RAZNOLIKOST GENA GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI JELENA OBIČNOGA (CERVUS ELAPHUS) U ODNOSU NA INVAZIJU METILJEM FASCIOLOIDES MAGNA

Bujanić, Miljenko

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:069942

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Miljenko Bujanić

RAZNOLIKOST GENA GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI JELENA OBIČNOGA (*CERVUS ELAPHUS*) U ODNOSU NA INVAZIJU METILJEM *FASCIOLOIDES MAGNA*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Miljenko Bujanić

VARIABILITY OF THE GENES OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) IN RELATION TO *FASCIOLOIDES MAGNA* INFECTION

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2019



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Miljenko Bujanić

RAZNOLIKOST GENA GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI JELENA OBIČNOGA (*CERVUS ELAPHUS*) U ODNOSU NA INVAZIJU METILJEM *FASCIOLOIDES MAGNA*

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, Dipl. ECZM (WPH)

Zagreb, 2019.



University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Miljenko Bujanić

VARIABILITY OF THE GENES OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) IN RELATION TO *FASCIOLOIDES MAGNA* INFECTION

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Assoc. Prof. Dean Konjević, Dipl. ECZM (WPH)

Zagreb, 2019

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, ___Miljenko_Bujanić_____, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/-la drugim izvorima do onih navedenih u radu.

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2019.

Doktorski rad izrađen je na Zavodu za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Dean Konjević, Dipl. ECZM (WPH)

Predstojnik:

Doc. dr. sc. Denis Cvitković

Doktorski rad ima:

111 stranica,

12 grafikona,

15 slika,

15 tablica.

ZAHVALE

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Deanu Konjeviću na izvanrednom studijskom savjetovanju, odličnom vodstvu prilikom osmišljavanja teme, osiguranju materijalnih sredstava potrebnih za provedbu istraživanja te nesebičnoj, svestranoj i velikodušnoj pomoći tijekom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem Hrvatskoj zakladi za znanost na financiranju cjelokupnog istraživanja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Ani Galov i dr. sc. Haidi Arbanasić na pomoći prilikom molekularnih analiza uzoraka te savjetima i sugestijama kod pisanja doktorskog rada.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Krešimiru Krapincu na nesebičnoj pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Krešimiru Križanoviću na pomoći kod računalne obrade rezultata nakon sekvenciranja.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Eleni Bužan i Sandri Potušek na spremnosti za pomoć i ekspeditivnosti prilikom molekularne obrade uzoraka.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Zdravku Janickom na pomoći prilikom prikupljanja djela uzoraka.

Zahvaljujem Snježani Lučinger, dr. med. vet. i Jeli Ćorluki na pomoći prilikom laboratorijskog rada i na veoma ugodnom društvu.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Marini Pavlak, doc. dr. sc. Denisu Cvitkoviću i Vlasti Anić, dr. stom. na strpljenju i ukazanom povjerenju tijekom proteklih četiri godine suradnje na Zavodu.

Zahvaljujem svim lovačkim društvima, Šumarskom fakultetu, te svima ostalima koji su mi pružili pomoć i potporu kod prikupljanja uzoraka.

Zahvaljujem svim prijateljima koji su mi bili potpora tijekom izrade ovog doktorskog rada.

I zadnja, ali najvažnija; najveća, najiskrenija i posebna zahvala na svoj pomoći i potpori prilikom pisanja doktorskog rada mojoj zaručnici Nikolini Škvorc koja je bila srcem i dušom uz mene, mojim roditeljima Snježani i Dragutinu, sestrama Željki i Dubravki te cijeloj mojoj obitelji na beskrajnoj strpljivosti.

SAŽETAK

Parazitske bolesti čine više od dvije trećine svih bolesti divljih životinja. U tom odnosu nositelj se trajno nastoji riješiti parazita, dok parazit zauzvrat izbjegava imunosni odgovor. Važnu ulogu u obrani od parazita imaju geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC) jer omogućavaju prezentaciju antigena parazita obrambenom sustavu nositelja, odnosno pokreću imunosni odgovor. Fascioloidoza kao parazitska bolest uzrokovana nezavičajnom vrstom metilja predstavlja idealno oboljenje za praćenje učinka parazita na nove nositelje. Veliki američki metilj se u Europi pojavio u drugoj polovici 19. stoljeća, a intenzivnije se počeo širiti dolinom Dunava krajem prošlog stoljeća te je u Hrvatskoj prisutan posljednjih dvadesetak godina. Kod istraživanja MHC gena u odnosu na uzročnike bolesti postoje dvije pretpostavke, jedna koja predmnijeva da su heterozigotne jedinke otpornije, dok druga govori da je otpornost, odnosno prijemljivost uvjetovana točno specifičnim alelima. Ciljevi ovog istraživanja su: i) utvrditi varijabilnost MHC gena kod jelena običnoga u Hrvatskoj, ii) utvrditi da li postoje razlike između različitih populacija i iii) utvrditi možebitnu povezanost alela u odnosu na invadiranost metiljem *F. magna*. Ukupno je prikupljeno 117 uzoraka jelenske divljači, od čega je 91 uzorak iz istočne Hrvatske gdje je metilj stalno prisutan u okolišu, dok je 26 uzoraka iz Gorskog kotara gdje metilj nikad nije utvrđen. Ukupna prevalencija fascioloidoze iznosila je 82,42%. Parazitološkom pretragom jetre utvrđen je stupanj invadiranosti, dok je koprološkom pretragom izmeta utvrđena prisutnost ostalih parazita u organizmu. Iz uzorka tkiva jetre izolirana je DNA te je lančanom reakcijom polimeraze umnožen odsječak genomske DNA (egzon 2 lokusa DRB MHC skupine II). Elektroforezom je potvrđena prisutnost PCR produkata koji su poslani na sekvenciranje u Macrogen servis. S obzirom da su utvrđene sekvence s više od 2 alela po jedinci, zaključeno je da je DRB lokus dupliciran u istraženih jedinki, te je provedeno daljnje sekvenciranje egzona 2 lokusa DRB tehnologijom sekvenciranja slijedeće generacije (NGS, engl. Next Generation Sequencing). Prema rezultatima Kruskal-Wallis testa

broj metilja po grlu je statistički znakovito najviši u fazi spolno zrelog metilja (22,3 metilja) u odnosu na ostale razvojne stadije ovog parazita. Analiziran je egzon 2 DRB lokusa MHC klase II odabranih 46 jedinki jelena običnoga. U istraženom uzorku utvrđeno je ukupno 44 DRB alela, a pojedina jedinka ima od jedan do četiri alela, što ukazuje na postojanje dvaju DRB lokusa kod jelena. Četiri alela otprije su poznata (DRB_NS36, DRB_NS38, DRB_ref01 i DRB_ref02), dok ostalih 40 do sad nije utvrđeno kod jelena. Pronađeni aleli translatiraju se u 43 jedinstvena aminokiselinska slijeda. Iste aminokiselinske produkte imaju aleli DRB_ref05 i DRB_NS47. Usporedbom prisutnosti alela DRB_ref02 i alela DRB_ref05 u nizinskoj i gorskoj populaciji nije utvrđena statistički znakovita razlika (DRB_ref05 - $\chi 2$ s Yatesovom korekcijom iznosi 0,0025, a p=0,96; DRB_ref02 - $\chi 2$ s Yatesovom korekcijom iznosi 0,0013, a p=0,97). S druge strane, usporedbom prisutnosti alela DRB_ref01 koji se javlja isključivo u nizinskom području dobivena je statistički značajna razlika između uzoraka s područja Lipovljana i Baranje, gdje se učestalije javlja u Lipovljanima ($\chi 2 = 4,928$, a p=0,026411). Alel DRB_ref02 se statistički znakovito više pojavljuje u jelena na području Lipovljana u odnosu na Baranju ($\chi 2 = 3,931$, p=0,0473). Nasuprot tome, alel DRB_ref03 se najčešće pojavljuje u jelena u Baranji, i to statistički znakovito u odnosu na jelene iz Lipovljana ($\chi 2 = 5,1481$, p = 0,023272) i Spačve ($\chi 2 = 4,5365$, p = 0,033). S obzirom na činjenicu da su aleli DRB_ref01 i DRB_ref06 utvrđeni isključivo u nizinskoj populaciji jelena, provedena je usporedba navedenih alela s obzirom na invadiranost metiljem *F. magna*. Usporedbom nalaza parazitološke pretrage jetre i prisutnosti pojedinih alela MHC DRB gena uočena je razlika u invadiranosti jelena ovisno o vrsti alela. Pri tome je razlika između invadiranosti jelena s DRB_ref01 i DRB_ref06 alelom statistički znakovita, gdje je invadiranost značajno manja kod jelena sa alelom DRB_ref06 ($\chi 2 = 0,939$, df = 1, $\chi 2/df = 0,94$, p = 0,332). Preostali aleli se pojavljuju uglavnom znatno rjeđe i ne mogu se dovesti u svezu s invazijom metiljem *F. magna*. Visoka raznolikost ukazuje na vitalnu populaciju jelena običnoga u Republici Hrvatskoj, a odnos alela DRB_ref01 i DRB_ref06

potencijalno na razvoj odnosa nositelj-parazit u slučaju fascioloidoze jelena običnoga. Činjenica da su svega tri alela zajednička jelenskim populacijama iz Gorskog kotara i nizinske Hrvatske ukazuje na moguće postojanje dvije subpopulacije.

