

3
4
5
6 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE
7
8

9
10 I PODACI O KOMISIJI:

11
12 1. Datum i naziv organa koji je imenovao Komisiju:

13
14 Dana 20.02.2019. godine, 192. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta
15 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
16

17
18 2. Sastav Komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
19 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
20 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:
21

- 22
23 1. **Dr Miroslav Valčić**, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti
24 pčela i sviloprelja, 2010. godina, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu -
25 **mentor**.
26
27 2. **Dr Snežana Tomanović**, naučni savetnik, Medicinska entomologija, 2018. godina,
28 Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu - **mentor**.
29
30 3. **Dr Sonja Radojičić**, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti
31 pčela i sviloprelja, 2011. godina, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
32
33 4. **Dr Duško Ćirović**, docent, Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine, 2010.
34 godina, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu.
35

36
37 II PODACI O KANDIDATU:

38
39 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

40
41 Ratko, Radenko, Sukara
42

43 2. Datum rođenja, opština, Republika:

44
45 07.11.1987. godine, Jajce, Bosna i Hercegovina
46

47 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

48
49 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:
50

51
52 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

53
54
55 „Epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima
56 prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije“
57

1 **IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,**
2 **grafikona i sl.):**
3

4 Doktorska disertacija kandidata, doktora veterinarske medicine (dr. vet) Ratka Sukare,
5 napisana je na 173 strane kompjuterski obrađenog teksta a čine je poglavlja: Uvod (3 strane),
6 Pregled literature (51 strana), Cilj i zadaci istraživanja (2 strane), Materijal i metode (17
7 strana), Rezultati (27 strana), Diskusija (25 strana), Zaključci (3 strane), Literatura (52 strane).
8 Na početku se nalaze Zahvalnica, Posveta, Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku
9 kao i Sadržaj doktorske disertacije, dok se na kraju nalaze Biografija kandidata, Izjava o
10 autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju. U
11 okviru doktorske disertacije nalaze se ukupno 23 slike, 17 tabela i 13 grafikona.
12
13

14 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
15 **svakog poglavlja disertacije: uvoda - do 250 reči, pregleda literature - do 500 reči, cilja i**
16 **zadataka istraživanja - nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
17 **nije ograničeno, diskusije - do 100 reči, spiska referenci - navesti broj referenci u**
18 **doktorskoj disertaciji):**
19
20

21 U poglavlju **Uvod** kandidat navodi da je poslednjih decenija povećano ineteresvanje naučne
22 javnosti za izučavanje zoonoza čiji se uzročnici prenose vektorima jer se ove bolesti danas
23 javljaju u regionima sveta u kojima do sada nisu bile prisutne ili se javljaju učestalije na
24 prostorima gde su se pojavljivale sporadično. Istaknuta je na prvom mestu veza povećane
25 incidencije ovih bolesti sa globalnim klimatskim promenama koje dovode do širenja areala
26 krpelja, komaraca, flebotomina, i drugih grupa insekata koje mogu da posluže kao vektori
27 uzročnicima, kao i sa promenama u dinamici populacija pojedinih vrsta kičmenjaka koje
28 predstavljaju potencijalne domaćine rezervoare. Kao značajan za sagledavanje
29 kompleksnosti činilaca koji determinišu epizootologiju i epidemiologiju vektorski prenosivih
30 bolesti, opisan je koncept „jedno zdravlje“ (eng. One Health) koji prepoznaje povezanost ljudi,
31 životinja i okoline i podrazumeva interdisciplinarni pristup u rešavanju zdravstvenih problema.
32 Naglašen je značaj istraživanja divljih kanida sa aspekta javnog zdravlja i ukazana potreba za
33 njihovim kontinuiranim epizootiološkim nadzorom u cilju prevencije rizika po zdravlje ljudi i
34 životinja. Kandidat navodi da je predmet istraživanja doktorske disertacije bio da se sagleda
35 epizootiološko-epidemiološki značaj šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima prenosivih
36 zoonoza na teritoriji Republike Srbije kroz molekularnu detekciju i identifikaciju vrsta u okviru
37 patogenih rodova: *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella*
38 spp., *Bartonella* spp., *Leishmania* spp., te vrsta u okviru *Borrelia burgdorferi* sensu lato
39 kompleksa i kroz detekciju prisustva *Coxiella burnetii* u tkivu slezine ispitivanih šakala, a
40 dodatno i kroz testiranje krpelja sakupljenih sa šakala, na prisustvo prethodno nabrojanih
41 krpeljima prenosivih zoonoznih patogena. Kandidat navodi da, iako se gustina populacija i
42 areal šakala poslednjih decenija u Srbiji povećavaju, istraživanja o ulozi ove divlje kanide u
43 epizootologiji i epidemiologiji vektorima prenosivih bolesti u našoj zemlji do sada nisu vršena.
44

45 U poglavlju **Pregled literature**, u prvom podpoglavljju kandidat ističe da u ciklusima
46 transmisije, vektorima prenosivi patogeni cirkulišu između vektora i primarnih domaćina, te da
47 je sa epizootiološko-epidemiološkog aspekta od velikog značaja poznavanje uloge različitih
48 vrsta domaćina i vektora u enzootskim ciklusima zoonoznih patogena na određenoj teritoriji.

49 U okviru podpoglavlja: „Šakali i njihov epizootiološko-epidemiološki značaj“, kandidat nas prvo
50 detaljnije upoznaje sa opštim karakteristikama zlatnog šakala (*Canis aureus*). Navodi se da je
51 to široko rasprostranjena divlja kanida srednje veličine tela, poznata i pod nazivima azijski
52 šakal, evroazijski šakal ili crveni vuk te da je autohtona divlja kanida u Srbiji pored lisice i
53 vuka. Da je vrlo prilagodljiv po pitanju izbora staništa i da zbog lako dostupne hrane koju
54 pronalazi u blizini naselja, šakali često žive u neposrednoj blizini ljudi. Kandidat navodi da je
55 telemetrijsko praćenje reproduktivne grupe u okolini grada Beograda pokazalo udaljenost
56 šakala od kraja urbane zone od samo 1km. Opisani su rezultati istraživanja ishrane šakala u
57 Srbiji koji potvrđuju da je ova vrsta generalist i da koristi širok dijapazon hraniva, te da često
58 ne lovi jer hranu pronalazi najčešće na neuređenim deponijama. Navedeno je i da istraživanja
59 potvrđuju da šakal ne utiče na smanjenje brojnosti gajene divljači u našoj zemlji.

1 Poseban osvrt kandidat daje rasprostranjenju šakala u Evropi, te dinamičnim promenama
2 areala ove vrste u XX veku. Pominje se dramatičan pad brojnosti populacije šakala u Evropi
3 zbog planskog trovanja vukova kada su brojne jedinice stradale kao kolateralna šteta, te da u
4 drugoj polovini XX veka preživele populacije naglo povećavaju svoju brojnost i
5 rasprostranjenje što se označava kao ekspanzija. Navedeno je da u našoj zemlji povećavanje
6 brojnosti, rekolonizacija staništa i širenje areala šakala vezuje se za osamdesete godine XX
7 veka.

