

**IZVEŠTAJ O NAUČNOJ ZASNOVANOSTI TEME I PODOBNOSTI KANDIDATA ZA
IZRADU DOKTORSKE DISERTACIJE**

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

Dana 29.05.2024. godine, 257. sednica Nastavno naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godine izbora u zvanje i naziv fakulteta, ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

1. dr Sonja Obrenović, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja, 2022, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
2. dr Dragan Bacić, vanredni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja, 2021, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
3. dr Živoslav Grgić, viši naučni saradnik, Mikrobiologija i imunologija, 2020, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu
4. dr Vesna Ilić, naučni savetnik, Imunologija, 2013, Institut za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu.

Napomena: redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upisuje pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.

**II MENTOR KOJI SE PREDLAŽE I OCENA PODOBNOSTI PREDLOŽENOG MENTORA
(navesti spisak izabranih radova sa kategorizacijom, najviše do 10 radova):**

Mentor – dr Sonja Obrenović, redovni profesor

Profesionalno i naučno interesovanje dr Sonje Obrenović vezano je za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, zoonoze, epizootiologiju, imunodijagnostiku i vakcinologije infektivnih bolesti životinja.

Spisak izabranih radova sa kategorizacijom

1. Marija Manić, Marko Stojiljković, Miloš Petrović, Jakov Nišavić, Dragan Bacić, Tamaš Petrović, Dejan Vidanović, **Sonja Obrenović**, Epizootic features and control measures for lumpy skin disease in south-east Serbia in 2016, Transboundary and Emerging Diseases; 66, 2087–2099, 2019. (M21a)
2. Dejan Laušević, Tamara Ilić, Katarina Nenadović, Dragan Bacić, **Sonja Obrenović**, Seroprevalences of *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii* in Dogs from Montenegro, Acta Parasitologica, 64, 769–778, 2019. (M23)
3. **Obrenović Sonja**, Ristanović Elizabeta, Čekanac Radovan, Radulović Željko, Ilić Vesna, Seroprevalence of IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Belgrade area, Serbia, Acta Veterinaria - Beograd, 65 (1), 99–110, 2015. (M22)
4. **Sonja Obrenović**, Sonja Radojičić, Nataša Stević, Danica Bogunović, Slobodanka Vakanjac, Miroslav Valčić, Seroprevalence of cat leptospirosis in Belgrade (Serbia), Acta Veterinaria - Beograd, 64, (4), 510–518, 2014. (M23)
5. Jelena S. Marić, Drago Nedić, Branislav Vejnović, Lejla Velić, **Sonja Obrenović**, Seroprevalence of serovars of pathogenic *Leptospira* in dogs and red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina, Acta Veterinaria - Beograd, 73 (3), 389–404, 2023. (M23)

III PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Jelena Savo Marić

2. Datum i mesto rođenja, opština, Republika: 13.04.1970. godine, Beograd, Savski venac, Republika Srbija

3. **Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze***: 25.10.2005. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, "Poređenje titra antitijela protiv virusa Gamboro bolesti dva roditeljska jata linije COBB-500 i njihovih potomaka vakcinisanih po istom programu"

4. **Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka***: Zarazne bolesti životinja i zoonoze

IV OBRAZLOŽENI KRITERIJUMI I RAZLOZI NA OSNOVU KOJIH SE ZASNIVA POZITIVNA OCENA DA JE KANDIDAT PODOBAN DA RADI DISERTACIJU (školovanje, stipendije, radna biografija, učešće u projektima, prikaz naučnih i stručnih radova sa kategorizacijom):

Kandidat mr. sci. vet. med. Jelena (Rakita) Marić osnovnu i srednju školu završila je u Banja Luci. Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu upisala je školske 1989/90 godine. Godine 1992. studije je nastavila na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na kome je diplomirala 1998. godine. Poslediplomske studije – magistratura, oblast Patologija i terapija, smer Zarazne bolesti životinja i zoonoze upisala je školske 1998/99. godine na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Magistarski rad pod nazivom „Poređenje titra antitijela protiv virusa Gamboro bolesti dva roditeljska jata linije COBB-500 i njihovih potomaka vakcinisanih po istom programu” odbranila je 2005. godine na Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Od 01.05.1998. godine zaposlena je JU Veterinarskom institutu Republike Srpske "Dr Vaso Butozan" Banja Luka, Bosna i Hercegovina, u laboratoriji za serologiju, čiji je rukovodilac. Naučno istraživački i stručni rad mr. sci. vet. med. Jelene Marić kojim se bavila u proteklom periodu ogledao se kroz aktivno učešće u realizaciji naučno istraživačkih tema i zadataka u svojstvu istraživača na polju problematike epizootologije zaraznih bolesti, dijagnostike virusnih i bakterijskih bolesti domaćih životinja, istraživanjima iz oblasti zdravstvene zaštite domaćih životinja, kao i na usavršavanju i uvođenju novih laboratorijskih metoda vezanih za navedenu problematiku.

U proteklom periodu, u okviru naučno istraživačkog i stručnog rada, pored magistarske teze, mr. sci. vet. med. Jelena Marić je objavila preko 50 naučnih i stručnih radova i učestvovala na preko petnaest edukacija i obuka. Učestvovala je na šest projekata, od kojih su dva međunarodna i četiri nacionalna.

Bibliografija naučnih i stručnih radova sa kategorizacijom:

Radovi objavljeni u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20)

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)

1. Jourdain F, Samy A. M, Hamidi A, Bouattour A, Alten B, Faraj C,... **Marić J**, Robert V, (2019). Towards harmonisation of entomological surveillance in the Mediterranean area. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13, 6,1-28.
2. Jourdain F, Picard M, Sulesco T, Haddad N, Harrat Z, Sawalha S.... **Marić J**, Robert, V, (2018). Identification of mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) an external quality assessment of medical entomology laboratories in the MediLabSecure Network. *Parasites & Vectors*, 11, 1-7.

Rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)

1. Rahola N, Günay F, Öztürk M, Alten B, Aqeel H. A, Saadawi W. K, ...**Marić J**, Robert V, (2022). Assessment of expertise in morphological identification of mosquito species (Diptera, *Culicidae*) using photomicrographs. *Parasite, Journal de La Societe Francaise de Parasitologie* 29, 45.

Rad u međunarodnom časopisu (M23)

1. Santrač V, Nedić D. N, **Marić J**, Nikolić S, Stevanović O, Vasilev S,...Sofronić-Milosavljević L (2015). The first report of *Trichinella pseudospiralis* presence in domestic swine and T. britovi in wild boar in Bosnia and Herzegovina. *Acta Parasitologica*, 60, 3, 471-475.
2. **Marić J**, Nedić D, Vejnović B, Velić L, & Obrenović S (2023). Seroprevalence of serovars of pathogenic leptospira in dogs and red foxes (*Vulpes Vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. *Acta Veterinaria*, 73, 3, 389-404.