KLJUČNE RIJEČI: jelen obični, *Fascioloides magna*, MHC geni, DRB lokus, varijabilnost

EXTENDED ABSTRACT

INTRODUCTION: Parasitic diseases constitute almost 70% of all wildlife diseases, and therefore finding parasites in wild animals is the rule, rather than the exception. The term "parasitic disease" means a clinical disease, not just an infection. This coexistence between the host and a parasite species mostly results in establishing a balance, a dynamic relationship where the host tries to remove the parasite, and the parasite avoids the immune response. The entry of a new parasite species into a naive host population can lead to detrimental effects on the host's health status, and even potentially compromise the existence of a certain species on a local level. Major Histocompatibility Complex (MHC) genes play a pivotal role in the host defence system by enabling the presentation of parasitic antigens to the immune system, thus initiating the immune response. As a parasitic disease caused by a non-native trematode species, fascioloidosis is an ideal model for monitoring the parasite impact on naive populations. Fascioloidosis was originally a disease of North American deer species, and European deer had no contact with this parasite until its first introduction to the northern part of Italy. In other words, from the example of this disease it is possible to create control and experimental groups under natural conditions, and with that gain insights into the evolution of the host-parasite relationship. The first stable foci of the large American liver fluke (*Fascioloides magna*) in Croatia was formed in the Baranja region. In contrast, red deer in the Gorski kotar region have never been in contact with this parasite species and they represent control/naive group. On the basis of all the above the primary goal of this research was to obtain data on the diversity of the MHC gene in red deer, as a precondition for assessing the vitality of the population and its relationship towards disease. It will also enable an insight into potential differences between red deer populations in Slavonija and Baranja, and the Moslavina and Gorski kotar regions, especially in relation to the hypothesis on the existence of two red deer subspecies (the eastern and western types).

REVIEW OF THE LITERATURE: The large American liver fluke was primarily a parasite of North American deer species, which appeared in the second half of the 19th century in Europe due to the uncontrolled introduction of exotic deer species. Later, migrations and translocations from enzootic regions enabled the spread of fascioloidosis to suitable habitats in Europe. Following the initial adaptation of flukes to new intermediate and final hosts, and hydrological and climate conditions, new permanent natural foci of fascioloidosis have been established – first in the Royal Park La Mandria in northern Italy, second in the Czech Republic, and third in the floodplains of the Danube River. In Italy, besides in red deer, cases of infection in dead-end hosts (cattle, horses, wild boar) and aberrant hosts (sheep, goat) have been detected. In the Czech Republic fascioloidosis has been detected in red deer, fallow deer, white-tailed deer, sika deer, roe deer and cattle. Molecular genotyping of flukes using mitochondrial markers (cox1) confirmed the close genetic relationship between flukes from Poland and the Czech Republic. In 2015 the presence of large American fluke was detected in farmed fallow deer in south-east Poland, close to the Slovakian border, which proved that the spread of fascioloidosis to new, non-infected areas is a dynamic and constant process. In neighbouring areas, fascioloidosis was confirmed in 1982 in Austria, followed by Slovakia, Hungary and Croatia. Almost ten years later the first cases were described in Serbia. At the end of 1999 hunters and foresters noticed a decline in the red deer population in the eastern part of Croatia. Liver analysis showed traces and pseudocysts filled with dark stained matter that resembled blood cloths. The liver of a red deer shot in the area of Šepršhat (Baranja) was examined at the Veterinary Faculty University of Zagreb in January 2000. The analysis revealed 22 adult flukes, which was the first confirmation of the *Fascioloides magna* fluke in Croatia. This finding confirmed the presence of large American liver fluke in Croatia, with a tendency for the disease to spread throughout lowland areas. This trend is supported by the fact that fluke can release up to 4000 eggs per day, and by the migration characteristics of red deer and the transport of red deer from infected

to non-infected areas. By 2003, fascioloidosis was also present in the Vinkovci (P=12.5%) and Vrbanja (P=4.76%) regions, while the prevalence in Baranja reached 53.3%. The first cases of fascioloidosis between the Danube and Drava rivers were detected in 2004, showing that fascioloidosis was spreading towards the central part of Croatia. One of the striking characteristics of large American liver fluke is its large and thin body, which places it among the largest flukes. Adult flukes can reach up to 10 cm in length, 3.5 cm in width and up to 4.5 mm in thickness. The surface of the body is covered by cuticula, citoplasmatic sintitial tegument, whose primary function is to maintain the flukes' integrity, like a skin-muscle envelope. However, it is also important in absorption and secretion. The tegument is covered by a layer rich in carbohydrates called glycocalix. Constant reparation and change of glycoproteins plays an important role in avoiding the host immune responses. Adult flukes are hermaphrodites, containing both male and female genital systems. The fluke's life cycle is divided into four phases, where the first phase begins with an adult fluke within the pseudocyst of the definitive final host. Secreted eggs reach the intestines via bile ducts and are shed into the environment with faeces. Following embrionation the miracidia actively search for water snails (*Lymnaea truncatula*) where they develop into sporocysts. Redia are developed from the sporocysts and cercaria from redia. Cercaria leaves the snail and searches for aquatic vegetation where it forms the next developmental stage called metacercaria. Metacercaria is the invasive stage for the final hosts. When ingested by final hosts, metacercariae reaches the intestine where immature flukes are liberated and actively penetrate the intestinal wall. Once in the abdominal cavity, immature flukes migrate through the ventral side of the abdominal cavity towards the liver where they penetrate Glisson's capsule, migrate through the liver parenchima and slowly develop into an adult flukes. In the livers of definitive hosts flukes are mainly in pairs, within thin-walled pseudocysts. Differently, thick-walled pseudocysts are found within dead-end hosts, while in aberrant hosts pseudocysts are not formed, which results in the permanent

migration of the fluke and consequent destruction of the liver parenchyma. Traces of dark pigment are visible on the surface of infected livers. This pigment is a bye-product of the fluke's metabolism and is called iron-porphirine. In order to react to infection caused by various pathogens, each organism has developed a system for recognition of foreign bodies. This system is based on complex molecules such as proteins, glycoproteins, lipoproteins, nucleic acids, etc., which are placed on the surface of each cell and the organism recognizes them as antigens. Tissue antigens are trans-membrane glycoprotins incorporated in the cell membrane, coded by the genes of the Major Histocompatibility Complex (MHC). MHC genes are divided into two main groups: MHC class I which codes glycoproteins of MHC class I, which presents viral and tumour antigens to cytotoxic T-cells, and MHC class II, which codes glycoproteins of the MHC class II that can be found on the surface of certain cells of the immune system (macrophages, plasma cells, dendritic cells). This group of glycoproteins presents antigens to T helper cells. The main characteristics of MHC genes in the majority of vertebrate species are polygeny and polymorphism. These parts of the genome are the most variable loci that provide instructions for protein synthesis in vertebrates. A great deal of polymorphism exists among species, but also within certain species, resulting in a potentially large number of alleles on each locus. A very important characteristic of MHC genes is their codominant expression, or in other words, glycoprotein receptors expressed on the cell surface are the result of alleles from both parents. The subregions of each chain are built from introns and exons. Exons represent the continuous coding parts of the DNA, while introns are non-coding parts between exons. Most research work in mammals has been directed towards exon 2 of the DRB subregion. This is an indicator of genetic variability, as the highest form of diversity between alleles and haplotypes is shown on this region. Research into MHC genes in wildlife is directed in two directions: analysis of variability and the relationship between variability and certain pathogens. Two main hypotheses propose that heterozygotes are more resistant to diseases than homozygotes, and

that resistance/susceptibility toward certain pathogens is influenced by specific alleles. So far, numerous studies on MHC variability in mammals have been conducted, including wild horses (*Equus przewalskii*), North-American bisons (*Bison bison*), oryx (*Oryx leucoryx*), European bison (*Bison bonasus*), cheetah (*Aconyx jubatus*), Asian lions (*Panthera leo persica*) and moose (*Alces alces*). Low MHC variability is not necessarily related to low genetic variability, as seen in European beavers (*Castor fiber*), Rudolph whales (*Balaenoptera borealis*), fin whales (*Balaenoptera physalus*) and southern sea elephants (*Mirounga leonina*). Habitat fragmentation in some species has resulted in small isolated populations, which still can have high MHC variability, i.e. in island foxes (*Urocyon littoralis dickeyi*) from the island of San Nicholas, the Malagasy giant rat (*Hypogeomys antimena*), or grey wolves (*Canis lupus*) in Croatia. Some research has revealed the existence of certain alleles related to resistance to infection with nematodes in sheep, European bisons, white-tailed deer (*Odocoilues virginianus*) and giant pandas (*Ailuropoda melanoluca*).