8 U posebnom podpoglavlju kandidat ističe da su studije koje se bave ulogom šakala u
9 epidemiologiji i epizootiologiji vektorima prenosivih bolesti u svetu oskudne i da iako su šakali
10 prisutni na preko 70% teritorije naše zemlje i da populacija broji preko 20 000 jedinki,
11 istraživanja koja se bave ulogom šakala u epizootiologiji vektorima prenosivih bolesti u našoj
12 zemlji do sada nisu vršena. Kroz više manjih podcelina, kandidat opisuje opšte karakteristike
13 krpelja, životni ciklus krpelja te njihov epizootiološko-epidemiološki značaj. Takođe u
14 posebnom delu opisane su opšte karakteristike flebotomina i njihov epizootiološko-
15 epidemiološki značaj.

16 Kandidat u posebnim podcelinama izlaže i relevantne podatke koji se odnose na oboljenja
17 koja su izazvana uzročnicima koji se prenose vektorima, a čija je detekcija vršena kod šakala
18 i krpelja u okviru istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom. Sistematično i u
19 dovoljnom obimu opisuje epizootiološko-epidemiološke aspekte babezioze, lajmske bolesti,
20 anaplazmoze, rikecioza, kju groznice, tularemije i bartoneloze. Kandidat u posebnom delu
21 opisuje i epizootiološko-epidemiološke aspekte lajšmanioze.

22
23
24 U poglavlju **Cilji i zadaci istraživanja** kandidat navodi da je doktorska disertacija imala za cilj
25 spoznaju uloge zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju vektorima prenosivih zoonoza
26 (uzročnika iz rodova: *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia*
27 spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* i *Leishmania* spp.) na teritoriji
28 Republike Srbije. Kandidat navodi da je zbog naglog povećanja areala rasprostranjenja i
29 brojnosti populacije šakala na teritoriji naše zemlje kao i zbog malo dostupnih podataka o
30 epizootiološko-epidemiološkom značaju ove divlje kanide u održavanju vektorima prenosivih
31 zoonoznih patogena u svetu i kod nas, postojala potreba za naučnim istraživanjem ovog tipa.
32 Pored toga, s obzirom da sistematska istraživanja faune krpelja koji parazitiraju šakale nisu
33 vršena, cilj disertacije je bio i entomološki pregled, identifikacija i determinacija krpelja koji
34 parazitiraju šakale kod nas te i molekularna detekcija krpeljima prenosivih patogena u
35 sakupljenim krpeljima (uzročnika iz rodova: *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp.,
36 *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*), a zatim
37 tumačenje dobijenih rezultata sa aspekta humane i veterinarske medicine.

38
39
40 U svrhu ostvarivanja zadatih ciljeva postavljeni su sledeći naučno-istraživački zadaci:

- 41
42
- 43 • Uzorkvanje tkiva odstreljenih šakala (slezina) i ektoparazita krpelja, sa većeg broja
44 lokaliteta na teritoriji Republike Srbije.
 - 45
 - 46 • Laboratorijska obrada sakupljenih uzoraka (identifikacija vrsta, pola i stadijuma krpelja,
47 ekstrakcija DNK iz uzoraka tkiva i sakupljenih krpelja)
 - 48
 - 49 • Molekularna detekcija DNK patogena: (*Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia*
50 spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* i
51 *Leishmania* spp.) u uzorcima šakala i krpelja.
 - 52
 - 53 • Genotipizacija i karakterizacija detektovanih patogena molekularnim metodama
54 (sekvenciranje, RFLP).
 - 55
 - 56 • Statistička obrada dobijenih rezultata.
 - 57
58
59

1 U poglavlju **Materijal i metode** sistematično je opisano istraživano područje, način
2 sakupljanja uzoraka, dat je pregled metoda primenjenih tokom istraživanja kao i opis i
3 prikaz opreme korišćene u radu. Uzorci tkiva slezine šakala sakupljeni su od životinja
4 odstreljenih na širem području svakog od ukupno 10 analiziranih lokaliteta (Titel, Surčin,
5 Veliko Gradište, Smederevo, Smederevska Palanka, Velika Plana, Svilajnac, Negotin,
6 Zaječar, Bela Palanka), neposredno po odstrelu šakala, a u slučaju životinja stradalih u
7 saobraćaju u momentu kada je leš nađen. Podaci o mestu odstrela ili mestu gde je nađena
8 pregažena životinja, polu životinje i datum odstrela ili pretpostavljeno vreme smrti za životinje
9 stradale u saobraćaju, zabeleženi su za svaku jedinku. Navodi se da je u cilju uzimanja
10 adekvatnih uzoraka vršena terenska obdukcija uz poštovanje principa obdukcione tehnike u
11 datim uslovima. Od svake obdukovane životinje uzorci tkiva slezine su stavljeni u adekvatno
12 obeležene sterline bočice za urin i uz poštovanje hladnog lanca (medicinski transportni
13 hladnjak) isti su dopremani u laboratoriju radi daljih analiza. Do laboratorijskih analiza uzorci
14 tkiva su čuvani u zamrzivačima za duboko zamrzavanje na temperaturi od -80 °C. Uzorci
15 analizirani u ovoj doktorskoj disertaciji sakupljeni su tokom perioda od tri godine (januar 2010
16 god. – februar 2013 god.). Tamo gde je bilo moguće, ubrzo po odstrelu celo telo šakala je
17 detaljno pregledano na prisusvo krpelja. Svi krpelji uočeni inspekcijom su uz pomoć
18 entomološke pincete stavljeni u obeležene plastične tubice sa 70% alkoholom i transportovani
19 do laboratorije. Kandidat navodi da je u periodu u kom su sakupljeni uzorci tkiva slezine
20 šakala (januar 2010 god. – februar 2013 god.) sakupljeno ukupno 118 krpelja koji su pored
21 entomološkog pregleda analizirani i na prisustvo DNK patogena obuhvaćenih ovom studijom
22 (detekcija vrsta u okviru patogenih rodova: *Babesia*, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma*,
23 *Ehrlichia*, *Francisella*, *Bartonella* i *Coxiella*). Korišćenjem stereo-mikroskopa (58-06100,
24 Bresser™) sa mogućnošću uvećanja do 45 puta, krpelji su uz korišćenje standardnih ključeva
25 za determinaciju identifikovani do nivoa vste, određeni su razvojni stadijumi (nimfe, mužjaci,
26 ženke) i definisan je stepen nasisanosti (ne nasisani, umereno nasisani, nasisani). Za
27 ekstrakciju DNK uzorci su uzimani od svake životinje pojedinačno. Opisuje se da je uzeta
28 mala količina tkiva slezine (do 20 mg), uz pomoć sterilnih krvnih lanceta i stavljena u
29 plastičnu tubicu od 1,5 ml. Da su potom tubice držane 15 minuta u zamrzivaču za duboko
30 zamrzavanje (na - 80 °C) a da je zatim vršena homogenizacija uzorka uz pomoć plastičnih
31 štapića predviđenih za ovu namenu (Micropestle, Eppendorf™). Opisana je procedura
32 ekstrakcije ukupne DNK iz uzorka tkiva slezine koja je izvedena upotrebom komercijalnog kita
33 za ekstrakciju DNK u sistemu sa kolonicama (Gene Jet Genomic DNA Purification Kit,
34 Fermentas, Thermo Scientific™), po protokolu proizvođača za ekstrakciju DNK iz tkiva sisara.
35 Navedeno je da su po završenom entomološkom pregledu krpelji čuvani u 70% etanolu do
36 ekstrakcije DNK i da su pre same ekstrakcije krpelji ispirani u sterilnoj vodi, sušeni na filter
37 papiru pa zatim homogenizovani u 500 µl fosfatnog pufera (PBS) upotrebom sterilnih
38 makazica i uz pomoć sterilnih plastičnih mikro-tučkova (Micropestle, Eppendorf™). Po
39 dobijanju homogenata alikvotirano je 200 µl u novu tubicu koja je predstavljala polaznu tačku
40 za izolaciju DNK iz uzoraka krpelja. Ostatak homogenata krpelja čuvan je u zamrzivaču na –
41 80 °C da bi u slučaju potrebe postojala mogućnost ponovne izolacije DNK iz svakog uzorka.
42 Navedeno je da je za ekstrakciju korišćen isti komercijalni kit kao i za ekstrakciju DNK iz tkiva
43 slezine (Gene Jet Genomic DNA Purification Kit, Fermentas, Thermo Scientific™) po
44 prethodno opisanoj proceduri s tom razlikom da je po potrebi (gust sadržaj, veći stadijum
45 nasisanosti krpelja) vreme inkubacije produžavano sa 3 sata na 5 sati radi postizanja
46 optimalne digestije. Kandidat zatim opsuje multipleks lančanu reakciju polimerizacije (PCR) u
47 realnom vremenu za detekciju vrsta u okviru pet nabrojanih rodova. Za detekciju *Rickettsia*
48 spp., korišćena su dva seta prajmera i proba sa ciljem povećanja senzitivnosti i specifičnosti
49 metode. Više različitih prajmera i proba je korišćeno za identifikaciju vrsta u okviru roda
50 *Anaplasma* (prajmeri i probe za: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis* i *A. phagocytophilum*).
51 Senzitivnost i specifičnost multipleks PCR-a u realnom vremenu testirana je za svakog od
52 navedenih patogena ponaosob. Pozitivni uzorci (bilo od krpelja ili od uzorka krvi ljudi ili
53 životinja) za koje je određena vrsta prisutnog patogena su korišćeni kao pozitivne kontrole.
54 Analize su vršene na uređaju C1000 Touch, CFX96 thermal cycler (Biorad™). Mešavina
55 polimeraze i svih komponenti neophodnih za qPCR osim prajmera, proba i DNK uzorka koji
56 se ispituje: SsoFast Probes Supermix (Biorad™), je korišćena u zapremini od 10 µl, zajedno
57 sa 0,6 µl ili 0,9 µl svakog prajmera koncentracije 10 µM (0,6 µl u slučaju prajmera za detekciju
58 prisustva *F. turalensis* i *C. burnetii* a 0.9 µl u slučaju prajmera za detekciju *Rickettsia* spp.,
59 *Anaplasma* spp., *A. phagocytophilum* i *Bartonella* spp.) i 0,4 µl svake probe (10 µM) uz
60 dodatak odgovarajuće količine sterilne vode za uporebu u molekularnim analizama i 2,5 µl