Saopštenja na međunarodnim skupovima (M30)

Saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u izvodu M34

1. Despotović D, **Marić J**, Nikolić S, Subić I, Kasagić D, Stevanović O, Knežević D, (2023). Kontrola bjesnila u Republici Srpskoj u 2022. godini. Zbornik kratkih sadržaja 28. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske, 29-30. Trebinje, Republika Srpska, BiH.
2. Kasagić D, **Marić J**, Velić L, Eterović T, Nikolić S, Sladojević Ž, Nedić D, Stevanović O, Subić I, Krneta D, Šerić Haračić S, Hašimbegović S, Čengić B, Ćutuk A, (2021). Epidemiološka situacija afričke i klasične kuge svinja u Bosni i Hercegovini od 2019 - 2020. godine, Zbornik kratkih sadržaja, 26. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 55-56, Teslić, Republika Srpska, BiH.
3. Nedić D, Knežević D, Stevanović O, Lukić N, Savić K, Kasagić D, Nikolić S, **Marić J**, Golić B, Santrač V, Despotović D, Bajagić B, Krneta D, Sladojević Ž, (2020). Pregled veterinarsko epidemiološke situacije u Republici Srpskoj u 2019. godini, prije pojave bolesti Covid-19. Zbornik kratkih sadržaja, 25. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 18-21, Teslić, Republika Srpska, BiH.
4. **Marić J**, Stevanović O, Nikolić S, Krneta D (2020). Pobačaji preživara – značajno prisustvo uzročnika Chlamydomphila abortus Zbornik kratkih sadržaja, 25. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 42-43, Teslić, Republika Srpska, BiH.
5. Nedić D, Stevanović O, Oklješa D, Savić K, Knežević D, **Marić J**, Nikolić S, Kasagić D, Golić B, Despotović D, Krneta D, Sladojević Ž, (2021). Epizootološka situacija u Republici Srpskoj u 2020. godini Zbornik kratkih sadržaja, 26. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 17-24, Teslić, Republika Srpska, BiH.
6. Nedić D, Stevanović O, **Marić J**, Santrač V, Golić B, Kasagić D, Nikolić S, Šević K, Lukić N, Knežević D, Sladojević Ž, (2019). Pregled veterinarsko epidemiološke situacije u Republici Srpskoj u 2018. godini, Zbornik kratkih sadržaja, 24. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina), 21-22, Bijeljina, Republika Srpska, BiH.
7. Nedić D, Cvetnić Ž, Valčić M, Kasagić D, Nikolić S, **Marić J**, Stevanović O, Panić I, Krneta D, Despotović D, Santrač V, Sladojević Ž, (2019). Afrička kuga svinja – rasprostranjenost u Evropi i epizootološke mjere za sprečavanja pojave i širenja, Zbornik kratkih sadržaja 24. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina), 31-36, Bijeljina, Republika Srpska, BiH.
8. **Marić J**, Krneta D, (2019). Detekcija antitijela protiv Chlamydomphila abortus kod preživara sa anamnezom pobačaja, Zbornik kratkih sadržaja, 24. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina), 49-50, Bijeljina, Republika Srpska, BiH.
9. Kasagić D, **Marić J**, Stevanović O, Subić I, Nikolić S, Despotović D, (2019). BVDV infekcija u zapaćima goveda u Republici Srpskoj, Zbornik kratkih sadržaja 24. godišnje savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (Bosna i Hercegovina), 53-54, Bijeljina, Republika Srpska, BiH.

Radovi objavljeni u naučnim časopisima nacionalnog značaja (M50)

Rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M51)

1. Stevanović O, **Marić J**, Nedić D (2015). Seroprevalenca paratuberkuloze goveda u Republici Srpskoj – Bosni i Hercegovini i potreba za aktivnim nadzorom sa ciljem kontrole bolesti. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, XV, 1, 158-178.
2. Golić B, Stevanović O, Nedić D, N, **Marić J**, (2016). Serological survey of avian influenza virus infection of backyard chickens in Bosnia and Herzegovina. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 19, 4, 328-333.

Saopštenja na nacionalnim skupovima (M60)

Rad saopšten na skupu nacionalnog značaja štampan u izvodu (M64)

1. Velić L, **Marić J**, Dukić B, Sladojević Ž, Eterović T, Hadžović Dž, (2018). Bruceloza u Bosni i Hercegovini, Zbornik kratkih sadržaja, 23. godišnje Savjetovanje veterinara Republike Srpske, 25-26, Teslić, Republika Srpska, BiH.
2. Stevanović O, Šević K, **Marić J**, Krneta D, Kasagić D, Nedić D, Sladojević Ž, (2018). Epidemiologija bolesti plavog jezika kod ovaca: rezultati sistematskog nadzora u Republici

1 Srpskoj Zbornik kratkih sadržaja, 23. godišnje Savjetovanje veterinara Republike Srpske, 53-
2 54, Teslić, Republika Srpska, BiH.

3 3. Nedić D, Golić B, Dojčinović S, Kalaba V, Ilić T, Brkić Z, Knežević D, Kasagić D, Sladojević
4 Ž, Santrač V, **Marić J**, Stevanović O, (2018). Zoonozni patogeni u 2017. godini u Republici
5 Srpskoj, Zbornik kratkih sadržaja, 23. godišnje Savjetovanje veterinara Republike Srpske, 47-
6 48, Teslić, Republika Srpska, BiH.

7 4. **Marić J**, Obrenović O, Nedić D, (2017). Psi kao značajna karika u lancu širenja
8 leptospiroze. Zbornik kratkih sadržaja, 22. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske
9 medicine Republike Srpske (BiH), sa međunarodnim učešćem. 25-28, Teslić, Republika
10 Srpska, BiH.

11 5. **Marić J**, Stevanović O, Špičić S, Sladojević Ž, (2017). Prikaz slučaja bruceloze u mliječnih
12 goveda uzrokovane vrstom *Brucella melitensis*. Zbornik kratkih sadržaja, 22. godišnje
13 Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 51-52, Teslić, Republika
14 Srpska, BiH.

15 6. Nikolić S, Goletić T, **Marić J**, Sladojević Ž, Kasagić D, Santrač V, Nedić D, Stevanović O,
16 (2017). Prvi slučaj visokopatogene influence ptica H5N8 u Republici Srpskoj – Bosna i
17 Hercegovina. Zbornik kratkih sadržaja, 22. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske
18 medicine Republike Srpske (BiH), 23-24, Teslić, Republika Srpska, BiH.

19 7. Stevanović O, Subić I, **Marić J**, Santrač V, Nedić D, (2016). Monitoring nad klasičnom
20 kugom svinja u populaciji divljih svinja na teritoriji Republike Srpske (BiH). Zbornik kratkih
21 sadržaja, 21. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH),
22 20-21, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

23 8. Nedić D, Golić B, Nikolić S, Dojčinović S, Stevanović O, Kasagić D, Kalaba V, **Marić**,
24 (2016). Pregled pojave salmoneloza u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja, 21.
25 godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 18-19, Banja
26 Luka, Republika Srpska, BiH.

27 9. Nedić D, **Marić J**, Stevanović O, Kasagić D, Trkulja T, Nikolić S, Babić R, (2016). Pregled
28 veterinarsko epidemiološke situacije u Republici Srpskoj u 2015. godini. Zbornik kratkih
29 sadržaja, 21. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH),
30 16-17, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

31 10. Stevanović O, **Marić J**, Nedić D, (2015). Seroprevalenca paratuberkuloze goveda u
32 Republici Srpskoj-Bosni i Hercegovini i potreba za aktivnim nadzorom sa ciljem kontrole
33 bolesti. Zbornik kratkih sadržaja, 20. Jubilarno godišnje Savjetovanje doktora veterinarske
34 medicine Republike Srpske (BiH), 29-30, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

35 11. Nikolić S, Nedić D, Santrač V, Babić R, **Marić J**, (2015). Analiza monitoringa bjesnila
36 nakon oralne vakcinacije lisica na teritoriji Republike Srpske. Zbornik kratkih sadržaja, 20.
37 Jubilarno godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 35-
38 36, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

39 12. Brkić Z, Ilić T, **Marić J**, Stevanović O, Nedić D, (2015). Rezultati seroloških ispitivanja u
40 JU Veterinarskom institutu Republike Srpske "Dr Vaso Butozan" tokom 2014. godine. Zbornik
41 kratkih sadržaja, 20. Jubilarno godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine
42 Republike Srpske (BiH), 33-34, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

43 13. **Marić J**, Santrač V, Nikolić S, Stevanović O, Nedić D, (2015). Leptospiroza u Republici
44 Srpskoj tokom 2014-2015. Zbornik kratkih sadržaja, 20. jubilarno godišnje Savjetovanja
45 doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH), 31-32, Banja Luka, Republika Srpska,
46 BiH.

