Jurišić A. (2018): *Poljoprivredna zoologija*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
 - Estrada-Peña A., Bouattour A., Camicas J.L., Walker A.R. (2004): *Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region. A guide to identification of species*. University of Zaragoza. Spain.
 - Estrada-Peña A., Venzal J.M., Sánchez Acedo C. (2006): The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*, 20 (2): 189-197.
 - Garboui S.S., Jaenson T.G.T., Palsson K. (2006): Repellency of MyggA[®] Natural spray (para-menthane-3,8-diol) and RB86 (neem oil) against the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the field in east-central Sweden. *Experimental and Applied Acarology*, 40: 271-277.
 - Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada-Peña A., Horak I.G. (2014): *The Hard Ticks of the World*. Springer, Dordrecht Heidelberg New York London.
 - Handule I.M., Ketavan C., Gebre S. (2002): Toxic Effect of Ethiopian Neem Oil on Larvae of Cattle Tick, *Rhipicephalus pulchellus* Gerstaecker. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, 36: 18-22.
 - <https://lekovitasvojtva.com>, pristupljeno 26.01.2024.
 - <https://www.britannica.com>, pristupljeno 24.01.2024.
 - Huđ A. (2018): Krpelji (Ixodida) kao vektori različitih uzročnika bolesti. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

- Ivanović I. (2014): Prevalencija zaraženosti krpelja vrste *Ixodes ricinus* uzročnikom *Borrelia burgdorferi* u šumskim ekosistemima. Master rad, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Ivanović I. (2022): Monitoring i vektorski potencijal krpelja (Acari: Ixodidae) Fruške gore - procena rizika za zdravlje ljudi i životinja. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Ivanović I., Stošić M.Ž., Sabljčić E.R., Kišek T.C., Špik V.C., Popović A., Savić S. (2022): Ecology and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sl in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks. *Acta Veterinaria Hungarica*, 70 (1): 15-23.
- Jongejan F., Uilenberg G. (2004): The global importance of ticks. *Parasitology*, 129: Suppl:S3-14.
- Kaaya G.P., Saxena R.C., Gebre S. (2007): The potential of neem products for control of economically-important African ticks. *Biosciences, Biotechnology Research Asia*, 4 (1): 95-104.
- Kjær L.J., Soleng A., Edgar K.S., Lindstedt H.E.H., Paulsen K.M., Andreassen Å.K., Korslund L., Kjelland V., Slettan A., Stuen S., Kjellander P., Christensson M., Teräväinen M., Baum A., Klitgaard K., Bødker R. (2019): Predicting and mapping human risk of exposure to *Ixodes ricinus* nymphs using climatic and environmental data, Denmark, Norway and Sweden, 2016. *Eurosurveillance*, 24 (9): 1800101.
- Krajinović V., Krajinović C.L. (2018): Krpeljima prenosive bolesti – globalna prijetnja zdravlju. *Infektologija*, XXIV (130/131): 332-340.
- Kröber T., Bourquin M., Guerin P.M. (2013): A standardised *in vivo* and *in vitro* test method for evaluating tick repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107: 160-168.
- Laaksonen M., Sajanti E., Sormunen J.J., Penttinen R., Hänninen J., Ruohomäki K., Sääksjärvi I., Vesterinen E.J., Vuorinen I., Hytönen J., Klemola T. (2017): Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerging Microbes & Infections*, 6 (5): e31.
- Lalošević V., Ivetić J. (2011): Iksodidni krpelji nekih domaćih životinja sa teritorije Kikinde. *Letopis naučnih radova*, 1: 136-143.

- Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdákóvá M., Estrada-Peña A., George J., Golovljova I., Jaenson T.G., Jensen J., Jensen P.M., Kazimírová M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. (2013): Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, 6: 1.
- Medlock J.M., Pietzsch M.E., Rice N., Jones L., Kerrod E., Avenell D., Los S.O., Ratcliffe N.A., Leach S., Butt T.M. (2008): Investigation of Ecological and Environmental Determinants for the Presence of Questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on Gower, South Wales. *Journal of medical entomology*, 45 (2): 314-325.
- Mehlhorn H., Al-Rasheid K.A.S., Abdel-Ghaffar F. (2011): The Neem Tree Story: Extracts that Really Work. U *Nature Helps... How Plants and Other Organisms Contribute to Solve Health Problems*, Mehlhorn H. (ed), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 77-109.
- Mitrović S., Krnjačić – Zec I., Arsić – Arsenijević V., Džamić A., Radonjić I (2004): Humana babezioza – nova saznanja. *Medicinski pregled*, 57 (7-8): 349-353.
- Omeragić J. (2011). Ixodid ticks in Bosnia and Herzegovina. *Experimental and Applied Acarology*, 53: 301-309.
- Puntener W. (1981): *Manual for field trials in plant protection*. In *Agricultural Division*, 2nd ed.; Ciba-Geigy Limited: Basel, Switzerland.
- Randolph S.E. (2008): Tick-borne encephalitis incidence in Central and Eastern Europe: multi-factorial environmental and socio-economic causes. *Microbes and Infection*, 10: 209–216.
- Rembold H., Forster H., Czoppoelt, C.H. (1986): Structure and biological activity of Azadirachtins A and B. Proceedings of 3rd International Neem Conference, Nairobi, Kenya, pp. 149-160
- Rizzoli A., Rosà R., Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H., Tagliapietra V., Beninati T., Neteler M., Genchi C. (2004): *Ixodes ricinus*, malattie trasmesse e reservoirs [*Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs]. *Parassitologia*, 46 (1-2): 119-22.
- Roce A. (2017): Monitoring tvrdih krpelja (fam. Ixodidae) na području Parka Maksimir. Diplomski rad, Univerzitet u Zagrebu, Zagreb.

- Savić-Jevđenić S., Grgić Ž., Vidić B., Petrović A. (2007): Lyme Disease – The Great Imitator. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 23 (5-6-2): 215-221.
- Schmutterer H. (1990): Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35: 271-297.
- Sindhu Z., Jonsson N., Iqbal Z. (2012): Syringe test (modified larval immersion test): a new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 188 (3-4): 362-367.
- Sivaramakrishnan S., Kumar N.S., Jeyabalan D., Babu R., Raja N.S., Murugan K. (1996): The effect of mixtures of neem, eucalyptus and pongamia oils on the mortality and biochemical profiles of the tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Indian Journal of Environment and Toxicology*, 6: 85-86.
- Touré A., Maranga R., Hassanali A., Kubasu S., Osir E. O., Nyandat E. (2012): Effects of exposing adults of *Amblyomma variegatum* to Neem cake extracts in traps baited with semiochemicals under semi –laboratory conditions. *Journal of Agriculture, Science, and Technology*, 14 (2): 68-76.
- Webb E.C., David M. (2002): The efficacy of neem seed extract (*Azadirachta indica*) to control tick infestation in Tswana, Simmentaler and Brahman cattle. *South African Journal of Animal Science*, 32: 1-6.
- Williams L.A.D. (1993): Adverse effect of *Artocarpus altilis* park and *Azadirachta indica* (A. Juss) on the reproductive physiology of the adult female tick, *Boophilus microplus* (Canset). *Invertebrate Reproduction & Development*, 23 (2-3): 159-164.

8. ПРИЛОГ

ИЗВОРИ СЛИКА:

Слика 1. Обичан крпељ - *Ixodes ricinus* (извор: <https://pixabay.com>)

Слика 2. А) Ixodidae, В) Argasidae, С) Nuttalliellidae (извор: www.wikipedia.org)

Слика 3. Грађа усног апарата тврдих крпеља (извор: <https://ticks.rutgers.edu>)

Слика 4. Стадијуми крпеља током циклуса развића (извор: www.zzjzvpz.hr)

Слика 5. Животни циклус крпеља (извор: www.zzjzpirot.org.rs)

Слика 6. Распрострањеност врсте *I. ricinus* (извор: www.ecdc.europa.eu)

Слика 7. Ним (*Azadirachta indica* A.Juss., 1830) (извор: <https://powo.science.kew.org/taxon/1213180-2>)

Слика 8. Изглед плода, цвета и листа ним биљке (извор: www.agroklub.rs/eko-proizvodnja)

Слика 9. Географско распрострањење биљке ним (извор: <https://powo.science.kew.org/taxon/1213180-2>)

Слика 10. Структурна формула азадирактина (извор: <https://plantaanalytica.com>)