1 izolovane DNK iz slezine koja se testira na prisustvo patogena. Korišćene su dve vrste
 2 negativne kontrole (DNK izolovana iz neinficiranih uzoraka i sterilna voda).
 3 Prajmeri i probe korišćeni u qPCR za detekciju pojedinih patogena dati su u tabeli 1. U
 4 slučaju pozitivnih rezultata za svakog od testiranih patogena, klasičan PCR je primenjen sa
 5 ciljem dobijanja dužeg fragmenta gena i potvrde vrste patogena sekvenciranjem.

6
 7
 8 Tabela 1. Prajmeri i probe korišćeni za detekciju *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella*
 9 *tularensis*, *Bartonella* spp., i *Coxiella burnetii* multiplex Real Time PCR-om u slezinama
 10 šakala.
 11

Patogen	Prajmer/p roba	Sekvence prajmera i proba	Ciljni gen
<i>F. tularensis</i>	FrancF	5'-ACCCACAAGGAAGTGTAAAGATTAC-3'	<i>tul4</i>
	FrancR	5'-AGTTGCCCAAGTTTTATCGTTC-3'	
	FrancP	HEX -CAATGGCAGGCTCCAGAAGGTTCTAA	
<i>Anaplasma</i> spp.*	AnapF	5'-AGAGTGGAATTGGAAGCGAG-3'	<i>msp4</i>
	AnapR	5'-GGTCTCAGTAATGTTAGCGTCG-3'	
	AnapP	FAM -ACAGAAGGTTTGCTACTTTGGCGGA	
<i>A. phagocytophilum</i>	AnapphF	5'-CTGACTTGCCTGTATCTCCTTAC-3'	<i>msp4</i>
	AnapphR	5'-CCTCCAGCTATTAAGATATTTTCAGG-3'	
	AnapphP	FAM -CTCGCCCCTAACCCAGCACA	
<i>C. burnetii</i>	CbF	5'-CGCTGCCAAAGTATCATTAGC-3'	<i>com1</i>
	CbR	5'-GCGGTTTGAAGGGTGATTTG-3'	
	CbP	HEX -TGCTCAGTGTGACGGCCAATTAT	
<i>Rickettsia</i> spp.	Rick1F	5'-GTCGCAAATGTTACCGGTAC-3'	<i>gltA</i>
	Rick1R	5'-TTGTTTCAGGGTCTTCGTGC-3'	
	Rick1P	Texas Red® -TCTTTCCATTGTGCCATCCAGCCT	
<i>Rickettsia</i> spp.	Rick2F	5'-AATAGCAAGAACCGTAGGTGG-3'	<i>gltA</i>
	Rick2R	5'-ACATAACCTGTCTGGTCTCTGA-3'	
	Rick2P	Texas Red® -TGTCAGGTCTTCGTGCATTTCTTTCCA	
<i>Bartonella</i> spp.	BartoITSF	5'-GATGCCGGGGAAGGTTTTTC-3'	<i>ITS</i>
	BartoITSR	5'-GCCTGGGAGGACTTGAACCT-3'	
	BartoP	Cy5 -GCGCGCGCTTGATAAGCGTG	

12
 13
 14 Kandidat navodi da je za detekciju *Leishmania* spp., korišćen je protokol za qPCR sa
 15 upotrebom fluorescentne probe LEIS.P1, čija je ologonukleotidna sekvenca: 5'-CGG TTC
 16 GGT GTG TGG CGC C-3' specifična za konzervisani region gena za malu subjedinicu rRNK

1 među različitim vrstama lajšmanija. Proba je na 5' kraju označena bojom FAM, 6-karboksi-
2 fluorescein a na 3' kraju nalazi se „quencher“ boja TAMRA (6-karboksi-tetrametil-rodamin).
3 Korišćeni su prajmeri: LEIS.U1 (5'-AAG TGC TTT CCC ATC GCA ACT-3') i LEIS.L1 (5'-GA-
4 CGC ACT AAA CCC CTC CAA-3'). Analiza je vršena na qPCR mašini C1000 Touch, CFX96
5 thermal cycler (Biorad™). Ukupna zapremina PCR smeše bila je 20 µl. SsoFast Probes
6 Supermix (Biorad™), je korišćen u zapremini od 10 µl, zajedno sa: 1,6 µl svakog prajmera
7 koncentracije 10 µM, 0,2 µl fluorescentne probe (koncentracije 10 µM), 4,1 µl sterilne vode za
8 uporebu u molekularnim analizama i 2,5 µl izolovane DNK iz slezine koja se testira na
9 prisustvo patogena. DNK soja *Leishmania infantum* izolovanog iz krvi inficiranog čoveka je
10 korišćena kao pozitivna kontrola. Korišćene su dve vrste negativnih kontrola (DNK izolovana
11 iz neinficiranih uzoraka i sterilna voda).