47 14. Nedić D, Rodoljub T, **Marić J**, Santrač V, Nikolić S, Babić R, Subić I, Stevanović O,
48 (2015). Zoonoze, profesionalni rizik za veterinare. Zbornik kratkih sadržaja, 20. jubilarno
49 godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske (BiH),. 25-26, Banja
50 Luka, Republika Srpska, BiH.

51 15. **Marić J**, Ilić T, Brkić Z, Santrač V, Trkulja R, Nedić D, (2013). Leptospira hardjo - rezultati
52 aktivno sprovedenog serološkog nadzora goveda, Zbornik kratkih sadržaja, 18. godišnje
53 Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske, 22-23, Teslić, Republika
54 Srpska, BiH.

55 16. Trkulja R, Nedić D, Golić B, Kasagić D, Santrač V, **Marić J**, (2013). Efekti programa
56 kontrole zdravstvenog stanja životinja u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja, 18.

1 godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske, 15-16, Teslić,
2 Republika Srpska, BiH.

3 17. Santrač V, Nedić D, **Marić J**, Nikolić S, Vasilijev S, Cvetković J, Sofronić Lj, Micić S,
4 Stanimirović A, Nedić S, Todorović V. (2013). Mogu li dva žarišta trihineloze sa nalazom
5 *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella pseudospiralis* argumentovati isključivanje
6 trihineloskopije u rutinskoj veterinarskoj dijagnostici. Zbornik kratkih sadržaja, 18. godišnje
7 Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske, 21-22, Teslić, Republika
8 Srpska, BiH.

9 18. Santrač V, Nedić D, **Marić J**, Kasagić D, Nikolić S, Babić R, Trkulja R, (2013). Izazov
10 nazvan Šmalenberg virus (Schmallenberg virus) od metagenomike u Njemačkoj do
11 dijagnostičke spremnosti u BiH. Zbornik kratkih sadržaja, 18. godišnje Savjetovanje doktora
12 veterinarske medicine Republike Srpske, 24-25, Teslić, Republika Srpska, BiH.

13 19. Trkulja R, **Marić J**, (2011). Kontrola IAK-a u Republici Srpskoj, Zbornik kratkih sadržaja,
14 16. godišnje Savjetovanje doktora veterinarske medicine Republike Srpske, 31-32, Teslić,
15 Republika Srpska, BiH.

16 20. **Marić J**, Santrač V, Trkulja R, Despotović D, Kubelka D, (2010). Infektivna anemija
17 kopitara: enzootija koja zahtjeva strateški pristup veterinarskog servisa. Zbornik kratkih
18 sadržaja 15. godišnje Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 29-30, Teslić, Republika
19 Srpska, BiH

20 21. Mitrović N, Nedić N D, Bijelić S, Marković T, **Marić J**, (2006). Pojava klasične kuge svinja
21 na prostoru Republike Srpske u periodu 2004-2005. godine. Zbornik kratkih sadržaja, 18.
22 godišnje Savjetovanje veterinaru Srbije, 123-124, Zlatibor, Republika Srbija.

23 22. Santrač V, **Marić J**, Nedić D, Trkulja R, Bjelajac B, Golubović S, (2006). Bjesnilo 2005-
24 2006 u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja, 12. godišnje Savjetovanje veterinaru
25 Republike Srpske, 51-52, Teslić, Republika Srpska, BiH.

26 23. Santrač V, **Marić J**, Mitrović N, Nedić D, Trkulja R, Bjelajac B, Golubović S, (2006).
27 Bruceloza - 2001-2006 u RS – potreba za efikasnijim mjerama. Zbornik kratkih sadržaja, 12.
28 godišnje Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 22-23, Teslić, Republika Srpska, BiH.

29 24. Nedić D, Mitrović N, Trkulja R, Bjelajac B, **Marić J**, Santrač V, Kadirić V, (2006). Analiza
30 veterinarsko - epidemiološke situacije i novih veterinarskih mjera u Republici Srpskoj. Zbornik
31 kratkih sadržaja, 12. godišnje Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 17-19, Teslić,
32 Republika Srpska, BiH.

33 25. **Marić J**, Mitrović N, Santrač V, Sarić M, Despotović D, Nedić D, Kubelka D, (2005).
34 Seroprevalencija bruceloze preživara u Republici Srpskoj od 2001 do 2004. Seroprevalence
35 of brucellosis in ruminants in Republic of Srpska from 2001 to 2004. Prvi simpozijum o
36 zoonozama sa međunarodnim učešćem, Sarajevo, BiH.

37 26. **Marić J**, Santrač V, Šarić M, Bjelejac B, Golubović S, Đerić Z, Kubelka D, (2005). Velike
38 epidemije i sporadični slučajevi Q-groznice u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja, 11.
39 godišnje Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 19-20, Teslić, Republika Srpska, BiH.

40 27. **Marić J**, Santrač V, Despotović D, Mitrović N, Nikolić S, Kubelka D, Bjelica N, (2004).
41 Primjena tri serološka testa u dijagnostici bruceloze. Zbornik kratkih sadržaja 10. godišnje
42 Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 49-50, Teslić, Republika Srpska, BiH.

43 28. Mitrović N, Nedić N D, **Marić J**, Santrač V, (2004). Epizootička situacija bolesti plavog
44 jezika u 2002-2003 godini u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja, 10. godišnje
45 Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 61-62, Teslić, Republika Srpska, BiH.

46 29. Despotović D, **Marić J**, Santrač V, Bjelajac B, Nikolić S, Kubelka D, (2004). Bruceloza
47 koza i ovaca u Republici Srpskoj. Zbornik kratkih sadržaja 10. godišnjeg Savjetovanja
48 veterinaru Republike Srpske, 51-52, Teslić, Republika Srpska, BiH.

49 30. Despotović D, Šarić M, **Marić J**, Kubelka D, (2004) Postmortalna dijagnostika trihineloze -
50 mogućnost greške. Zbornik kratkih sadržaja 10. godišnjeg Savjetovanja veterinaru Republike
51 Srpske, 101-102, Teslić, Republika Srpska, BiH.

52 31. **Marić J**, Despotović D, Santrač V, Nikolić S, Mitrović N, Kubelka D, (2004). Bruceloza
53 koza i ovaca u Republici Srpskoj. Zbornik radova i kratkih sadržaja 6. Epizootički dani,
54 Vlasinsko jezero, Republika Srbija.

55 32. Santrač V, **Marić J**, Despotović D, Nikolić S, Kubelka D, (2003). Bruceloza ovaca na
56 području jugoistočne Evrope 2002. godine sa osvrtom na situaciju u Republici Srpskoj.