MATERIAL AND METHODS: For this research we used samples collected as part of the Croatian Science Foundation grant UIP 3421 "Molecular epidemiology of selected parasitic diseases of wildlife". In total we analysed 117 red deer, of which 91 samples was collected in the Posavina and Baranja regions (21 does, 34 males and for 36 animals no data were provided), while 26 were collected in the Gorski kotar region (5 does, 7 males and for 14 animals no data were provided). Locations were chosen according to the presence of *Fascioloides magna*. The State open hunting ground No. XIV/9: "PODUNAVLJE-PODRAVLJE" is located in the north-eastern part of the Danubian floodplain in Croatia, and spreads along the left and right banks of the River Danube. Inside this region is the "Kopački rit" Nature Park, which has a high influence on the epidemiology of fascioloidosis. The State open hunting ground No. III/39 - "OPEKE II" is a lowland area exposed to flooding, with altitudes up to 99 m.a.s.l. Territorially, the hunting ground is within the Sisačko-moslavačka County. Periods of high water levels occur twice per

year, in spring and autumn, when approx. 70% of the hunting ground is covered by water. Hunting ground No. VIII/110 „CRNA GORA“ is a mountain habitat located in the Gorski kotar region, in the northern part of the Primorsko-goranska County, near the border with Slovenia. Altitudes range between 380 and 1197 m.a.s.l. The only water streams in this habitat are Čabranka and Tršćanka Rivers. The collected red deer livers were analysed macroscopically for fibrous adhesions, altered colour and shape, and the presence of iron-porphyrin. Liver parenchyma was sliced transversally on approx. 2 cm thick layers and analysed. The observed changes were categorized according to their characteristics into immature and adult flukes, degraded flukes, flukes' migratory channels and pseudocysts, which were further divided into young, old and degraded. All lesions were noted in a table for further analysis. A sample of the livers was taken for analysis of MHC genes in an Eppendorf tube with 96% alcohol, properly marked and stored at -20^{o}C. Coprological analysis, which included sedimentation and flotation analysis, was applied to detect parasite eggs and larvae in faeces samples. Isolation of DNA was performed using a commercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. Isolated DNA was stored at 4^{o}C. A fragment of genomic DNA (exon 2 of the DRB MHC class II), 300-bp long, was replicated using PCR reaction. For that purpose a commercial HotStarTaqMaster Mix, containing buffer, dNTP and HotStarTaq DNA polimerase was used. The presence of PCR products was confirmed by gel electrophoresis. Successfully replicated PCR products were sent to Macrogen for sequencing. Since the presence of more than two alleles per sample was suggested, we concluded that the DRB locus was duplicated, and therefore further sequencing of the DRB exon 2 was carried out using Next Generation Sequencing (NGS). Nucleotide sequence, translation to amino acids, selection of the most appropriate substitution model and evolution distance were analysed using the MEGA program. Statistical differences between the level of infection, distribution of alleles and the relationship between alleles and the level of infection in the collected samples were

analysed using the Fisher exact test, the $\chi 2$ test and the McNemar $\chi 2$ test. Normality of distribution was analysed using Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The relationship between variables was tested using the Spearmann rang correlation coefficient. Data among groups were tested using T-test and Kruskal-Wallis test.

RESULTS: For this research 117 red deer samples were collected (Gorski kotar (N=26), Lipovljani (N=28), Radinje (N=31), Vrbanja (N=8), Spačva (N=11), Tikveš (N=13)). The prevalence of *F. magna* positive samples was: Lipovljani (P=100%), Radinje (P=70.97%), Vrbanja (P=75%), Spačva (P=90.9%), Tikveš (P=30.77%). Total prevalence was 82.42%. Samples collected in the Gorski kotar region were free of large American liver fluke. Fisher's exact test showed that there were no statistical differences between the frequency of infection between males and females (p=0.0625), and that the prevalence of infected and non-infected animals was not identical ($\chi 2$=6.72; p<0.01 and McNemar $\chi 2$=15.57, p<0.0001). According to the Kruskal-Wallis test the number of flukes per animal was statistically higher in the case of adult flukes (22.3 flukes) when compared to other life stages. The reason for this could be the high variability of flukes per animal. The lowest variability was detected in the case of migratory flukes (CV=137), and the highest in the case of degrading flukes (CV=569). Relatively low variability was also observed in the case of adult flukes (CV=166). A positive correlation was also observed between most of the developmental stages. The highest correlation found was between the number of pseudocysts and the number of adult flukes (Rs=0.995), followed by the number of immature flukes and flukes in migration (Rs=0.805). The lowest correlation was detected between the number of immature flukes and degraded flukes (Rs=0,268). Exon 2 of the DRB MHC class II was analysed in 46 selected animals. A total of 44 different alleles were detected, with a maximum number of 4 alleles per animal, which suggests the existence of 2 DRB loci. Four alleles were previously known (DRB_NS36, DRB_NS38, DRB_ref01 i DRB_ref02), while other 40 alleles were detected for the first time.

The alleles found were translated into 43 amino acid sequences. The same products were detected for the DRB_ref05 and DRB_NS47 alleles. Comparison of the amino acid sequences revealed 43 mutable places. The presence of DRB_ref02 and DRB_ref05 alleles in lowland and mountain populations was not statistically significant (DRB_ref05 - $\chi 2$ with Yates correction is 0.0025, p=0.96; DRB_ref02 - $\chi 2$ with Yates correction is 0.0013, p=0.97). In contrast, the presence of the DRB_ref01 allele, found only in lowland populations, was statistically significant higher in the area of Lipovljani when compared to Baranja ($\chi 2 = 4.928$, p=0.026411). The number of DRB_ref02 alleles was significantly higher in the area of Lipovljani when compared to the Baranja region ($\chi 2 = 3.931$, p = 0.473). In contrast, the number of DRB_ref03 allele was significantly higher in the Baranja region when compared to Lipovljani ($\chi 2 = 5.1481$, p = 0.023272) and Spačva ($\chi 2 = 4.5365$, p = 0.033). Since DRB_ref01 and DRB_ref06 alleles were detected only in lowland populations, a comparison between these alleles and infection with *F. magna* was undertaken. Comparison of the presence of the respective MHC DRB alleles with parasitological findings revealed differences in the level of infection with respect to different alleles. The differences in infection between animals with DRB_ref01 and DRB_ref06 alleles were statistically significant ($\chi 2 = 0.939$, df = 1, $\chi 2/df = 0.94$, p = 0.332). The remaining alleles appeared rarely and cannot be related to *F. magna* infection in this research.

DISCUSSION: The high allelic diversity observed in this research is in accordance with other studies conducted on deer species. The fact that only three alleles are common in the red deer population from the Gorski kotar region and the lowland part of Croatia supports the hypothesis of the existence of two red deer subspecies – the western or Dinaric and the eastern or Pannonian deer. The relationship between the DRB_ref01 and DRB_ref06 alleles suggests the potential evolution of host-parasite interaction in the case of red deer fascioloidosis. Caution is needed when discussing this potential relationship since the level of infection is also influenced by disease control programmes, and therefore we suggest using the terminology “the reaction of

the organism to a novel parasitic disease" rather than "resistance to parasitic disease". Further research is needed to include animals from lowland areas where fascioloidosis has not yet been established.