12 Detekcija prisustva DNK *Babesia* spp. i *Borrelia burgdorferi* s.l., u slezinama šakala vršena je
13 konvencionalnim PCR-om po prethodno publikovanim protokolima. Za detekciju *Babesia*
14 spp., korišćeno je više parova prajmera i protokola. Prajmeri BabF (5'-GCG ATG GCC CAT
15 TCA AGT TT-3') and BabR (5'-CGC CTG CTG CCT TCC TTA GA-3') čiji je target fragment
16 18S rRNK veličine 146 baznih parova korišćeni su za inicijalnu detekciju. Svi dobijeni pozitivni
17 uzorci sa ovim protokolom su potom analizirani sa PIRO-A (5'- AAT ACC CAA TCC TGA
18 CAC AGG G -3') i PIRO-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC-3') prajmerima koji
19 umnožavaju fragment ssu-rDNK gena veličine oko 410 bp. i sa BJ1 (5'-GTC TTG TAA TTG
20 GAA TGA TGG-3') i BN2 (5'-TAG TTT ATG GTT AGG ACT ACG-3') prajmerima koji
21 amplifikuju 487 bp dugačak fragment 18S rRNK gena roda *Babesia*. Pored slanja pozitivnih
22 uzoraka dobijenih uz pomoć pomenutih prajmera (PIRO-A, PIRO-B i BJ1, BN2) na
23 sekvenciranje, za pozitivne uzorke umnožen je i veći fragment (1600 bp) 18S rRNK gena sa
24 prajmerima Nbab-1F (5'-AAG CCA TGC ATG TCT AAG TAT AAG CTT TT-3') i Nbab-1R (5'-
25 CTT CTC CTT CCT TTA AGT GAT AAG GTT CAC-3') po prethodno publikovanom
26 protokolu. Detekcija *Borrelia* spp., vršena je po „nested“ protokolu koji podrazumeva dva
27 koraka i dva seta prajmera. Korišćeni su prajmeri komplementarni 3' kraju 5S rRNK (*rrf*)
28 (RIS1; 5'-CTG CGA GTT CGC GGG AGA-3'), i (RIS3; 5'-GGA GAG TAG GTT ATT GCC
29 AGG-3') kao i 5' kraju 23S rRNK (*rrl*) (RIS2; 5'-TCC TAG GCA TTC ACC ATA-3') i (RIS4; 5'-
30 GAC TCT TAT TAC TTT GAC C-3'). Prajmeri amplifikuju 5S-23S rRNK intergenskog regiona
31 vrsta u okviru roda *Borrelia*. Amplifikacija je izvedena po prethodno publikovanom protokolu.
32 Za detekciju DNK patogena od interesa u krpeljima korišćena je metodologija klasičnog PCR-
33 a. Detekcija DNK *Babesia* spp. i *Borrelia* spp., vršena je po protokolu koji je korišćen i za
34 detekciju prisustva ovih patogena u tkivu slezine šakala. Prajmeri EHR16SD (5'-GGT ACC
35 YAC AGA AGA AGT CC-3') i EHR16SR (5'-TAG CAC TCA TCG TIT ACA GC-3') koji
36 amplifikuju fragment od 345 bp 16S rRNK gena familije Anaplasmataceae korišćeni su za
37 dokazivanje prisustva DNK rodova *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*, po
38 prethodno publikovanim protokolima. Pozitivni uzorci su potom analizirani sa „nested“
39 protokolom za detekciju *A. phagocytophilum* upotrebom prajmera dizajniranih na osnovu
40 visoko konzervativnog regiona *p44/msp2* paraloga (p3726F; 5'-GCT AAG GAG TTA GCT
41 TAT GA-3'), (p3761F; 5'-CTG CTC T(T/G)G CCA A(A/G)A CCT C-3'), (p4183R ; 5'-CAA TAG
42 T(C/T)T TAG CTA GTA ACC-3'), i (p4257R ; 5'-AGA AGA TCA TAA CAA GCA TTG-3').
43 Prajmeri Rp CS.877p (5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3') i Rp CS.1258n (5'-ATT GCA
44 AAA AGT ACA GTG AAC A-3') koji služe za umnožavanje fragmenta gena za citrat sintazu
45 *Rickettsia* spp., veličine 380-397 bp korišćeni su za dokazivanje prisustva rikecija u
46 ispitivanim uzorcima. Prajmeri TUL4-435 (5'-GCT GTA TCA TCA TTT AAT AAA CTG CTG-3')
47 i TUL4-863; (5'-TTG GGA AGC TTG TAT CAT GGC ACT-3') koji umnožavaju fragment gena
48 od 400bp koji kodira lipoprotein od 17 kDa koji je konzerviran među različitim sojevima *F.*
49 *tularensis* korišćeni su za dokazivanje njenog prisustva. Urbarto1 (5'-CTT CGT TTC TCT
50 TTC TTC A-3') i Urbarto2 (5'-CTT CTC TTC ACA ATT TCA AT-3') prajmeri koji umnožavaju
51 fragment 16S-23S intergenskog regiona (ITS) *Bartonella* spp., veličine 639 bp po prethodno
52 publikovanom protokolu, korišćeni su za dokazivanje prisustva DNK bakterija ovog roda.
53 Prajmeri CB-1: 5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3' i CB-2: 5'-TAG CTG AAG CCA ATT
54 CGC C-3' koji amplifikuju 257 bp dugačak fragment gena za kodiranje superoksid dismutaze
55 *C. burnetii* korišćeni su za dokazivanje njenog prisustva u ispitivanim uzorcima.

56 Za konvencionalni PCR korišćen je uređaj: Veriti Thermal Cycler, (Applied Biosystems, USA).
57 Za pripremu PCR reakcije korišćena je mešavina polimeraze i svih komponenti neophodnih
58 za reakcionu smešu osim prajmera i DNK uzorka koji se ispituje: PCR Master Mix (2X),
59 (Thermo Fisher Scientific™), a reakciona smeša je pripremana po preporuci proizvođača
60 hemikalija. To je podrazumevalo: 25 µl PCR Master Mix (2X), po 3 µl svakog prajmera