- Zbornik kratkih sadržaja, 9. godišnje Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, 30-31, Teslić, Republika Srpska, BiH.
33. Santrač V, **Marić J**, Despotović D, Hevešević A, Tutnjilović D, Kubelka D, (2003). Zarazni ektim ovaca i koza u diferencijalnoj dijagnostici Plavog jezika. Zbornik radova i kratkih sadržaja 5. Epizootiološki dani, 195-201, Subotica, Republika Srbija.
34. Santrač V, **Marić J**, Nikolić S, Despotović D, Šarić M, Nedić D, Bjelajac B, (2003). Serološka ispitivanja raširenosti Q – groznice kod goveda u Republici Srpskoj u periodu 2001–2002. Zbornik radova i kratkih sadržaja 15. Savetovanja veterinaru Srbije, 167-168. Zlatibor, Republika Srbija.
35. Nikolić S, Santrač V, **Rakita J**, Despotović D, (2001). Raširenost Q groznice kod ovaca i goveda na području Republike Srpske. Zbornik kratkih sadržaja Prvog kongresa veterinaru Republike Srpske, 36-37, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.
36. Santrač V, **Rakita J**, Despotović D, Nikolić S, (2001). Bjesnilo u Republici Srpskoj u poslijeratnom periodu 1995-2000. Zbornik kratkih sadržaja Prvog kongresa veterinaru Republike Srpske, 57-58, Banja Luka, Republika Srpska, BiH.

Stručne edukacije, obuke i projekti

1. Antropozoonoze od prekograničnog značaja (bruceloza, Q-groznicu, tularemiju, hemoragijsku groznicu sa bubrežnim sindromom, TBC goveda i leptospirozu - *on line* edukacija. JZU Institut za javno zdravstvo Republike Srpske, 2022.
2. Regional Training Course on African Swine Fever (ASF) Laboratory diagnosis and serological screening, (IAEA) Sarajevo, 2022.
3. Event - Interregional Training Course on Verification of SOPs for New Serological and Molecular Techniques, TN-INT5157-2201282, (IAEA), 2022.
4. Interdisciplinarni simpozij "20 godina bruceloze u Bosni i Hercegovini" sa međunarodnim sudjelovanjem, Kupres, 2021.
5. MediLabsecure workshop on vector identification & surveillance, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia, 2019.
6. Training and Use of Sentry 200 Fluorescence Polarisation Instrument and Brucella FPA Test, Kraljevo, 2018
7. *Trichinella* spp. detection based on molecular and immunological methods, European Union Reference Laboratory for Parasites, Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy, 2017.
8. MediLabSecure Training Course on mosquito vector of arboviruses, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, RS, 2015.
9. Uticaj mikotoksina na zdravlje i proizvodne sposobnosti visoko mliječnih krava, Menadžment u veterinarskoj medicini, Banja Luka, 2013.
10. Training Course on Brucellosis Bacteriology held in the Animal Brucellosis Laboratory CITA, (IAEA) Zaragoza, Spain, 2012.
11. Trening – Planiranje i realizacija PT aktivnosti, Beograd, 2012.
12. Trening iz dijagnostike Bluetongue - ELISA (IDEXX, BOSNA VET, d.o.o.), Zenica, Bosna i Hercegovina, 2008.
13. Training of maintenance of measuring equipment (Alba, Slovenia), Banja Luka, april 2010.
14. Edukacija – QM (Menadžment kvaliteta) – GTZ, Banja Luka, 2003.
15. Trening iz dijagnostike Newcastle bolesti, HI test, Veterinarski fakultet Zagreb, Hrvatska, 2000.
16. Seminar on the control of classical swine fever and evaluation of the inter/laboratory comparison test 1999, Latvian national Veterinary laboratory, Riga, Latvia, 1999.
17. Trening iz dijagnostike leptospiroze - MAT test, Naučni institut za veterinarstvo Beograd, Srbija, 1998.
18. Trening FMD/SVD, Institute for Animal Health, Pirbright, UK, 1998

Međunarodni projekti

1. SEE-ERA NET Pilot Joint Nr 06-1000031-9633; program special purpose SEE ERA. Net Phenotypic and genotypic characterization of strains of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolated from sheep and goats originating from Greece, Serbia, Bosnia and Herzegovina, 2006 - 2009 (European Commission)
2. The MediLabSecure project, 2014-2022 (EU).

Nacionalni projekti:

1. Ispitivanje proširenosti, kliničkih formi, sekvela i dijagnostičkih metoda infekcije uzročnikom Q-groznice (*C. burnetii*), 2005 (Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske).
2. Infektivna anemija kopitara, 2008-2009 (Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske).
3. Epidemiološko i epizootiološko ispitivanje influence ptica i salmoneloze kod živine u Republici Srpskoj, 2011 (Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srpske i Ministarstvo zdravlja i socijalne zaštite Republike Srpske).
4. Razvoj i optimizacija „in house“ ELISA testa u svrhu dijagnostike leptospiroze kao zoonoze od posebnog značaja za zdravlje ljudi i životinja, 2015-2017 (Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske).

V OCENA PODOBNOSTI TEME:

1. **naslov disertacije:** Ispitivanje pouzdanosti seroloških i molekularnih metoda u otkrivanju infekcija pasa izazvanih leptospirama i njihov značaj u procjeni epizootiološke situacije

2. **predmet istraživanja (bez literaturnih navoda, do 700 reči):**

Leptospiroza je jedna od najčešćih zoonoza rasprostranjena širom sveta i trenutno ima najveći značaj u tropskim i zemljama u razvoju, ali se očekuje porast incidencije i u umerenim područjima kao rezultat klimatskih promena koje sve češće dovode do ekstremnih vremenskih događaja (poplave i porast temperature), ali i kontinuiranog širenja urbanih područja koje dovodi do povećanog kontakta sa divljim životinjama. Tačan broj obolelih ljudi u svetu od leptospiroze je nepoznat, pre svega zbog lošeg nadzora i problematične dijagnostike. Uzročnici leptospiroze su bakterije koje pripadaju rodu *Leptospira* u kome se trenutno nalazi 68 vrsta od kojih su 37 patogene. Na osnovu lipopolisaharidnog antigena (LPS) utvrđeno je više od 300 serovarijeteta svrstanih u 28 serogrupa. Genotipizacija i serotipizacija su dve slabo povezane metode za klasifikaciju leptospira, imajući u vidu da isti serovarijetet može pripadati različitim vrstama.