KEY WORDS: red deer, *Fascioloides magna*, MHC genes, DRB locus, variability

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 3

2.1. Veliki američki metilj *Fascioloides magna* 3

2.1.1. *Fascioloides magna* – dolazak i širenje po Europi 3

2.1.2. *Fascioloides magna* – morfološke osobitosti 11

2.1.3. Razvojni ciklus metilja 15

2.1.4. Klinička slika i patološke promjene kod fascioloidoze 18

2.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti 20

2.2.1. MHC geni klase II kod životinja 26

2.2.2. Istraživanja raznolikosti MHC gena u divljih životinja 28

2.3. Jelen obični 32

3. CILJ I PRETPOSTAVKA ISTRAŽIVANJA 40

4. MATERIJAL I METODE 41

4.1. Područje uzorkovanja 41

4.2. Parazitološka pretraga jetara 43

4.3. Koprološka pretraga izmeta 44

4.4. Izolacija DNA, Sangerovo sekvenciranje i sekvenciranje sljedeće generacije (engl. Next Generation Sequencing) 44

4.5. Računalna analiza rezultata 47

4.6. Program MEGA 5.01 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 48

4.7. Statistička obrada podataka 49

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA 50

5.1. Rezultati parazitoloških analiza 50

5.2. Genetička varijabilnost DRB lokusa s osvrtom na invadiranost metiljem *F. magna* 64

6. RASPRAVA 77

7. ZAKLJUČCI 84

8. POPIS LITERATURE 85

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA 102

10. PRILOG 110

1. UVOD

Prisutnost parazita u divljim životinjama je pravilo, a ne izuzetak. Od svih bolesti divljih životinja parazitske bolesti čine oko 70%. Pri tome treba imati na umu da ovdje govorimo o bolestima, a ne o pukoj prisutnosti parazita u životinjama, bez klinički vidljivih posljedica. Ovakav suživot nositelja i parazita rezultirao je u najvećoj mjeri određenom ravnotežom između ova dva organizma, pri čemu se nositelj trajno nastoji riješiti parazita, a ovaj zauzvrat izbjegava imunosni odgovor te u određenim slučajevima, kao što su primjerice mlade životinje, bolesne ili na drugi način oslabljene životinje, mogu uzrokovati klinički vidljive invazije s ponekad i teškim stanjima ili čak uginućima. Ukoliko dođe do ulaska novih vrsta parazita u do tada naivnu populaciju nositelja mogu se javiti ozbiljni poremećaji zdravstvenoga stanja, pa čak potencijalno dovesti i do lokalnog ugrožavanja opstanka pojedinih vrsta. Slično se događa i unosom nositelja u područja gdje se nalaze paraziti na koje ti nositelji nisu priviknuti. U tom dijelu je uloga ekspresije gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC) izrazita, jer omogućava prezentaciju antigena parazita obrambenom sustavu nositelja, odnosno pokretanju imunosnoga odgovora. Fascioloidoza kao parazitska bolest uzrokovana nezavičajnom vrstom metilja predstavlja idealno oboljenje za praćenje učinka parazita na nove nositelje. Naime, fascioloidoza je izvorno bolest sjevernoameričkih vrsta jelena te europski jeleni nisu imali doticaja s ovim parazitom sve do prvog unosa na područje Italije. Drugim riječima, na primjeru ove bolesti moguće je u potpuno prirodnim uvjetima osigurati kontrolnu i eksperimentalnu skupinu, te na taj način steći kvalitetan uvid u evoluciju odnosa između nositelja i parazita. Ukoliko promatramo prisutnost metilja *Fascioloides magna* na području Republike Hrvatske, možemo reći kako je prvo stabilno žarište formirano na području Baranje. Iako je prvi metilj u jelena običnoga na području Šepreshata u Baranji dokazan 2000. godine, lako je moguće kako je njegova prisutnost u Hrvatskoj ipak duža od 18 godina. Naime, kako je zamijećeno na primjeru drugih država, prvi dolazak metilja na određeno područje ne znači istodobno i

formiranje stalnoga žarišta, a pored toga, metilji isprva ne dostižu karakterističnu veličinu. Stoga je moguće da su prve invazije prošle neprimjećeno, odnosno da su prijavljene veterinarima tek kod prvih slučajeva klinički vidljivih invazija, odnosno izrazitih makroskopskih promjena na jetrima vidljivih tijekom odrobljavanja divljači. S druge strane, jeleni na području Gorskog kotara nikada nisu bili u kontaktu s ovim parazitom i predstavljaju naivnu, odnosno kontrolnu skupinu.

Sukladno navedenome primarni cilj ovoga istraživanja je stjecanje podataka o raznolikosti MHC gena jelena običnoga, kao jednog od preduvjeta za kasniju procjenu vitalnosti populacije i odnosa prema bolestima. Pored toga dobit će se uvid u eventualne razlike između populacija jelena Slavonije i Baranje, Moslavine, te Gorskog kotara, vezano uz pretpostavke o različitim tipovima jelena (panonski ili istočni i zapadni ili dinarski tip). Time će se upotpuniti preliminarne spoznaje polučene na području populacijske genetike. Konačno, razmotrit će se odnos raznolikosti alela MHC gena i invadiranosti velikim američkim metiljem. Nakon više od 18 godina suživota ovog parazita i jelena običnoga dobit ćemo uvid i u činjenicu da li postoje promjene na MHC genima koje bi upućivale na razvoj njihovog odnosa, posebice na primjeru jelena istočne Hrvatske gdje je fascioloidoza utvrđena i održava se, u odnosu na jelene gorske Hrvatske gdje nikada nije bilo ove bolesti (nezavičajna vrsta metilja).

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Veliki američki metilj *Fascioloides magna*

2.1.1. *Fascioloides magna* – dolazak i širenje po Europi

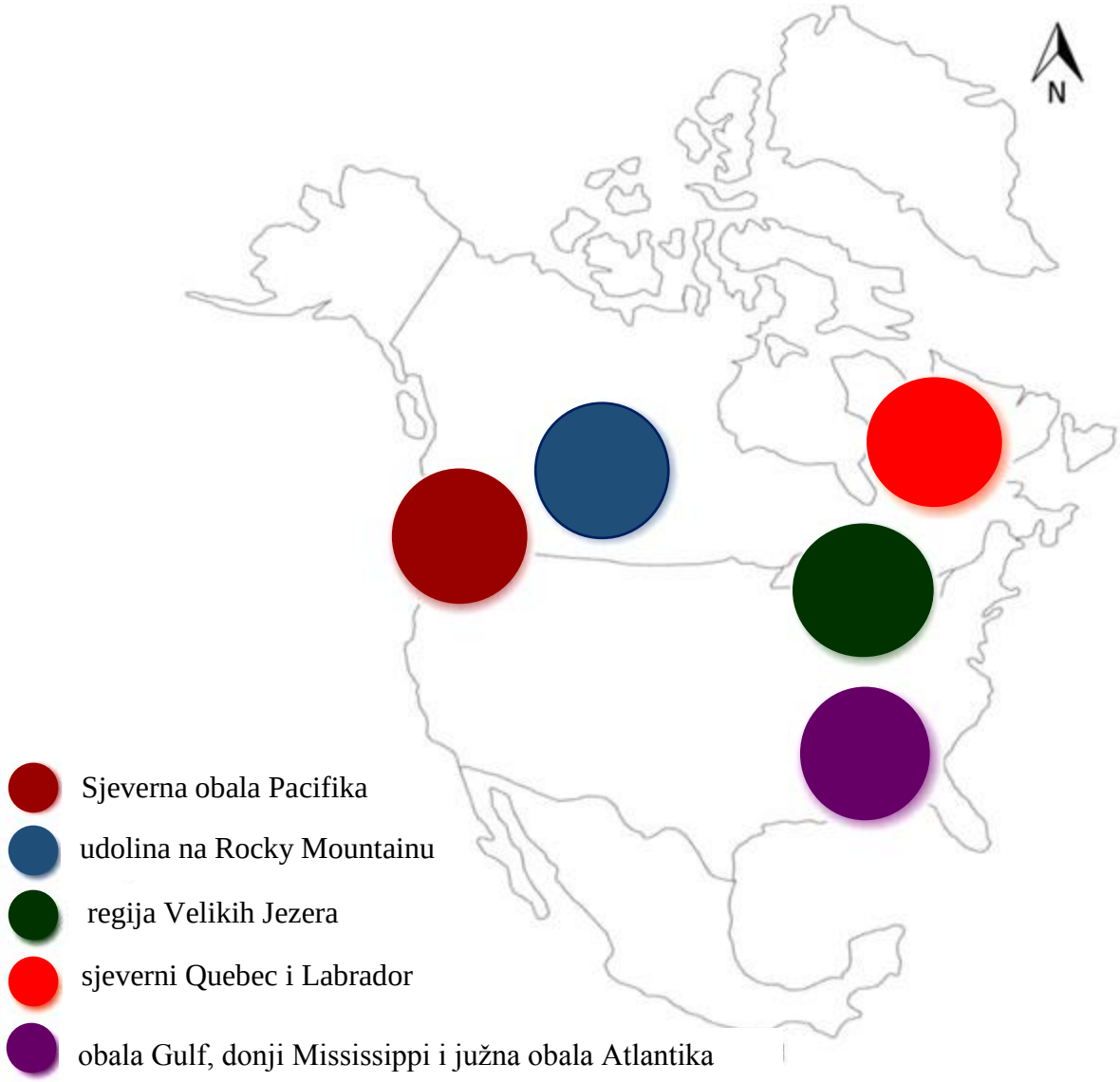
Talijanski veterinar Roberto Bassi je 1875. godine u jetri wapiti jelena (*Cervus elaphus canadensis*) na području Kraljevskog Parka La Mandria, neposredno uz grad Torino u sjeverozapadnoj Italiji opisao novog parazita, metilja kojeg je nazvao *Distomum magnum* (BASSI, 1875.). Charles W. Stiles je proučavao metilje u jetri sjevernoameričkih jelena i utvrdio da su ti paraziti identični onima koje je Bassi nazvao *Distomum magnum*, te ih je preimenovao u *Fasciola magna* (STILES i HASSALL, 1894.). Taj se naziv zadržao do trenutka kada je Henry B. Ward na temelju svojih istraživanja utvrdio morfološke razlike između metilja *Fasciola magna* i ostalih vrsta iz roda *Fasciola*, te je predložio formiranje novoga roda *Fascioloides*, s metiljem *Fascioloides magna* kao jedinom vrstom (WARD, 1917.). Kako na engleskom jeziku postoje brojni nazivi za metilja *Fascioloides magna*, tako su i u nas nastali mnogi prijevodi poput primjerice: divovski metilj, američki divovski metilj, gigantski metilj (engl. giant liver fluke), metilj jelena, jelenski metilj (engl. deer fluke), američki metilj jetre, veliki američki jetreni metilj, veliki američki metilj (engl. large American liver fluke) (VICKOVIĆ, 2007.). Od svih navedenih pojmova najčešće je korišteni naziv veliki američki metilj.