1 koncentracijem 10 μ M, izolovanu DNK uzorka koji se ispituje (do 6 μ l) i dodatak vode za
2 molekularne analize do ukupne zapremine PCR smeše od 50 μ l.
3 Detektovani pozitivni uzorci krpelja po prethodnom protokolu su zatim ponovo umnožavani
4 korišćenjem jedinstvene komercijalne mešavine polimeraza: High Fidelity PCR Enzyme Mix
5 (Thermo Fisher Scientific™). Zbog malog stepena greške ovih polimeraza prilikom ugradnje
6 nukleotida u lanac koji sintetišu, dobijaju se PCR produkti pogodni za sekvenciranje.
7 PCR reakcija prilikom korišćenja mešavine polimeraza: High Fidelity PCR Enzyme Mix
8 (Thermo Fisher Scientific™) formirana je od sledeći konstituenata: 10X High Fidelity PCR
9 pufer sa 10 mM MgCl₂, dNTP smeša nukleotidnih baza (2 mM svake baze), po 0.3-1 mM oba
10 prajmera, izolovanu DNK uzorka koji se ispituje, zatim mešavina polimeraza: High Fidelity
11 PCR Enzyme Mix u količini od 1,25-2,5 u po reakciji i vodu za molekularne analize do
12 ukupne zapremine reakcije od 50 μ l. Uslovi pod kojima je vršeno umnožavanje fragmenata
13 gena testiranih patogena u mašini za konvencionalni PCR, prilagođeni su detekciji prisustva
14 DNK svakog patogena ponaosob. Uslovi su prvo postavljeni po preporuci proizvođača
15 hemikalija. U slučaju kada je korišćena mešavina polimeraze i svih komponenti neophodnih
16 za reakcionu smešu osim prajmera i DNK uzorka koji se ispituje: PCR Master Mix (2X),
17 (Thermo Fisher Scientific™) uslovi su bili sledeći: Inicijalna denaturacija u trajanju od 1 do 3
18 minuta na 95°C, potom 30-40 ciklusa pod uslovima: denaturacija 95 °C u trajanju od 30
19 sekundi, hibridizacija prajmera na temperaturi za 5 °C nižoj od tačke topljenja prajmera
20 (izračunata za sve korišćene prajmere) u trajanju od 30 sekundi, elongacija 72 °C u trajanju od
21 1 minut po kb ciljnog fragmenta. Završna elongacija je vršena na 72 °C u trajanju od 5 do 10
22 minuta.
23 Kada je za reakcionu smešu korišćena mešavina polimeraza: High Fidelity PCR Enzyme Mix
24 (Thermo Fisher Scientific™), početni uslovi za umnožavanje fragmenata gena testiranih
25 patogena su bili: Inicijalna denaturacija u trajanju od 1 do 3 minuta na 94 °C, potom 25-35
26 ciklusa pod uslovima: denaturacija 94 °C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacija prajmera na
27 temperaturi za 5 °C nižoj od tačke topljenja prajmera u trajanju od 30 sekundi, elongacija 72
28 °C u trajanju od 1 minut po kb ciljnog fragmenta i završna elongacija na 72 °C u trajanju od 5
29 do 10 minuta. Za detekciji svih patogena obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom čije je
30 prisustvo dokazivano metodologijom konvencionalnog PCR-a vršena je optimizacija protokola
31 do postizanja optimalnih uslova za izvođenje reakcije. Pored matematičkog određivanja
32 optimalne temperature za vezivanje prajmera, rađen je gradijent temperature optimalne za
33 hibridizaciju svih korišćenih prajmera sa pozitivnim kontrolama za sve testirane patogene.
34 Elektroforetsko razdvajanje dobijenih PCR produkata vršeno je korišćenjem aparature za
35 horizontalnu gel elektroforezu, Sub-Cell, GT, Bio-Rad™. Za izradu gelova korišćena je
36 SeaKem, LE (Lonza™) agarozna sa učešćem od 1-2% a bojenje vršeno etidijum bromidom
37 (Etidium Bromide Solution, 10mg/ml, Invitrogen™) ili sa bojom: Midori Green Advance
38 (Nippon Genetics™). Vizuelizacija umnoženih PCR produkata vršena je pod UV svetlom u
39 komori za ovu namenu (BioDocAnalyze Darkhood, Biometra™).
40 Kandidat navodi da je determinacija *B. burgdorferi* sensu lato genospecijesa uzoraka
41 pozitivnih sa klasičnim PCR-m pored sekvenciranja izvedena je i na osnovu polimorfizma
42 dužina restrikcionih fragmenata (*eng.* "restriction fragment length polymorphism-RFLP")
43 produkata PCR-a. Korišćeni su restrikcioni enzimi *MseI* i *DraI* po prethodno publikovanom
44 protokolu.
45 U slučaju uzoraka tkiva šakala i krpelja pozitivnih na *Anaplasma* spp., pored sekvenciranja
46 PCR produkata, primenjena je i RFLP metoda uz upotrebu komercijalno dostupnih
47 restrikcionih enzima: *HaeIII* (Fermentas™) i *ApoI* (New England Biolabs™) na sve umnožene
48 *msp4* fragmente gena. Metoda omogućava uvid u postojanje različitih vrsta u okviru
49 *Anaplasma* spp, (*A. marginale*, *A. centrale* i *A. ovis*).
50 Za prečišćavanje i sekvencioniranje PCR produkata, pozitivnih na prisustvo DNK patogena
51 koji su ispitivani, korišćena je komercijalna usluga firme MacroGen Europe (The Netherlands).
52 Obrada dobijenih sekvenci urađena je u programima adekvatnim za bioinformatičku analizu
53 (FinchTV™, BioEdit™, MEGA™). Identifikacija vrsta patogena utvrđena je na osnovu
54 poređenja dobijenih obrađenih sekvenci sa do sada opisanim i deponovanim sekvencama u
55 banci gena (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Dobijeni rezultati
56 istraživanja u okviru doktorske disertacije obrađeni su u statističkim programima (SPSS
57 v.17.0, (IBM Corporation™) Excel, (Microsoft Corporation™). Korišćeni su deskriptivni
58 statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška,
59 minimalna, maksimalna vrednost ...), Hi-kvadrat test.
60