Životni ciklus patogenih leptospira je složen i uključuje prirodno okruženje, asimptomatske rezervoare i osetljive domaćine. Epizootiološki značaj bilo koje vrste životinja kao izvora leptospira često je u funkciji lokalne ekologije i dinamičkih promena u prevalenciji i virulenciji serovarijeteta leptospira. Glodari su najčešći rezervoari i prenosioci leptospira i važan su izvor infekcije u urbanim sredinama. U ruralnim područjima, pored glodara, brojne domaće i divlje životinje mogu da se inficiraju leptospirama, imajući u vidu da infektivni agens nije ograničen na jednog domaćina. Iako za neke serovarijetete leptospira postoji specifičnost za domaćina, odnos serovarijetet/domaćin nije apsolutan. Svaki serovarijetet je prilagođen jednoj ili većem broju vrsta sisara koji predstavljaju „domaćine za održavanje“, i koji izlučuju leptospire urinom bez ispoljavanja kliničkih simptoma, najčešće tokom čitavog života. Kod „slučajnih domaćina“, obično dolazi do pojave kliničkih simptoma praćenih razvojem visokog titra specifičnih antitela i pojavom leptospiurije koja retko traje duže od nekoliko meseci. Poznavanje najčešćih serovarijeteta i njihovih rezervoara neophodno je za razumevanje epizootiologije leptospiroze u određenom području. Do infekcije leptospirama najčešće dolazi kontaktom sa urinom ili tkivima zaraženih rezervoara, ili sa kontaminiranom zemljom, hranom ili vodom, polnim putem i transplacentarno. Leptospire obično prodiru u organizam domaćina preko lezija na koži ili sluzokoži, nakon čega nastaje kratkotrajna leptospiremija (4 do 7 dana), a zatim leptospire uglavnom kolonizuju bubrežne tubule i izlučuju se urinom nedeljama i mesecima. Klinički simptomi variraju od akutne febrilne bolesti, do teške, ponekad fatalne bolesti sa bubrežnom insuficijencijom, žuticom, krvarenjem i vaskularnim kolapsom. Imunski odgovor domaćina na infekciju je posredovan uglavnom preko humoralnih mehanizama, gde su protektivna aglutinujuća antitela usmerena uglavnom na LPS. Metode dijagnostike leptospiroze, baziraju se ili na detekciji uzročnika ili dokazivanju specifičnih antitela. Izolacija leptospira je problematična i dugotrajna (16 do 26 nedelja) i ne preporučuje se kao metoda rutinske dijagnostike. Serološke metode se najčešće koriste za potvrđivanje kliničke dijagnoze, za utvrđivanje prevalencije na nivou stada i u epizootiološkim istraživanjima. Specifična antitela se pojavljuju obično od 2 do 10 dana nakon pojave simptoma i mogu perzistirati mesecima i godinama. Test mikroskopske aglutinacije (MAT) je referentni test koji zahteva održavanje živih kultura leptospira, komplikovan je za izvođenje i zahteva stručnost u proceni rezultata. MAT nije specifičan za određenu klasu imunoglobulina, ali je njime moguće utvrditi antitela specifična za određenu serogrupu/sеровarijetet leptospira. Pri izvođenju testa treba koristiti serovarijetete koji perzistiraju na određenom području. Testovi koji uključuju veliki broj serovarijeteta su osetljiviji, ali zahtevniji za izvođenje. Uprkos ograničenjima MAT testa,

serološka istraživanja i nadzor kod životinja sprovedeni ovom metodom mogu dati važne informacije o cirkulišućim serovarijetetima na određenom području, identifikaciji potencijalnih rezervoara i utvrđivanju enzootskih područja. Međutim, serološki nadzor kod životinja može biti problematičan imajući u vidu da mnogi rezervoari nemaju detektabilne titre antitela. Ovo je razlog da se u epizootiološkim istraživanjima, ali i dijagnostici sve češće koriste molekularne metode. Testovi zasnovani na lančanoj reakciji polimeraze (PCR, real-time PCR) daju mogućnost utvrđivanja infekcije pre pojave specifičnih antitela, ali i utvrđivanja izlučivača leptospira koji mogu biti serološki negativni. Imajući u vidu brzu progresiju leptospiremijske u leptospirurije, treba voditi računa o vrsti uzoraka za testiranje. Zanimljivo je da status leptospiroze je delimično posledica ograničene tačnosti i pristupačnosti dijagnostičkih metoda. Neophodna su poboljšanja u dijagnostici da bi se bolje razumela složena epizootiologija, i omogućio nadzor i kontrola prenosa od supklinički inficiranih rezervoara.

3. podaci iz izabrane literature (sa navodima iz literature prikazanih u okviru teksta i spisikom referenci korišćenih u tekstu, do 700 reči i do 10 referenci):

Leptospiroza predstavlja značajan problem javnog zdravlja na globalnom nivou, sa povećanjem incidencije kako u zemljama u razvoju, tako i u razvijenim zemljama (Sykes i sar, 2023). Identifikacija serovarijeteta leptospira koji cirkulišu na određenom epizootiološkom području je neophodna za dijagnostiku, utvrđivanje rezervoara, nadzor, otkrivanje novih vrsta, prevenciju i razvoj efikasnih vakcina. Trenutna saznanja o serovarijetetima koji cirkulišu na određenom području uglavnom se zasnivaju na rezultatima MAT testa (Sykes i sar, 2023). Serološko ispitivanje pasa, zbog njihove bliske veze sa ljudima, može biti koristan metod u cilju utvrđivanja geografske distribucije patogenih serovarijeteta leptospira, otkrivanja novih žarišta koja predstavljaju potencijalnu opasnost za humanu populaciju i pravovremenog preduzimanja preventivnih mera. Zaraženi psi retko predstavljaju direktne izvore infekcije za humanu populaciju, ali imaju značajnu ulogu u epizootiologiji, imajući u vidu da mogu prenositi leptospire na velike udaljenosti izlučujući veliki broj bakterija urinom (1.6×10^5 dnevno), mesecima i godinama (Sykes i sar, 2023; Spangler i sar, 2020). Međutim, rezultate seroepidemioloških studija je teško povezati sa prevalencijom hronične infekcije i leptospirurije, koja je najčešće praćena niskim titrom antitela ili negativnim serološkim nalazom (Altheimer i sar, 2020).

Serološke metode se najčešće koriste za potvrđivanje kliničke dijagnoze i u epizootiološkim istraživanjima (WOAH, 2021; Sykes i sar, 2023). MAT je test niske osetljivosti i visoke specifičnosti. Test je izbora za potvrdu aktivne infekcije, i identifikacije infektivnih serovarijeteta koji se može prilagoditi epizootiološkoj situaciji, jer se panel serovarijeteta može modifikovati uključivanjem serovarijeteta koji perzistiraju u određenom području (WOAH, 2021; Sykes i sar, 2023). Brojni nedostaci MAT testa kao što su: nemogućnost dijagnostike rane infekcije, identifikacije izlučivača leptospira, nemogućnost razlikovanja IgM i IgG antitela, moguća unakrsna reaktivnost između pojedinih serovarijeteta, održavanje živih kultura brojnih serovarijeteta i dr., povećalo je poslednjih decenija interes za redefinisane standarde za laboratorijsku dijagnozu leptospiroze, koji uključuju dve opcije: kombinaciju molekularnih testova i MAT (Martin i sar, 2022), i molekularnih testova i ELISA testa (Niloofa i sar, 2021; Fortes-Gabriel i sar, 2022). Trenutno postoji potreba za razvojem seroloških testova, koji se mogu rutinski izvoditi u kliničkim laboratorijama u endemskim područjima gde su serovarijeteti poznati (Fortes-Gabriel i sar, 2022). Jednostavnost izvođenja i mogućnost da se u kratkom periodu pregleda veliki broj uzoraka čine test indirektno imunofluorescencije (IFA) i ELISA test serološkom alternativom kompleksnom i napornom MAT testu za dijagnostički skrining i za epidemiološke studije u zemljama sa ograničenim resursima (Niloofa i sar, 2021; Fortes-Gabriel i sar, 2022). Antigen za ELISA test se može pripremati od celih bakterijskih ćelija, proteina spoljašnje membrane (OMP) ili LPS. Testovi pripremani od antigena koji se sastoje od mešavine celih ćelija više serovarijeteta detektuju antitela protiv, među serovarijetetima unakrsno reaktivnih proteina, ali i LPS-a. Upotreba samo LPS ima svoje prednosti, ali i ograničenja usled varijacija u antigenskim svojstvima na nivou serovarijeteta. Povećanjem broja serovarijeteta kao antigena može se povećati osetljivost ELISA testa (Niloofa, i sar, 2021). Zbog niske osetljivosti, preporuka je da MAT ne koristi kao standard za procenu specifičnosti i osetljivosti drugih seroloških testova (WOAH, 2021; Sykes i sar, 2023). Detekcija DNK leptospira u urinu i bubrezima je važna za identifikaciju rezervoara, imajući u vidu da leptospirurija i renalno kliconoštvo ne moraju biti praćeni seropozitivnošću (Altheimer i sar, 2020). PCR i real-time PCR testovi najčešće koriste kao ciljnu sekvencu gene specifične