Tablica 1. Taksonomsko razvrstavanje metilja *Fascioloides magna* prema JONES (2005.)

Carstvo	Animalia
Podcarstvo	Metazoa
Tip	Ameria
Natkoljeno	Bilateralia
Koljeno	Acoelomata
Potkoljeno	Platyhelminthes
Razred	Trematoda
Podrazred	Digenea
Red	Echinostomida
Nadporodica	Echinostomatoidea
Porodica	Fasciolidae
Podporodica	Fasciolinae
Rod	*Fascioloides*
Vrsta	*Fascioloides magna*

Veliki američki metilj izvorno je parazit jelenske divljači u Sjevernoj Americi gdje postoji pet enzootskih regija smještenih na području Sjedinjenih Američkih Država i južne Kanade (Slika 1). Navedena područja uključuju sjevernu obalu Pacifika, udolinu na masivu Rocky Mountain, područje Velikih Jezera, sjeverni Quebec i Labrador, te obalu Gulf, donji tok rijeke Mississippi i južnu obalu Atlantika (PYBUS, 2001.). Metilj *F. magna* proširio se Sjevernom Amerikom prvenstveno prirodnom migracijom jelena, ali i njihovim premještanjem, iz invadiranih u neinvadirana područja, od strane čovjeka. Konačni nositelji (bjelorepi jeleni

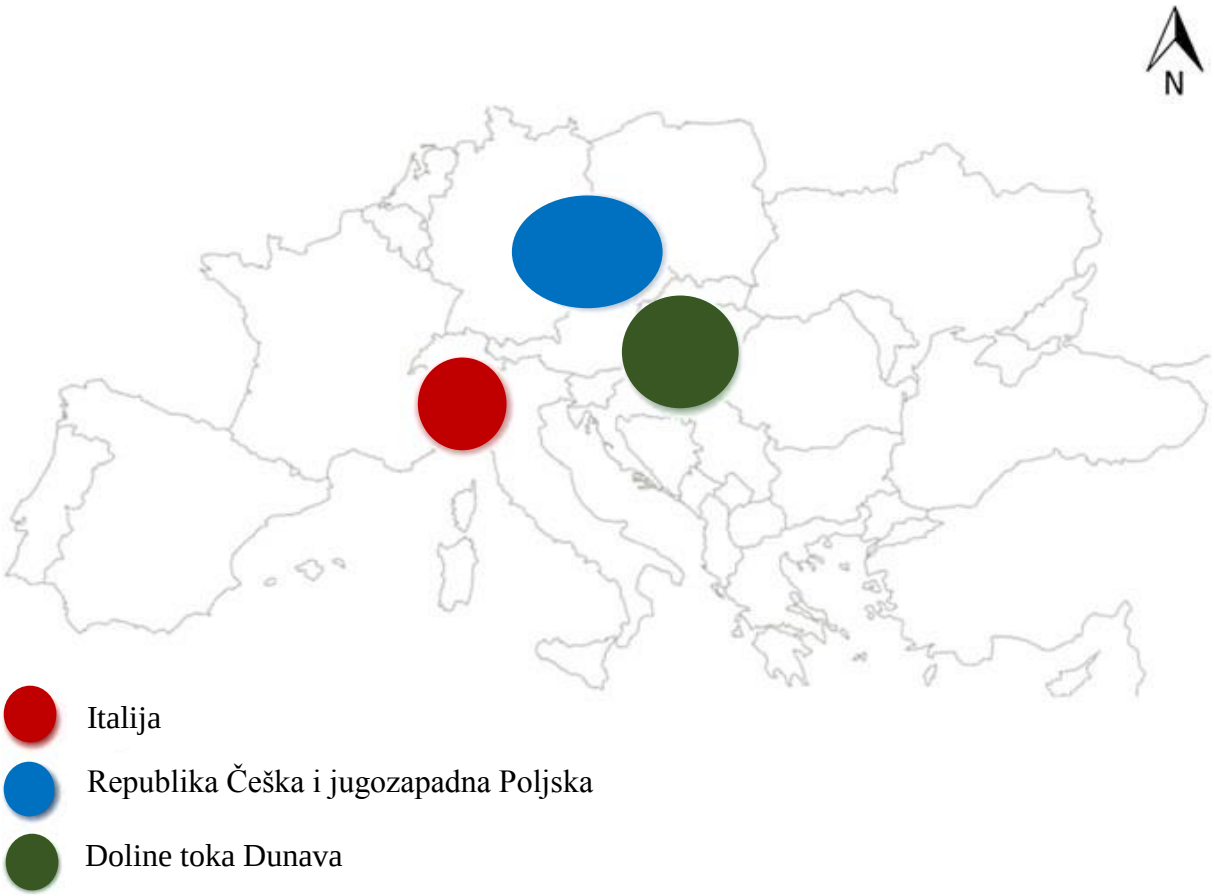
(*Odocoileus virginianus*) i wapiti jelen) igraju glavnu ulogu u održavanju fascioloidoze u prirodnom okolišu i njenom širenju na području SAD-a i Kanade.



Slika 1. Shematski prikaz enzootskih područja fascioloidoze u Sjevernoj Americi (KRÁLOVÁ–HROMADOVÁ i sur., 2016.).

U Europi se veliki američki metilj pojavio u drugoj polovici 19. stoljeća zahvaljujući sve većoj popularizaciji komercijalnog lova, ali i zahtjevima veleposjednika za egzotičnim

vrstama u parkovima i gaterima, koji su rezultirali s veterinarskog stajališta nekontroliranim unosom nezavičajnih jelenskih vrsta iz Amerike, prvenstveno wapiti i bjelorepog jelena u europske parkove, zoološke vrtove i rezervate (SLUSARSKI, 1955.; BOJOVIĆ i HALLS, 1984.). Sasvim je razumljivo kako je barem jedan dio tih jelena bio invadiran ovim metiljem. Kasnija migracija i premještanje zavičajnih vrsta jelenske divljači iz enzootskih područja Europe omogućila su širenje metilja po prikladnim područjima kontinenta (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Tako su sporadično opisivani slučajevi invazija na području Češke, u Njemačkoj i Poljskoj (ULLRICH, 1930.; SALOMON, 1932.; SLUSARSKI, 1955.), gdje je u početku glavni razlog sporog širenja po Europi bila prilagodba metilja novoj vrsti puževa koji su služili kao posrednici, novim vrstama nositelja i novim hidrološkim i klimatskim uvjetima (KOTRLÁ i KOTRLÝ, 1980.). U drugoj polovici prošlog stoljeća uslijed višekratnih invazija proglašena su stalna enzootska područja fascioloidoze u Češkoj (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.) te u dolinama toka rijeke Dunav u Slovačkoj (RAJSKÝ i sur., 1994.), Mađarskoj (MAJOROS i SZTOJKOV, 1994.) i Austriji (PFEIFFER, 1983.). Iz navedenoga proizlazi da je metilj *F. magna* unesen u Europu više puta transportom jelenske divljači, koja su rezultirala stvaranjem tri žarišta invazije (Slika 2): na području Kraljevskog parka La Mandria u sjevernoj Italiji (BASI, 1875.); na dijelu Republike Češke i jugozapadne Poljske (ULLRICH, 1930.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.); te na području doline toka rijeke Dunav.



Slika 2. Shematski prikaz prirodnih žarišta fascioloidoze u Europi (KRÁLOVÁ–HROMADOVÁ i sur., 2016.).