1
2 Dobijene **Rezultate** kandidat je prikazao kroz više podpoglavlja uz pomoć slika,
3 tabelarno i grafički. Navedeno je da su tokom perioda sakupljanja od četiri godine
4 sakupljeni uzorci od ukupno 216 jedinki šakala poreklom sa 10 lokaliteta širom teritorije
5 Republike Srbije. Da je od 216 analiziranih šakala, 108 je bilo muškog a 108 ženskog pola.
6 Većina analiziranih uzoraka (147/216, 68,1%) poticala je sa tri lokaliteta: Veliko Gradište
7 (54/216, 25%), Smederevo (49/216, 22,7%), Svilajnac (44/216, 20,4%). Preostali uzorci
8 (69/216, 31,9%) sakupljeni su na jednom od sedam lokaliteta: Velika Plana (25/216, 11,6%),
9 Surčin (24/216, 11,1%), Titel (5/216, 2,3%), Bela Palanka, Smederevska Palanka, Negotin
10 (po 4 uzorka, 12/216, 5,6%) i Zaječar (2/216, 0,9%). Srednja vrednost sakupljenog broja
11 uzoraka po lokalitetima iznosila je 18,2 a medijana 4,5. Najveći broj analiziranih uzoraka
12 sakupljen je tokom 2011 godine (80/216, 37%) a najmanji tokom 2010 godine (24/216,
13 11,1%). Srednja vrednost sakupljenog broja uzoraka po godinama (od 2010 do 2013 god.)
14 iznosi 54 a medijana 56. Od ukupnog broja uzoraka najveći broj je sakupljen za vreme zimske
15 sezone lova od novembra do februara (196/216, 90,7%). Septembar i oktobar su meseci
16 tokom kojih nije sakupljen ni jedan uzorak tokom četiri godine sakupljanja.
17 Krpelji analizirani u ovoj studiji sakupljeni su sa odstreljenih šakala u periodu od aprila 2012
18 do februara 2013 god. Ukupno je sakupljeno 118 krpelja. Navodi se da su među sakupljenim
19 krpeljima identifikovane tri vrste: *Ixodes ricinus* (64/118, 54,2%), *Dermacentor reticulatus*
20 (47/118, 39,8%) i *Haemaphysalis concinna* (7/118, 5,9%). Sakupljene su dve nimfe vrste *H.*
21 *concinna* dok su svi preostali krpelji bili adulti. Od 10 lokaliteta sa kojih potiču odstreljeni
22 šakali, krpelji su sakupljeni sa njih sedam: Bela Palanka, Smederevo, Smederevska Palanka,
23 Surčin, Svilajnac, Titel, Veliko Gradište. Krpelji vrste *I. ricinus* su sakupljeni sa šakala na pet
24 od sedam lokaliteta (Veliko Gradište, Smederevska Palanka, Svilajnac, Surčin, Bela
25 Palanka), *D. reticulatus* na četiri (Veliko Gradište, Surčin, Smederevo, Titel), a *H. concinna* sa
26 šakala odstreljenih na tri lokaliteta (Veliko Gradište, Surčin, Smederevska Palanka). Na dva
27 lokaliteta (Surčin, Veliko Gradište) nađene su sve tri vrste krpelja *I. ricinus*, *D. reticulatus* i *H.*
28 *concinna* dok sa lokaliteta Smederevska Palanka potiču dve vrste *I. ricinus* i *H. concinna*. Sa
29 preostala četiri lokaliteta sakupljeni su krpelji po jedne vrste krpelja i to *I. ricinus* na
30 lokalitetima Svilajnac i Bela Palanka, a *D. reticulatus* na lokalitetima Titel i Smederevo.
31 Kandidat navodi da je ukupno 118 krpelja sakupljeno sa 20 infestiranih životinja. Step
32 infestacije kretao se od jednog do 32 krpelja po šakalu dok je srednja vrednost bila 5,9 a
33 medijana tri. Od 20 šakala sa kojih su sakupljeni krpelji, njih 15 je bilo infestirano samo sa
34 jednom vrstom krpelja (sa osam šakala sakupljeni su krpelji vrste *I. ricinus*, pet šakala je bilo
35 infestirano sa jedinkama vrste *D. reticulatus* a dva šakala sa *H. concinna*). Pet šakala je bilo
36 infestirano sa dve vrste krpelja istovremeno (tri životinje jedinkamavrsta *I. ricinus* i *D.*
37 *reticulatus* a dva šakala *I. ricinus* i *H. concinna*). Infestacija šakala krpeljima po lokalitetima
38 kretala se od 7,7% na lokalitetu Svilajnac do 66,7% na lokalitetu Smederevska Palanka.
39 Srednja vrednost infestacije bila je 31,8% a medijana 33,3%.
40 Dalje se navodi da je u okviru doktorske disertacije molekularnim metodama ukupno testirano
41 216 uzoraka tkiva selzine šakala na prisustvo vektorima prenosivih uzročnika zoonoza:
42 *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp.,
43 *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii* i *Leishmania* spp.. Da je od ukupnog broja testiranih uzoraka
44 devet šakala (9/216, 4,2%) bilo pozitivno na DNK *Babesia* spp., da su dve životinje pokazale
45 pozitivan rezultat na prisustvo DNK *Anaplasma* spp. (2/216, 0,9%) te da je 15 jedinki bilo
46 pozitivno na prisustvo DNK *Leishmania* spp. (15/216, 6,9%). Kandidat navodi da u
47 analiziranim slezinama šakala nije detektovano prisustvo *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp.,
48 *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp., i *Coxiella burnetii*. Prevalencija *Babesia* spp.
49 u analiziranom uzorku kretala se od 3,8% kod životinja izlovljenih tokom 2011 god. do 4,5%
50 kod životinja izlovljenih tokom 2013 godine. Prosečna prevalencija za *Babesia* spp. tokom
51 četiri godine sakupljanja iznosi 4,2% a medijana 4,3%. Po jedan pozitivan uzorak na
52 *Anaplasma* spp., detektovan je u 2012. (1/45, 2,2%) i 2013. godini (1/67, 1,5%). Prevalencija
53 *Leishmania* spp. kod odstreljenih šakala po godinama kretala se od 1,3% (1/80) 2011.
54 godine, do 14,9% (10/67) 2013 godine. Navedeno je da je hi-kvadrat testom (nivo statističke
55 značajnosti $P < 0,05$) potvrđeno statistički značajno povećanje broja pozitivnih šakala na
56 *Leishmania* spp., u 2013. godini u odnosu na prethodne godine ($p=0,011$) te da nije postojala
57 statistička značajnost za povećanje prevalencije na *Babesia* spp. tokom godina sakupljanja
58 ($p= 0.436$).
59 Prisustvo DNK *Babesia* spp. detektovano je kod šakala odstreljenih na četiri lokaliteta: Surčin
60 (3/24, 12,5%), Svilajnac (3/45, 6,8%), Smederevo (2/49, 4,1%) i na lokalitetu Veliko Gradište