za patogene vrste *Leptospira* spp., kao što su *OmpL1*, *LipL32*, *LipL36* i *LipL41* ili gene zajedničke patogenim i saprofitskim vrstama (Martin i sar, 2022). Real-time PCR sa ciljnim genom *lipL32* je specifičan za otkrivanje patogenih *Leptospira* i ima prednosti u poređenju sa PCR testom, zbog kraćeg vremena izvođenja i veće osetljivosti. Međutim, u rutinskoj dijagnostici, pre svega zbog niske cene, često se koristi PCR sa prajmerima specifičnim za *rrs* gen, kojim nije moguće razlikovati patogene od nepatogenih vrsta *Leptospira* (Merien i sar, 1992; Sykes i sar, 2023). Primenom multiplex PCR sa dva para prajmera: G1/G2 – ciljni gen sec Y, detektujuju se patogene vrste: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. meyerii*, dok se primenom B64-I/B64-II - ciljni gen *flaB* detektuje i *L. kirschneri* (Bal i sar, 1994). Generalno, molekularni testovi su značajno poboljšali dijagnostiku leptospiroze, ali su potrebna dalja ispitivanja o kliničkim i epidemiološkim implikacijama molekularne detekcije *Leptospira* u različitim uzorcima. Uprkos velikom potencijalu PCR metoda, osnovni nedostatak je u nemogućnosti većine da identifikuju infektivni serovarijetet (Stoddard i sar, 2009; Martin i sar, 2022).

Spisak referenci

1. Altheimer K, Jongwattanapisan P, Luengyosuechakul S, Pusoonthornthum R, Prapasarakul, N, Kurilung A, Hartmann K, *Leptospira* infection and shedding in dogs in Thailand, *BMC vet res*, 16, 11-13, 2020.
2. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeerl RA, De Meza-Brewster J, Korver H, Terpstra WJ, Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis, *J Clin Microbiol*, 32,8,1894-1898, 1994.
3. Fortes-Gabriel E, Soares Guedes M, Shetty A, Klazer Gomes Ch, Carreira T, Vieira ML, Esteves L, Mota-Vieira L, Gomes-Solecki M, Enzyme immunoassays (EIA) for serodiagnosis of human leptospirosis: specific IgG3/IgG1 isotyping may further inform diagnosis of acute disease, *PLoS Negl Trop Dis*, 16, 2, 1-16, 2022.
4. Martin EA, Heseltine JC, Creevy KE, The Evaluation of the Diagnostic Value of a PCR Assay When Compared to a Serologic Micro-Agglutination Test for Canine Leptospirosis, *Front Vet Sci*, 26,9,15, 2022.
5. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I, Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples, *J Clin Microbiol*, 30, 9, 2219-2224, 1992.
6. Niloofa R, Karunanayake L, de Silva HJ, Premawansa S, Rajapakse S, Handunnetti S, Development of in-house ELISAs as an alternative method for the serodiagnosis of leptospirosis, *Int J Infect Dis*, 105, 135-140, 2021.
7. Spangler D, Kish D, Beigel B, Morgan J, Gruszynski K, Naikare H, Verma A, Leptospiral shedding and seropositivity in shelter dogs in the Cumberland Gap Region of Southeastern Appalachia, *Plos one*, 15,1, 2020.
8. Stoddard RA, Jay E. Gee JE. Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR, Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 64, 247–255, 2009.
9. Sykes JE, Francey T, Schuller S, Stoddard RA, Cowgill LD, Moore GE, Updated ACVIM consensus statement on leptospirosis in dogs, *J Vet Intern Med*, 37, 1966–1982, 2023.
10. WOAHH Terrestrial Manual, Leptospirosis, Chapter 3.1.12, 2021.

4. cilj istraživanja (opisno):

- Ispitivanje seroprevalencije na *Leptospira* spp. u populaciji pasa na području Banja Luke i Prijedora (Republika Srpska);
- Priprema i validacija sopstveno pripremljenih seroloških testova, ELISA i IFA za dijagnostiku leptospiroze pasa;
- Utvrđivanje prevalencije izlučivanja *Leptospira* urinom pasa molekularnim metodama i sticanje uvida o značaju pasa kao rezervoara i izvora infekcije;
- Utvrđivanje korelacija između serološkog statusa pasa i izlučivanja uzročnika putem urina;
- Utvrđivanje primenljivosti i pouzdanosti različitih seroloških (MAT, IFA, ELISA) i molekularnih metoda (PCR i real-time PCR) u otkrivanju infekcija pasa izazvanih leptospirama i analizi epizootičke situacije.

5. očekivani rezultati:

Na osnovu sprovedenih istraživanja očekuje se da se:

- Ustanovi seroprevalencija na *Leptospira* spp. u populaciji pasa na ispitivanom području.
- Izvrši priprema i validacija ELISA i IFA test od serovarijeteta koji najčešće cirkulišu u populaciji pasa na ispitivanom području, koji bi mogli naći svoju primenu u dijagnostičke i istraživačke svrhe u laboratorijama koje nemaju potencijal za održavanje živih kultura *Leptospira* spp.
- Utvrdi značaj primene različitih molekularnih metoda u ispitivanju urina pasa u enzootskim područjima u cilju utvrđivanja njihovog značaja kao izvora infekcije sa *Leptospira* spp.
- Dobijeni rezultati treba da pokažu stepen saglasnosti i pouzdanost različitih metoda u dijagnostici leptospiroze i ukažu da sigurna i tačna dijagnoza ne treba da se oslanja na pojedinačan test, već treba da se bude rezultat višestrukih dijagnostičkih pristupa, kao i da direktne i indirektne laboratorijske metode treba da se koriste zajedno da bi se utvrdila prava prevalencija infekcije kod određene vrste domaćina i adekvatno analizirala epizootiološka situacija leptospiroze na određenom području.

6. plan istraživanja (prikazan u fazama):

- Prikupljanje uzoraka krvi i urina pasa;
- Obrada prikupljenog materijala, odvajanje krvnih seruma i priprema urina pasa za ekstrakciju DNK;
- Priprema tečne podloge za kultivaciju leptospira;
- Umnožavanje referentnih serovarijeteta *Leptospira* spp. u cilju pripreme antigena sa serološka ispitivanja;
- Ispitivanje krvnih seruma pasa MAT testom;
- Priprema antigena za IFA i ELISA test;
- Priprema i validacija IFA i ELISA testa;
- Ispitivanje seruma pasa pripremljenim serološkim testovima;
- Ispitivanje saglasnosti rezultata dobijenih primenom MAT, IFA i ELISA testa;
- Molekularna detekcija *Leptospira* spp. u uzorcima urina serološki pozitivnih i serološki negativnih pasa primenom PCR i real-time PCR;
- Utvrđivanje saglasnosti rezultata dobijenih PCR i real-time PCR testom;
- Poređenje rezultata dobijenih PCR i real-time PCR testom sa rezultatima seroloških testova, na osnovu kojih će se utvrditi značaj uporedne primene molekularnih i seroloških metoda u proceni epizootiološke situacije i uloge pasa kao potencijalnih rezervoara uzročnika.