Kako je već ukratko navedeno, metilj *Fascioloides magna* unesen je u Italiju 1865. godine (BASSI, 1875.), kada je tadašnji kralj Italije Vittorio Emanuele II dogovorio uvoz 60 jedinki wapiti jelena iz Wyominga (SAD) od kojih je 47 ispušteno u Kraljevski park La Mandria (APOSTOLO, 1996.). Tim je unosom jelena navedeno područje postalo prvo stabilno žarište fascioloidoze u Europi s posljedičnim invazijama jelena običnoga velikim američkim metiljem. U razdoblju od 1979. do 1980. godine zabilježena je prevalencija invadiranih jelena običnih u iznosu od gotovo 100% (BALBO i sur., 1987.). U tom području javili su se i slučajevi fascioloidoze kod nositelja tipa slijepa ulica (engl. dead-end host): goveda (LANFRANCHI i sur. 1984.,1985.; BALBO i sur., 1987.), konja i svinje divlje (*Sus scrofa*) (BALBO i sur., 1987.), te kod aberantnih nositelja: ovce i koze (BASSI, 1875.). Već 1910. godine utvrđena je fascioloidoza i u drugom enzootskom području u Europi, u Češkoj, kod jelena lopatara (*Dama*

dama) (ULLRICH, 1930.). U Češkoj se fascioloidoza proširila po njenom središnjem i južnom dijelu kod tipičnih nositelja (jelen obični, jelen lopatar i bjelorepi jelen), s najvećom prevalencijom kod jelena običnoga (81-100%) (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.) i jelena lopatara (preko 90%) (NOVOBILSKÝ i sur., 2007.a). Kod nositelja tipa slijepa ulica metilj *F. magna* utvrđen je kod sika jelena (*Cervus nippon*) i goveda, dok je kod aberantnih nositelja u tom području fascioloidoza zabilježena u srne obične (*Capreolus capreolus*). ERHARDOVÁ-KOTRLÁ (1971.) je utvrdila najvišu prevalenciju kod srna od 70 do 80%. Pojava fascioloidoze uz sjevernu češko-poljsku granicu dovodi do mogućnosti daljnjeg širenja *Fascioloides magna* iz Češke u Poljsku (KAŠNÝ i sur., 2012.), što je i potvrđeno parazitološkim pretragama jelena običnoga, jelena lopatara i srne obične (PYZIEL i sur., 2014.; DEMIASZKIEWICZ i sur., 2015.), a molekularnom genotipizacijom metilja pomoću mitohondrijskih markera gena za podjedinicu 1 citokrom c oksidaze (cox1) utvrđena je bliska genska povezanost između metilja iz Poljske i metilja iz Češke (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2015.). Time je potvrđeno drugo enzootsko područje fascioloidoze u Europi (područje Republike Češke i jugozapadne Poljske). Dok je u Češkoj fascioloidoza prvi puta utvrđena početkom 20. stoljeća (ULLRICH, 1930.) te je dalje redovito potvrđivana u sve većim invazijama, u Poljskoj je prvi puta utvrđena 1953. godine kod jelena običnoga u jugozapadnom dijelu ove države (ŚLUSARSKI, 1955.), a nakon toga narednih 60 godina nije bilo potvrđenog slučaja bolesti. S obzirom da veliki američki metilj uzrokuje lako uočljive makroskopske promjene na jetri, gotovo je nemoguće da veterinari i lovci nisu uočili metilja u tom vremenskom razdoblju (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2015.), nego je veća vjerojatnost da je pojava fascioloidoze zadnjih godina zapravo novi slučaj invazije metilja *F. magna* na tom području, a da je bolest utvrđena sredinom 20. stoljeća zapravo bila sporadičan nalaz bez stvaranja stabilnog žarišta. Tijekom 2015. godine je veliki američki metilj utvrđen na farmi jelena lopatara u jugoistočnoj Poljskoj na granici sa Slovačkom (KARAMON i sur., 2015.), što je dokaz da je širenje fascioloidoze

dinamičan proces koji se kontinuirano nastavlja te se bolest ubrzano javlja na novim prostorima. Navedeno ukazuje i na stalnu potrebu za nadzorom zdravstvenog stanja divljih, ali isto tako i domaćih životinja.

Na nama bližem području valja istaknuti kako je 1982. godine utvrđen prvi slučaj fascioloidoze u dolini rijeke Dunav u Austriji kod jelena lopatara u farmskom uzgoju (PFEIFFER, 1983.). Invadirana životinja je najvjerojatnije potjecala iz Nizozemske, te osim tog sporadičnog slučaja nije bilo novih pojava fascioloidoze pa tako niti stvaranja stalnog žarišta na tom području. Tijekom 1994. godine fascioloidoza je utvrđena kod jelena običnog u jugozapadnoj Slovačkoj (RAJSKÝ i sur., 1994.), a zatim i preko slovačko–mađarske granice u sjeverozapadnoj mađarskoj pokrajini Szigetköz (MAJOROS i SZTOJKOV, 1994.). Ovim nalazima metilja dolina rijeke Dunav potvrđena je kao treće veliko žarište fascioloidoze u Europi. Početkom 21. stoljeća fascioloidoza se počela intenzivnije širiti uz tok rijeke Dunava te su zabilježeni slučajevi invazija jelena običnog u Austriji u pokrajini Fischamend (WINKELMAYER i PROSL, 2001.), zatim i u Hrvatskoj na području Šeprešhata u Baranji (MARINCULIĆ i sur., 2002.), a nakon desetak godina i u Srbiji (MARINKOVIĆ i sur., 2013.). Nakon tih prvih slučajeva fascioloidoze, redovito su opisivani novi slučajevi invazija metiljem *F. magna* u jelena običnoga u Austriji od 2000. do 2010. godine (URSPRUNG i sur., 2006.; URSPRUNG i PROSL, 2011.), u Mađarskoj tijekom istraživanja u razdoblju od 1999. do 2006. (GICZI, 2008.), u Slovačkoj gdje su RAJSKÝ i sur. (2002.) godine utvrdili prevalenciju od 91,3%, a 2006. godine 17,39%, te u Bavarskoj u Njemačkoj u razdoblju od 2011. do 2013. (REHBEIN i sur., 2012.; PLÖTZ i sur., 2015.). Najnovija istraživanja na području sjeverne Srbije od prošle godine pokazala su prevalenciju od 70,6% kod pozitivnih populacija jelena običnoga (MIRČETA i sur., 2018.). Osim kod jelena običnoga sve više su opisivani slučajevi fascioloidoze i kod drugih nositelja. Tako su zabilježeni slučajevi fascioloidoze kod srne obične u Austriji (WINKELMAYER i PROSL, 2001.; URSPRUNG i sur., 2006.), Mađarskoj (GICZI,

2008.), Slovačkoj (RAJSKÝ i sur., 2002.; RAJSKÝ i sur., 2006.), te u Njemačkoj (REHBEIN i sur., 2012.), gdje je utvrđena i invazija jelena lopatara (PLÖTZ i sur., 2015.) i sika jelena (REHBEIN i sur., 2012.).

Fascioloidoza jelena se u Hrvatskoj prvi put pojavila na prijelazu iz 20. u 21. stoljeće. Krajem 1999. godine na istoku Hrvatske lovci i šumari zamijetili su pad brojnosti populacije jelena običnoga, a u istočnoj Baranji našli su promjene u jetri ispunjene smeđom tvari nalik krvnim ugrušcima. U siječnju 2000. godine jetra jelena običnoga iz područja Šepreshat pregledana je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i u njoj su utvrđena 22 odrasla stadija velikog američkog metilja, što je ujedno bio i prvi dokaz metilja *F. magna* u Hrvatskoj (MARINCULIĆ i sur., 2002.). Nakon te potvrde, postalo je jasno da je veliki američki metilj prisutan i u Hrvatskoj te da se njegovo širenje dolinom Dunava nastavlja, a s obzirom da u razvojnom ciklusu ovog parazita jedan spolno zreli metilj može proizvesti i četiri tisuće jajašaca na dan i otpustiti ih u okoliš (SWALES, 1935.), stalni nadzor fascioloidoze kod jelenske divljači postao je nužan ako se bolest želi držati unutar koliko toliko podnošljivih granica. Populacija jelenske divljači u Baranji je poprilično velika pa se potvrdom fascioloidoze u Hrvatskoj krenulo s liječenjem jelena običnoga u lovištima kojima gospodare Hrvatske šume d.o.o. Tako je u razdoblju od 2001. do 2003. godine započeto liječenje na dva načina. Jedan način bio je umješavanjem antiparazitika (triklabendazol) u sol te izlaganjem takve smjese na hranilišta divljači, a drugi način izravna pojedinačna aplikacija antiparazitika u burag životinje prilikom manipulacije kod njihovog transporta gdje se nakon određivanja tjelesne mase životinje odredila i precizna doza lijeka. Rezultati parazitoloških pretraga izmeta slobodnoživuće populacije jelena običnoga pokazali su da se nakon terapije triklabendazolom preko soli kroz vremenski period od tri godine smanjio broj izmeta pozitivnih na jajašca metilja *F. magna* s 54,1% na 41,0%, ali još je bitnije da se smanjio i broj pozitivnih nalaza izmeta s rezultatom od „više od pet jajašaca po gramu izmeta“ s 61,5% na 24,5%, čime se potvrđuje smanjivanje

izlučivanja jajašaca u okoliš. Rezultati parazitoloških pretraga izmeta jelena običnih liječenih prilikom manipulacije gdje je sigurno da je svakoj jedinki dana dostatna količina lijeka pokazuju da je prije terapije bilo 81,8% pozitivnih uzoraka, a nakon terapije taj postotak je pao na svega 4,5% i to s nalazom od 3 jajašca po gramu uzorka izmeta (JANICKI i sur., 2005.; SLAVICA i sur., 2006.). Kako se fascioloidoza može proširiti na nova područja prirodnom migracijom invadiranih jelena, ili transportom invadiranih životinja s jednog na drugo područje (PYBUS, 1990.), bilo je samo pitanje vremena kada će se bolest proširiti po Hrvatskoj. U lovnoj sezoni 2002./2003. RAJKOVIĆ-JANJE i sur. (2008.) istraživali su izmet jelena običnoga i jetre odstrijeljenih životinja s više lokacija na području istočne, središnje i gorske Hrvatske, te su, osim u Baranji (P=53,33%) utvrdili pozitivne nalaze i u Vinkovcima (P=12,5%) te u Vrbanji (P=4,76%), iz čega je vidljivo da se fascioloidoza već tada proširila cijelom dolinom rijeke Dunav i njenih pritoka. Uzorci iz središnje i gorske Hrvatske bili su negativni na fascioloidozu (RAJKOVIĆ-JANJE i sur. 2008.). Do 2004. godine otkriveni su slučajevi invazija jelena običnoga na području s desne strane Dunava uz rijeku Dravu, što znači da se fascioloidoza širi od istočne prema središnjoj Hrvatskoj (FLORIJANČIĆ i sur., 2010.).