1 (1/54, 1,9%). Pozitivni uzorci na *Anaplasma* spp., bili su sakupljeni na dva lokaliteta: Velika
2 Plana (1/25, 4%) i Smederevo (1/49, 2%) dok je DNK *Leishmania* spp. detektovana kod
3 šakala odstreljenih na pet lokaliteta: Smederevo (12,2%, 6/49), Svilajnac (9,1%, 4/44), Surčin
4 (8,3%, 2/24), Velika Plana (4%, 1/25), Veliko Gradište (3,7%, 2/54). Prevalencija *Babesia*
5 spp. u analiziranom uzorku po polovima bila je 5,6%, (6/216) kod mužijaka i 2,8% (3/216) kod
6 ženki. Po jedna životinja muškog i ženskog pola su bile pozitivne na prisustvo DNK
7 *Anaplasma* spp., dok je ukupno 11 mužijaka (10,2%, 11/216) i četiri ženke (3,7%, 4/216) bilo
8 pozitivno na prisustvo DNK *Leishmania* spp. Hi-kvadrat testom (nivo značajnosti $p < 0,05$) je
9 potvrđena statistički značajna razlika u prevalenciji između mužijaka i ženki za *Babesia* spp.
10 ($p = 0,011$) i *Leishmania* spp. ($p = 0,061$) u korist mužjaka. Svi prethodno pozitivni uzorci na
11 *Babesia* spp. i *Anaplasma* spp., su su sekvencirani metodom po Sangeru i izvršeno je
12 poređenje dobijenih sekvenci sa sekvencama dostupnim u bazi GenBank
13 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Leišmanije su identifikovane do nivoa roda
14 (*Leishmania* spp.). Svih devet dobijenih 18S rRNK sekvenci *Babesia* spp. su međusobno
15 identične i identifikovane kao *B. canis*. Reprezentativna sekvenca od 1455 bp je deponovana
16 u bazi GenBank pod pristupnim brojem KY747491. Deponovana sekvenca se 100%
17 podudara sa sekvencama koje su dobijene iz vukova (KY359360) i prirodno inficiranih pasa
18 (AY072926) u Hrvatskoj i kod konja u Italiji (KX839231). Analiza dve dobijene sekvence
19 *Anaplasma* spp., iz slezine šakala pokazala je da se radi o *A. phagocytophilum*. Sekvence su
20 međusobne identične, a reprezentativna sekvenca je deponovana u bazi GenBank pod
21 pristupnim brojem MF076944. Deponovana sekvenca je identična sa više prethodno
22 deponovanih sekvenci u bazi GenBank, dobijenih od većeg broja različitih domaćina u
23 mnogim zemljama. Molekularnim metodama u krpeljima sakupljenim sa šakala detektovano je
24 prisustvo DNK *Babesia* spp., *Borrelia* spp., i *Anaplasma* spp. Svi uzorci krpelja pozitivni na
25 prisustvo DNK patogena su sekvencirani metodom po Sangeru čime je identifikovana vrsta
26 prisutnog patogena. U analiziranim uzorcima nije potvrđeno prisustvo: *Rickettsia* spp.,
27 *Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Bartonella* spp. i *Coxiella burnetii*. Kandidat navodi da je od
28 118 analiziranih krpelja njih 15 bilo pozitivno na prisustvo DNK *Babesia* spp., (15/118,
29 12,7%). Nakon sekvenciranja i poređenjem dobijenih 18S rRNK sekvenci sa sekvencama
30 deponovanim u bazi GenBank potvrđeno je prisustvo dve vrste roda *Babesia*: *B. canis* i *B.*
31 *microti*. Ukupan broj šakala koji su bili parazitirani sa krpeljima pozitivnim na prisustvo DNK *B.*
32 *canis* bio je sedam. DNK *B. canis* je detektovana kod šest ženki krpelja vrste *I. ricinus* koje su
33 sakupljene sa pet šakala odstreljenih na jednom od tri lokaliteta: Smederevska Palanka,
34 Surčin, Veliko Gradište i kod jedne ženke i sedam mužjaka krpelja vrste *D. reticulatus* koji
35 potiču sa ukupno četiri šakala koji su odstreljeni na jednom od tri lokaliteta: Smederevo,
36 Surčin, Titel. Jedan šakal sa lokaliteta Surčin imao je na sebi jednu ženku krpelja *I. ricinus* i
37 jednog mužjaka krpelja *D. reticulatus* koji su bili pozitivni na prisustvo *B. canis*.
38 Navedeno je da je prisustvo DNK *B. microti* potvrđeno kod jedne ženke vrste *I. ricinus* koja je
39 sakupljena na lokalitetu Svilajnac. Navedeno je da su reprezentativne sekvence *B. canis*
40 (pristupni broj KY828593) i *B. microti* (pristupni broj KY828448) deponovane u bazi
41 GenBank, te da je u analiziranim krpeljima detektovano i prisustvo DNK *Borrelia* spp., kod pet
42 krpelja (5/118, 4,2%) sakupljenih sa ukupno tri šakala. Kandidat navodi da je sekvenciranjem
43 PCR produkata i analizom dobijenih sekvenci identifikovano prisustvo tri vrste *Borrelia*: *Bo.*
44 *garinii*, *Bo. valaisiana* i *Bo. lusitaniae*. DNK *Bo. garinii* detektovana je kod jednog mužjaka
45 krpelja vrste *D. reticulatus* sakupljenog sa šakala na lokalitetu Surčin. Navedeno je da je
46 dobijena sekvenca deponovana u bazi GenBank pod pristupnim brojem KY863460. Prisustvo
47 DNK *Bo. valaisiana* je detektovano kod dva mužijaka krpelja vrste *I. ricinus* sakupljenih sa
48 jednog šakala na lokalitetu Veliko Gradište. Kandidat navodi da je reprezentativna sekvenca
49 deponovana u bazi GenBank pod pristupnim brojem KY863459. Navodi se da je DNK *Bo.*
50 *lusitaniae* potvrđena kod dva mužijaka krpelja vrste *I. ricinus* sakupljenih takođe sa jednog
51 šakala na lokalitetu Smederevska Palanka, da je kod tri mužijaka vrste *D. reticulatus*
52 detektovano prisustvo DNK *Anaplasma* spp. te da je RFLP analizom dobijenih PCR
53 produkata potvrđeno prisustvo *A. marginale* u sva tri uzorka.

54
55
56 U poglavlju **Diskusija**, kandidat sve dobijene rezultate do kojih je došao tokom
57 istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom kritički analizira i upoređuje sa
58 podacima dobijenim u prethodnim istraživanjima.

59
60

1 U poglavlju **Literatura** taksativno je naveden spisak celokupne korišćene literature tokom
2 izrade doktorske disertacije. Ukupno su navedene 483 reference domaćih i stranih autora.

3 4 5 6 7 8 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 9 **disertaciji):**

10
11
12 Na osnovu rezultata dobijenih u istraživanjima sprovedenim u okviru ove doktorske
13 disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- 14
15 1. Šakali predstavljaju dobre domaćine za više vrsta krpelja sa dokazanim epizootiološko-
16 epidemiološkim značajem. U našem istraživanju potvrđeno je prisustvo tri vrste krpelja
17 koji parazitiraju na šakalima u Republici Srbiji: *Ixodes ricinus* (54,2%), *Dermacentor*
18 *reticulatus* (39,8%) i *Haemaphysalis concinna* (5,9%). U krpeljim sakupljenim sa šakala u
19 našoj studiji potvrđeno je prisustvo većeg broja patogena sa zoonotskim potencijalom: *B.*
20 *canis*, *B. microti*, vrsta iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa (*B. garinii*, *B. valasiana*, *B.*
21 *lusitaniae*) i *A. marginale*.
- 22
23 2. Rezultati naših istraživanja po prvi put potvrđuju prisustvo *B. canis* kod šakala na teritoriji
24 Srbije i upućuju na potencijalnu ulogu ove vrste u održavanju *B. canis* u silvatičnom
25 ciklusu u našoj zemlji. Molekularnim metodama potvrđena je prevalencija od 4,2%
26 (9/216).
- 27
28 3. Identičnost 18S rRNK sekvence *B. canis* potvrđene kod jednog šakala i *D. reticulatus*
29 krpelja koji je parazitirao na toj životinji, direktno ukazuje na mogućnost postojanja
30 silvatičnog enzootskog transmisionog ciklusa na relaciji domaćin šakal-kompetentni
31 vektor.
- 32
33 4. Potvrđeno prisustvo *B. canis* kod *Ixodes ricinus* (9,4%) i *Dermacentor reticulatus* (17%)
34 krpelja sakupljenih sa šakala u ovoj studiji, ukazuje na mogućnost za prenos ove
35 protozoe posredstvom navedenih krpelja, dokazanih vektora *B. canis* na populaciju
36 domaćih pasa s obzirom na prisustvo šakala u suburbanim zonama.
- 37
38 5. Kod jedne ženke vrste *I. ricinus* sakupljenje sa šakala u ovoj studiji potvrđeno je
39 prisustvo zoonozne *B. microti*. Ovo je prvi dokaz prisustva ovog patogena kod krpelja u
40 centralnoj Srbiji, čime je potvrđena šira distribucija glavnog uzročnika humane babezioze
41 kod nas nego što se mislilo do sad. S obzirom da *B. microti* očigledno cirkuliše na
42 teritoriji naše zemlje ukazano je na potencijalni rizik od pojave ovog oboljenja kod ljudi i
43 u našoj zemlji.
- 44
45 6. Rezultatima naših istraživanja po prvi put je dokazano prisustvo DNK *A.*
46 *phagocytophilum* molekularnim metodama kod šakala uopšte. Navedeni nalaz ukazuje
47 na potencijalni značaj šakala kao vrste rezervoara u enzootskim ciklusima anaplazmoze
48 izazvane *A. phagocytophilum*. Potvrđena je prevalencija od 0,9% (2/216).
- 49
50 7. Kod tri mužjaka vrste *D. reticulatus* sakupljena sa šakala potvrđeno je prisustvo *A.*
51 *marginale*, značajnog uzročnika babezioze goveda u Mediteranskom regionu. Ovo je
52 prva potvrda prisustva *A. marginale* kod *D. reticulatus* u Srbiji dokazana molekularnim
53 metodama i ukazuje na potencijalni rizik od pojave anaplazmote goveda na teritoriji
54 Republike Srbije .
- 55
56 8. Iako kod analiziranih šakala nije potvrđeno prisustvo vrsta *Borrelia burgdorferi* s.l.
57 kompleksa, potvrđeno je prisustvo *B. garinii* kod mužjaka *D. reticulatus*, i *B. valasiana* i
58 *B. lusitaniae* kod mužjaka vrste *I. ricinus* sakupljenih sa šakala. Nalaz ne ukazuje na
59 ulogu šakala u održavanju uzročnika lajmske bolesti ali šakali mehaničkim prenošenjem