7. materijal, metode istraživanja i oprema koja će se koristiti za eksperimentalni rad:

Ispitivanje će se sprovoditi na materijalu poreklom od 200 pasa različitog pola, rase i starosti sa područja Banja Luke i Prijedora. Za rad će se koristiti krvni serumi i urini pasa uzeti tokom sterilizacije. Za serološka ispitivanja krv će biti uzorkovana u sterilne vakutajnere iz *vena cephalica antebrachii*. Nakon spontane koagulacije i centrifugiranja krvni serumi će biti odvajani u Eppendorf mikrotube i do ispitivanja čuvani na temperaturi od -20°C. Uzorci urina u količini 5.0 ml uzimaće su metodom kateterizacije, korišćenjem sterilnih katetera, da bi se izbegla kontaminacija i dostavljati u laboratoriju na +4°C u sterilnim čašama za uzorkovanje urina. Nakon centrifugiranja dobijeni sediment koristiće se za ekstrakciju DNK. Dobijeni ekstrakti čuvaće se na na -20 °C do molekularnih analiza.

Za pripremu antigena i izvođenje seroloških testova koristitiće se deset referentnih serovarijeteta (osam serogrupa) *Leptospira* spp. i to: Pomona (*Pomona* soj, sg. *Pomona*), Australis (*Ballico*, sg. *Australis*), Icterohaemorrhagiae (*RGA*, sg. *Icterohaemorrhagiae*), Grippotyphosa (*Moskva V*, sg. *Grippotyphosa*), Canicola (*Hond Utrecht IV*, sg. *Canicola*), Sejroe (*M84*, sg. *Sejroe*), Bataviae (*Swart*, sg. *Bataviae*), Hardjo (*Hardjobovis*, sg. *Sejroe*), Bratislava (*Jez*, sg. *Australis*), Autumnalis (*Akiyami A*, sg. *Autumnalis*) (*National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Amsterdam, the Netherlands*). Za umnožavanje serovarijeteta koristiće se tečna podloga EMJH (*Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris*). Kulture leptospira će se inkubirati u aerobnim uslovima (*Memmert, Germany*) na temperaturi $28 \pm 1^\circ\text{C}$, tokom 7 do 10 dana. Nakon provere rasta u tamnom polju mikroskopa (*Reichert, Österreich*) i određivanja koncentracija bakterija pomoću McFarland skale umnožene kulture će se koristiti kao antigen za serološke testove. MAT test će se izvoditi i procenjivati prema uputstvu WOA. Granični titar u MAT testu biće 1/100, a svi serumi koji daju pozitivnu reakciju će se titrirati u serijskim razblaženjima do 1/12800. Kao pozitivna kontrola koristiće se sigurno pozitivan

serum psa (*Veterinarski institut Hrvatska*) i referentni pozitivan serum kunića (*Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherland*). Antigen za ELISA test biće pripreman od celih bakterijskih ćelija deset serovarijeteta *Leptospira* spp. na taj način što će se svaki serovarijetet posebno umnožiti u tečnoj podlozi, a zatim će se bakterije inaktivisati formalinom i tretirati toplotom. Antigen će predstavljati meševinu jednakih količina svakog serovarijeteta, a koncentracija proteina u pripremljenom antigenu određivaće se BCA testom (*BCA Protein Assay Kit, BioVision, USA*). Reakcija će se izvoditi u NUNC polistirenskim pločama (*Nunc-Immuno Plate MaxiSorp 21 Surface, Denmark*) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom. Nevezana mesta na ploči blokiraće se sa BSA (*Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, USA*). Kao sekundarno antitelo koristiće se poliklonski IgG kunića na IgG pasa obeleženi peroksidazom (*Anti-Dog IgG Peroxidase, Sigma Aldrich, USA*). Za vizuelizaciju reakcije antitela i antigena koristiće se supstrat 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin (TMB) (*Sigma Aldrich, USA*). Reakcija će se zaustavljati primenom 2M H₂SO₄. Očitavanje optičke gustine vršiće se na talasnoj dužini od 450nm (OD_{λ450}) na aparatu *Tecan Sunrise (Switzerland)*. Postupak validacije ELISA testa uradiće se u dve faze. U prvoj fazi „šah titracijom“ odrediće se optimalna koncentracija antigena sa različitim razblaženjima sigurno pozitivnog seruma psa, a sve koncentracije antigena i svako razblaženje seruma testiraće su u triplicatu, kroz tri uzastopna ponavljanja. U drugoj fazi odrediće se granična vrednost (*cut off*) za ELISA test koja će se izračunati prema formuli $Cut\ off = X + 3SD$, gde je X srednja vrednost OD_{λ450}, 40 seruma zdravih i serološki negativnih pasa, a SD standardna devijacija. Koeficijent varijacije (CV) biće izračunat na osnovu srednje vrednosti OD_{λ450} 20 seruma serološki negativnih pasa rađenih u triplicatu, kroz tri uzastopna ponavljanja prema formuli $SD/X \times 100$. Svi uzorci čija vrednost OD_{λ450} bude na granici *cut off* ± X biće ponovo testirani.

Antigen za IFA test pripremaće se od mešavine jednakih količina deset serovarijeteta *Leptospira* spp.. Kao sekundarno antitelo koristiće se poliklonski antiserum IgG kunića na IgG psa obeleženih fluorescein izotiocijanatom (*FITC, Inep, Zemun*). Određivanje optimalne količine antigena i sekundarnog antitela vršiće se „šah titracijom“ sa različitim razblaženjima pozitivnih seruma. U postupku validacije odrediće se granični titar za IgG pasa. Reakcija će se izvoditi na pločicama sa 10 polja (*Epredia™ PTFE Diagnostic Slides, Fisher Scientific, USA*). Očitavanje reakcije izvešće se korišćenjem fluorescentnog mikroskopa (*Olympus BX, Japan*), na uvećanju 400x.

Utvrđivanje prisustva genoma *Leptospira* spp. u uzorcima urina serološki pozitivnih i serološki negativnih pasa pasa izvešće se primenom konvencionalnog PCR i real-time PCR testa. Ekstrakcija nukleinske kiseline biće izvedena upotrebom komercijalnog kita za ekstrakciju (*QIAamp®DNA Mini Kit, Qiagene, Germany*) prema uputstvu proizvođača.

Konvencionalni PCR izvešće se primenom dva protokola koji su opisani od strane Merien i sar, (1992) i Bal i sar, (1994).

Za protokol prema Merien i sar, (1992) koristiće se oligonukleotidni prajmeri sa sekvencama koji su specifični za *rrs* gen (16S rRNA) (*Invitrogen, Thermo Fischer Scienitfitic, USA*):

- A Lepto - 5'-GGC GGC GCG TCT TAA ACA TG-3'
- B Lepto - 5'-TTC CCC CCA TTG AGC AAG ATT-3'

U reakciji će se koristiti Hot Start TaqMan Master Mix (*Qiagen, Germany*) u koncentraciji od 250 μM i prajmeri (A i B) u koncentraciji od po 10 pM. Navedena smeša će se koristiti za reakciju u količini od 20μl uz dodatak 5 μl izolovanog uzorka DNK. Program na kome će se izvoditi PCR reakcija obuhvataće: inicijalnu ciklus za aktivaciju polimeraze na 94 °C/15 minuta, praćenu sa jednim ciklusom denaturacije na 94 °C /3 minuta, hibridizacije na 63 °C /1,5 minut, ekstenzije na 72 °C/2 minuta. Sledećih 34 ciklusa sastoje se od faze denaturacije na 94 °C /1 minut, hibridizacije na 63 °C /1,5 minut, ekstenzije na 72 °C /2 minuta i završne ekstenzije na 72 °C /10 minuta. Marker od 100 bp koristiće se je kao referenca za veličinu fragmenata (*Thermo Scientific, USA*).