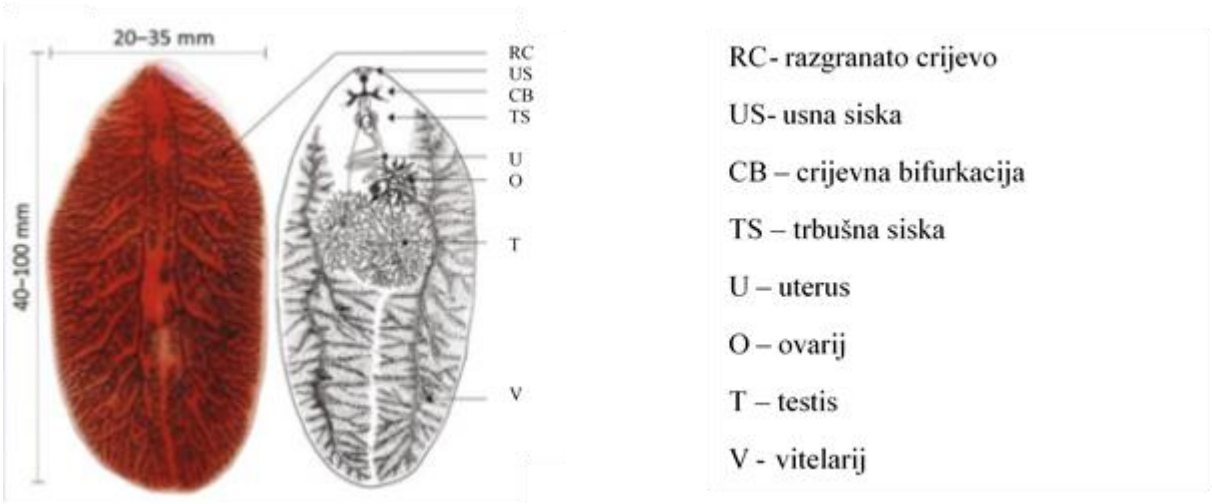
2.1.2. *Fascioloides magna* – morfološke osobitosti

Najznačajnija osobitost metilja *F. magna* je njegovo veliko i tanko tijelo zbog čega se ubraja u najveće metilje. Veličina ovog metilja se kreće između 4 i 10 cm u duljinu, te 2 do 3,5 cm u širinu, dok debljina tijela iznosi od 2 do 4,5 mm (ERHARDOVÁ, 1961.). Oblik tijela je ovalan, nesegmentiran, dorzoventralno spljošten i bilateralno simetričan. Kod spolno zrelih metilja stražnji kraj je zaobljen, a prednji blago zašiljen s tupim završetkom. Nasuprot tomu mladi metilji mogu biti tanji, s krajevima više konusnog oblika čime mogu podsjećati na metilje *Fasciola hepatica* i *Fasciola gigantica* (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Površinski sloj metilja čini kutikula, odnosno takozvani citoplazmatski sincicijalni tegument s trnićima koji su

izraženiji i dulji na ventrolateralnom rubu metilja, a nedostaju na prednjem dijelu tijela. Crvenkasto smeđa boja tijela dolazi od sadržaja crijeva koji je vidljiv preko prozirne kutikule (ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.; JONES, 2005.). Kutikula se sastoji od bazalne tegumentalne ovojnice, središnjeg dijela u kojem su diskoidalna membranska tjelešca, najčešće mitohondriji te izvana smještene tegumentalne ovojnice. Ispod bazalne ovojnice su podužna i poprečna mišićna vlakna. Primarna funkcija tegumenta je da poput mišićno-kožne ovojnice obavija metilja, ali također ima i važnu ulogu u apsorpciji i sekreciji. Njegova uloga u ekstrakciji i osmoregulaciji još uvijek nije dostatno istražena. Plašt bogat ugljikohidratima kojim je prekrivena vanjska ovojnica naziva se glikokaliks. On sadrži glikoproteine s postranim lancima oligosaharida i nepostojan je (THREADGOLD, 1976.). Smatra se da preko tegumenta glikokaliks ima iznimno važnu ulogu u apsorpciji, a zbog svog stalnog obnavljanja i promjene glikoproteina ima ulogu i u obrani metilja od imunosnog sustava nositelja (TRUDGETT i sur., 2000.). Metilj se pričvršćuje organima za pričvršćivanje, takozvanim prijanjaljkama ili siskama, i to usnom, odnosno cefaličnom siskom, koja se nalazi na prednjem dijelu tijela oko usnog otvora, te stražnjom, odnosno ventralnom siskom koja se nalazi na donjoj strani tijela. Usna siska je manja od ventralne i položena je subterminalno (JONES, 2005.). Otvaranje siski omogućuju meridijalni mišići, a zatvaraju se pomoću ekvatorijalnih i radijalnih mišića. Siske su međusobno razmaknute od 4 do 7 mm i taj razmak se ne povećava s obzirom na duljinu tijela zbog toga što se prednji kraj metilja tijekom rasta relativno skraćuje (MAJOROS i SZTOJKOV, 1994.). Već kod redija postoji probavni sustav u kojem se mogu diferencirati usni aparat i vrećice nalik crijevima. Razvijeni zatvoreni probavni sustav započinje usnim otvorom koji je smješten u blizini usne siske, u prednjem dijelu metilja. On dalje prelazi u mišićno ždrijelo pa u jednjak koji završava slijepim crijevom. Slijepo crijevo je kod odraslih jedinki smješteno postrano, a čine ga dvije jako razgranate grane koje su ispunjene crvenkasto – smeđim probavnim sadržajem. Siske i ždrijelo sadrže brojne receptorne stanice (ERHARDOVÁ-

KOTRLÁ, 1971.; ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). Jako razgranato crijevo slijepo završava u parenhimu i stvara tanki epitel (*gastrodermis*) koji ima veliku moć apsorpcije i sekrecije (STILES i HASSALL, 1895.). Svojom sekrecijom preko plazmatske membrane, probavne stanice isto tako sudjeluju i u obnavljanju glikokaliksa (DAVIS i BOGITSH, 1971.). Kako sekret sadrži glikoproteinske supstance proizlazi da gastrodermis neposredno određuje antigenska obilježja površinskog sloja metilja (HANNA i TRUDGET, 1983.). Veliki američki metilj ima protonefridijalni ekskretorni sustav koji se sastoji od mreže ekskretornih kanalića spojenih s okolinom preko ekskretornih pora. Glavnu strukturu ekskretornog sustava čine ekskretorne stanice smještene između stanica parenhima. Živčani sustav metilja sastoji se od cerebralnog ganglija smještenog iznad i pored ždrijela te živčanih vlakana (uzdužnih i poprečnih) koji se šire cijelom dužinom tijela (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Odrasli metilji su dvospolci te imaju muški i ženski spolni sustav. Spolno zreli metilji imaju jedan zajednički spolni otvor za oba reproduktivna sustava. Muški spolni sustav čine dva razgranata testisa smještena u prednjem dijelu tijela koji se nastavljaju u spermatovode (*vas eferens* i *vas deferens*) i završavaju kopulacijskim organom. Kopulacijski organ čine sjemene vrećice, *bursa cirri*, ejakulatorni organ i prostata (JONES, 2005.). U sjemenim vrećicama se privremeno skladište spermiji koji nastaju u testisima. Cirus je smješten u cirusovom tobolcu koji završava u genitalnom atriju. Iako se izmjena genetskog materijala odvija oplodnjom između dviju jedinki što je i najčešće, moguća je i samooplodnja do koje dolazi samokopulacijom kada je cirus uvučen u mišićni dio maternice (*metraterm*) istog organizma (CHEN i MOTT, 1990.). Ženski spolni sustav se sastoji od jajnika, jajovoda (*oviductus*), proširenja u kojem se pohranjuju spermiji (*receptaculum seminis*), ootipa i uterusa. U ootipu se po oplodnji oblikuje jajašce i jajčana ovojnica u čijem oblikovanju sudjeluju sekreti akcesornih spolnih žljezda koji se izlijevaju u njega. U oblikovanju ovojnice oko jajašaca sudjeluje Melisova žljezda koja je smještena oko ootipa. Vitelarij ili žumanjčište se nalazi u postranom dijelu tijela i proizvodi

žumanjčane stanice koje se preko vitelodukta ulijevaju u ootip (FLORIJANČIĆ, 2006.). Žumanjčani folikuli su bogato razgranati u stražnjem dijelu metilja te u postranim dijelovima dosežu skroz do testisa (JONES, 2005.). U uterusu se odlažu oplođena jajašca koja tamo embrioniraju, a on preko ovijektora/funkcionalne vagine završava u genitalnom atriju. Najznačajnije razlike u spolnom sustavu između metilja *F. magna* i *F. hepatica* jesu veličina i položaj vitelarija koji su kod *F. magna* smješteni ventralno od slijepog crijeva, a kod *F. hepatica* su s ventralne i dorzalne strane (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.).