1 krpelja inficiranih borelijama mogu indirektno da utiču na epizootologiju i epidemiologiju
2 ovog oboljenja.
3

4 9. Potvrđena relativno visoka prevalencija na *Leishmania* spp. kod šakala analiziranih u
5 ovoj doktorskoj disertaciji (15/216, 6,9%), s obzirom na opštu epizootiološko-
6 epidemiološku situaciju po pitanju lajšmanioze u našoj zemlji, ukazuje na šakale kao
7 važne rezervoare uzročnika lajšmanioze u silvatičnom ciklus u Srbiji.
8

9 10. Kod analiziranih šakala i krpelja sakupljenih sa njih u ovoj studiji, nije dokazano prisustvo
10 *Rickettsia* spp. *Coxiella burnetii*, *Francisella* spp. i *Bartonella* spp., čime nije potvrđen
11 potencijalni epizootiološko-epidemiološki značaj šakala u održavanju nabrojanih
12 zoonoznih patogena.
13

14 11. Zbog dinamičnih promena epizootiološko-epidemiološke situacije na određenoj teritoriji
15 kroz vreme, naš nalaz ne predstavlja konačnu sliku nego trenutnu epizootiološku
16 situaciju. Neophodna su dalja istraživanja i monitoring nabrojanih patogenih
17 mikroorganizama kod šakala i drugih divljih i domaćih životinja u cilju praćenja
18 epizootiološke situacije u dužem vremenskom periodu radi izrade adekvatnih planova
19 prevencije i suzbijanja pojedinih bolesti od interesa.
20
21
22
23

24 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li** 25 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li** 26 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):** 27 28 29

30 Rezultati istraživanja u okviru doktorske disertacije kandidata dr. vet. Ratka Sukare pod
31 nazivom „Epizootiološko-epidemiološki značaj zlatnog šakala (*Canis aureus*) u održavanju
32 vektorima prenosivih zoonoza na teritoriji Republike Srbije“ u skladu su sa prethodno
33 postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja, pregledno i jasno su prikazani, adekvatno
34 protumačeni, a zaključci koji proizilaze iz dobijenih rezultata postavljeni su pravilno i jasno su
35 formulisani.
36
37
38
39

40 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:** 41 42

43 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**
44

45 Doktorska disertacija je u potpunosti napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi
46 teme.
47
48

49 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**
50

51 Doktorska disertacija kandidata dr. vet. Ratka Sukare sadrži sve elemente i u skladu je sa
52 propisanim zahtevima za završenu doktorsku disertaciju.
53
54

55 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**
56
57

58 Istraživanjem sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije, po prvi put u Srbiji, analiziran je
59 epizootiološko-epidemiološki značaj šakala (*Canis aureus*) kao potencijalnih rezervoara za
60 uzročnike zoonoza koje se prenose vektorima. Dobijeni rezultati ukazali su na potencijalnu

1 ulogu šakala kao domaćina rezervoara za *B. canis*, glavnog uzročnika babezioze pasa u
2 Evropi, za *A. phagocytophilum*, široko rasprostranjenog i značajnog patogena sa aspekta
3 humane i veterinarske medicine i skrenuta je pažnja na šakale kao potencijalne rezervoare
4 uzročnika lajšmanioze u našoj zemlji. Od epizootiološkog značaja je i nalaz drugih patogena
5 (*B. microti*, *Borrelia spp.* i *A. marginale*) u krpeljima sakupljenim sa šakala. S obzirom da su
6 šakali dobri domaćini za više vrsta krpelja pokazano je da su oni indirektno, održavanjem i
7 širenjem populacije krpelja uključeni i u enzootske cikluse oboljenja izazvanih ovim
8 uzročnicima. Iako šakali poslednjih decenija povećavaju svoju brojnost i areal
9 rasprostranjenja u Evropi, do sada postoji mali broj naučnih istraživanja koja su se bavila
10 ulogom šakala u održavanju vektorima prenosivih zoonoza, te zbog toga rezultati ove
11 doktorske disertacije nisu samo od značaja za teritoriju naše zemlje.

12 Značaj i originalnost rezultata dobijenih u sklopu ove doktorske disertacije potvrđena je
13 njihovim objavljivanjem u dva naučna rada, od čega je jedan rad publikovan u vrhunskom
14 međunarodnom časopisu (kategorije M21), a drugi u istaknutom međunarodnom časopisu
15 (kategorije M22).

16
17 Realizacija ove doktorske disertacije sprovedena je u okviru projekta Ministarstva
18 prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Enzootski
19 transmisioni ciklusi patogenih mikroorganizama koje prenose krpelji (OI173006), kojim
20 rukovodi dr Snežana Tomanović.

21
22
23
24
25 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
26 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne):**

27
28
29 Ne

30
31
32
33 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
34 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
35 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
36 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
37 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**
38
39
40

- 41 • Ćirović, D., Chochlakis, D., Tomanović, S., **Sukara, R.**, Penezić, A., Tselentis, Y.,
42 Psaroulaki, A., 2014. Presence of *Leishmania* and *Brucella* species in the golden jackal
43 *Canis aureus* in Serbia. Biomed Res. Int. 2014. doi:10.1155/2014/728516
44 (IF- 2,134, istaknuti međunarodni časopis - M22)
45
46
47 • **Sukara, R.**, Chochlakis, D., Ćirović, D., Penezić, A., Mihaljica, D., Ćakić, S., Valčić, M.,
48 Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tomanović, S., 2018. Golden jackals (*Canis aureus*) as
49 hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. Ticks Tick. Borne. Dis.
50 doi:10.1016/j.ttbdis.2018.04.003
51 (IF- 3.230, vrhunski međunarodni časopis- M21)
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

X PREDLOG:

Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri ponuđene mogućnosti):

- **da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
- ~~da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu~~
- ~~da se doktorska disertacija odbije~~

DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

16.04.2019.

Dr Miroslav Valčić, redovni profesor - mentor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

Dr Snežana Tomanović, naučni savetnik - mentor
Institut za medicinska istraživanja
Univerziteta u Beogradu

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

Dr Duško Ćirović, docent
Biološki fakultet
Univerziteta u Beogradu