Za PCR protokol prema Bal i sar, (1994) koristiće se dva para prajmera sa sekvencama, G1/G2 specifičnih za gen *sec Y* i B64I/B64-II specifični za *flaB* gen (*Invitrogen, Thermo Fischer Scienitfitic, USA*):

- G1- 5'- CT GAA TCG CTG TAT AAA AGT-3'
- G2 - 5' - GG AAA ACA AAT GGT CGG AAG - 3'
- B64 - I-5'- CT GAA TTC TCA TCT CAA CTC -3'
- B64 - II- 5'- GC AGA AAT CAG ATG GAC GAT- 3'

U reakciji će se koristiti Hot Start TaqMan Master Mix (*Qiagen, Germany*) u koncentraciji od 250 μM i prajmeri (G1-G2; B64-I-B64-II) u koncentraciji od po 10 pM. Navedena smeša će se koristiti za reakciju u količini od 20μl uz dodatak 5 μl izolovanog uzorka DNK. Program na

1 kome će se izvoditi PCR reakcija obuhvatiće: inicijalnu denaturaciju na 94 °C/15 minuta,
2 zatim 45 ciklusa denaturacije na 94 °C /1,5 minut, hibridizaciju na 55 °C /1 minut, ekstenziju
3 prajmera na 72 °C /2 minuta i završnu ekstenziju na 72 °C/10 minuta. Marker od 100 bp
4 koristiće se je kao referenca za veličinu fragmenata (*Thermo Scientific, USA*).

5 PCR reakcija će se izvoditi na aparatu Multigene Thermal Cycler (*Labnet International, Inc.,*
6 *USA*). Nakon izvođenja elektroforeze (*My Ran, Serva Electronik, Germany*), umnožene
7 specifične sekvence biće vizuelno definisane na 2% agaroznom gelu, bojenjem ethidium
8 bromidom i posmatrane na transiluminatoru u mračnoj komori. Vizuelizacija rezultata vršiće
9 se pomoću dokumentacionog sistema UVP GelDoc It 2 (*Analitik Jena, Canada*).

10 Real-time PCR izvođiće se prema protokolu koji su opisali Stoddard i sar, (2009) u kome je
11 ciljna sekvenca gen *lipL32*. Za izvođenje ovog protokola koristiće se Brilliant III Ultra fast
12 qPCR mastermix (*Agilent, USA*) i parovi oligonukleotidnih prajmera i probe sa sekvencama
13 (*Metabion International AG, Germany*):

- 14 - LipL32 - 45F - 5' AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG-3'
- 15 - LipL32 - 286R - 5'GAA CTC CCA TTT CAG CGA TT-3',
- 16 - LipL32 -189P - 5'FAM - AA AGC CAG GAC AAG CGC CG-BHQ1-3'

17 Koncentracija svakog prajmera u reakcionoj smeši iznosiće 400nM, a koncentracija probe
18 200nM. Navedena smeša će se koristiti u količini od 22 µl uz dodatak po 3 µl izolovanog
19 uzorka DNK. Reakcija će se izvoditi na aparatu Applied Biosystems (*Applied Biosystems*
20 *7500 Fast, USA*) uz temperaturni protokol koji se sastoji se od inicijalne denaturacije na 95
21 °C/3 minuta, zatim 45 ciklusa denaturacije na 95 °C /15 sekundi i fazom hibridizacije na 60 °C
22 /30 sekundi. Za izvođenje real-time PCR koristiće se i komercijalni kit, (*Leptospira pathogenic*
23 *Real time Genekam Biotechnology AG, Microboss Highttech GmbH, Germany*), koji će se
24 izvesti prema uputstvu proizvođača.

25 **8. mesto gde će se sprovoditi istraživanje:**

26 Uzorkovanje krvi i urina pasa će se sprovoditi u veterinarskim ambulantama i prihvatištima
27 za pse na području Banja Luke i Prijedora (Republika Srpska). Serološka i molekularna
28 ispitivanja biće izvedena na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta
29 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, u JU Veterinarskom institutu Republike
30 Srpske "Dr Vaso Butozan" u Banja Luci i Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad” u
31 Novom Sadu.

32 **9. ostali relevantni podaci: metode statističke obrade, veza na šire istraživačke projekte** 33 **ako su istraživanja u okviru doktorske disertacije njihov deo i sl:**

34 Dobijeni rezultati biće obrađeni primenom deskriptivnih statističkih metoda. Za poređenje
35 učestalosti pozitivnih i negativnih rezultata primeniće se ANOVA. Za ispitivanje saglasnosti
36 rezultata dobijenih primenom različitih testova koristiće se Kappa statistička analiza.
37 Statistička analiza biće urađena u statističkom paketu GraphPad Prism, (GraphPad Software,
38 San Diego, California, USA)

39 Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru
40 projekta 19/6-020/961-39/15 - Razvoj i optimizacija „in-house“ ELISA testa u svrhu
41 dijagnostike leptospiroze kao zoonoze od posebnog značaja za zdravlje ljudi i životinja koje
42 finansira Ministarstvo nauke i tehnologije Republike Srpske.

43 **VI ZAKLJUČAK SA OBRAZLOŽENOM OCENOM O PODOBNOSTI TEME I KANDIDATA:**

44 Na osnovu analize dostavljenog materijala od strane kandidata, Komisija zaključuje da mr.
45 sci. dr. vet. Jelena Marić ispunjava sve uslove propisane Zakonom o visokom školstvu za
46 izradu doktorske disertacije. Na osnovu priložene prijave kandidata i uvida u aktuelnu
47 literaturu koja se bavi ovom oblašću, Komisija smatra da je predložena tema doktorske
48 disertacije aktuelna, naučno zasnovana, originalna i stručno opravdana. Postavljeni cilj i
49 zadaci su realni i dobro osmišljeni, a metode istraživanja savremene. Imajući u vidu sve
50 prethodno iznete podatke, Komisija predlaže Nastavno naučnom veću Fakulteta veterinarske
51 medicine Univerziteta u Beogradu da prihvati pozitivnu ocenu o naučnoj zasnovanosti
52 predložene teme i podobnosti kandidata mr. sci. vet. med. Jelene Marić, i odobri izradu
53 doktorske disertacije pod naslovom:

54 **„Ispitivanje pouzdanosti seroloških i molekularnih metoda u otkrivanju infekcija pasa**
55 **izazvanih leptospirama i njihov značaj u procjeni epizootiološke situacije”**

1 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

2
3 Dr Sonja Obrenović, redovni profesor,
4 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

5
6
7
8
9 Dr Dragan Bacić, vanredni profesor,
10 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

11
12
13 Dr Živoslav Grgić, viši naučni saradnik,
14 Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“

15
16
17
18 Dr Vesna Ilić, naučni savetnik,
19 Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

20
21
22
23
24
25
26
27
28 **NAPOMENA:** Članovi komisije moraju biti jedinstveni u svom mišljenju

* za kandidate koji nisu upisani na doktorske akademske studije

29