Slika 3. Prikaz građe velikog američkog metilja (KRÁLOVÁ–HROMADOVÁ i sur., 2016.).

2.1.3. Razvojni ciklus metilja



Slika 4. Razvojni ciklus metilja *F. magna* (*Izvor crteža – prevedeno i prilagođeno iz: KRÁLOVÁ–HROMADOVÁ i sur., 2016.).

Prvi puta je potpuni razvojni ciklus metilja *F. magna* opisao SWALES (1935.), a kasnije je ERHARDOVÁ-KOTRLÁ (1971.) detaljno specificirala pojedine razvojne stadije životnog ciklusa. Razvojni ciklus metilja protječe kroz četiri faze. Odrasli metilj smješten je u pseudocisti u jetri tipičnoga nositelja te dnevno izlučuje i do 4 000 jajašaca s tankom ovojnicom i operkulumom (SWALES, 1935.). Prva faza razvoja odvija se u vodenom mediju nakon što

jajašca putem žuči uđu u tanko crijevo te izmetom izađu iz organizma nositelja (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Embrioniranje jajašaca traje oko 35 dana te nastaje larvalni stadij zvan miracidij – trepetljikava ličinka (SWALES, 1935.). Trajanje ove faze može varirati u ovisnosti o količini vlage i temperaturi, pri čemu niže temperature dovode do produljenog vremena embioniranja (PYBUS, 2001.). CAMPBELL (1961.) je utvrdio da temperature niže od 20°C usporavaju razvoj metilja, a temperature više od 34°C dovode do abnormalnosti tijekom embrioniranja i nemogućnosti oslobađanja miracidija. Nakon što embrionirano jajašce putem izmeta izađe u vanjsku okolinu dolazi do kompletnog razvoja miracidija koji proizvode proteolitičke enzime i pomoću njih otapaju operkulum (PYBUS i sur., 1991.) te izlaze iz jajašca (SCHWARTZ i sur., 1993.). Miracidij u okolišu vrlo brzo raste i nalazi posrednika puža barnjaka u kojeg ulazi kroz stražnji dio plućne vrećice (SWALES, 1935.). ERHARDOVÁ-KOTRLÁ (1971.) opisuje da miracidij ima šest potpuno razvijenih osjetilnih organa koji su povezani na središnji ganglij, a da pomoću pozitivne fototaksije ima afinitet za sluz puža barnjaka. Glavni posrednik za ovoga metilja u Europi je puž *Galba* (*Lymnaea*) *truncatula*, ali su kao potencijalni posrednici u novije vrijeme potvrđeni i drugi puževi poput primjerice *Radix peregra*. Ako miracidiji ne pronađu posrednika, vrlo brzo gube energiju i ugibaju s obzirom da u vlažnom okolišu mogu preživjeti svega 10 do 16 sati (ERHARDOVÁ, 1961.), odnosno maksimalno do 2 dana (PYBUS, 2001.). Druga faza razvoja protječe u posredniku gdje nakon migracije miracidija po tijelu puža nastaje novi razvojni stadij nazvan sporocista i one mogu biti pronađene posvuda po pužu (u puževoj kućici, plućnoj šupljini, blizu probavnog sustava, …), ali nikad nisu utvrđene u hepatopankreasu niti u bubregu (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Razvoj od miracidija do sporociste koja ima mišićno ždrijelo, usnu šupljinu i rudimentirani jednjak bez ostalih diferenciranih unutarnjih organa traje 8-10 sati, računajući od trenutka ulaska u posrednika (SWALES, 1935.; ERHARDOVÁ, 1961.; SCHWARTZ i sur., 1993.). Iz svake sporociste se dalje razvija po jedna majka redija koja je izdužena i pokretna te

svojom aktivnošću dovodi do puknuća stijenke sporociste i oslobađa se u tijelo puža po kojem dalje migrira. Najčešće ih se nalazi u bubregu, ženskim spolnim organima, plućnoj šupljini ili blizu analnog otvora. Iz svake majke redije razvijaju se po 4 do 6 svijetlo-žutih kćeri redija koje imaju razvijeniji oblik tijela diferenciran u dva dijela, prednji dulji i uži te stražnji kraći i širi (ERHARDOVÁ, 1961.). Iz kćeri redija dalje se razvija sljedeći razvojni stadij koji zovemo cerkarija. Iz jedne redije nastaje različit broj cerkarija, najčešće po šest (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Cerkarije migriraju u hepatopankreas i spolne organe puža te tamo završavaju svoj razvoj. Treći stadij razvoja protječe u vanjskoj okolini gdje zrele cerkarije kao slobodno živući larvalni stadij perzistiraju u vanjskom okolišu. Rezultat razvojnih stadija koji se protežu kroz 2 i pol mjeseca u pužu kao posredniku je oko 1000 cerkarija oslobođenih iz invadiranog puža. Nakon što cerkarije napuste tkivo puža i vrate se u vodu, putuju na kratkoj udaljenosti, začahure na površini vodene vegetacije i stvore sljedeći razvojni stadij nazvan metracerkarija. Metacerkarije predstavljaju invazivni stadij za konačne nositelje (SCHWARTZ i sur., 1993.). Tako začahurene metacerkarije, zaštićene dvostrukom stijenkom (tanjom unutarnjom i debljom vanjskom) ostaju invazivne na vodenoj vegetaciji (pretežno u hladnoj vodi) i do dva i pol mjeseca te čekaju da ih s vegetacijom pojedu domaći ili slobodnoživući preživači. To se najčešće događa tijekom dva razdoblja bujanja vegetacije, u proljeće te u kasno ljeto i jesen (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.; SCHWARTZ i sur., 1993.). Završni, četvrti razvojni stadij protječe u konačnom nositelju gdje nakon što metacerkarije uđu u probavni sustav hranom, ličinke se aktiviraju i probuše stijenku crijeva, putuju po ventralnom dijelu peritonealne šupljine te kada dođu do jetre, probijaju Glisonovu kapsulu i u tkivu jetre polako rastu i razvijaju se u odrasle jedinke (PYBUS, 2001.). Kompletan razvoj od ulaska u organizam konačnog nositelja do nastanka spolno zrelog metilja traje prosječno 30 tjedana (FOREYT i TODD, 1976.a), a nakon toga odrasli metilj preživi u jetri najmanje pet godina (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Lokalizacija metilja i patološke promjene u jetri te klinička

slika kod konačnog nositelja ovisi o vrsti samog nositelja (tipični, aberantni, tipa slijepe ulice). Kod tipičnoga nositelja metilji su smješteni unutar pseudociste u jetrenom parenhimu s tankom fibroznom stijenkom, najčešće u paru, ali moguć je i veći broj metilja u jednoj pseudocisti (FOREYT i sur., 1977.; SCHWARTZ i sur., 1993.; PYBUS, 2001.). Debelu stijenku pseudociste u kojoj je izoliran metilj nalazimo kod nositelja tipa slijepa ulica, dok kod aberantnih nositelja nalazimo spolno nezrele metilje i izostanak stvaranja pseudocista, odnosno nezreli metilji ne prestaju migrirati kroz tkivo jetre razarajući njen parenhim. U konačnom nositelju nezreli metilj može migrirati kroz parenhim jetre i više od godine dana prije nego što nađe drugog metilja te se zaustavi i stvori pseudocistu (FOREYT i sur., 1977.; MULVEY i sur., 1991.).

2.1.4. Klinička slika i patološke promjene kod fascioloidoze

Klinička slika i patološke promjene kod fascioloidoze uvelike ovise o tipu nositelja. Tako kod tipičnih nositelja (jelen obični, jelen lopatar, bjelorepi jelen, sika jelen,…), kada se bolest ustali na određenom području u odraslih životinja uglavnom i nema značajnijih kliničkih znakova (SWALES, 1935.; GRIFFITHS, 1962.; FOREYT i TODD, 1976.a). FOREYT (1992.; 1996.) je kod invadiranih grla ipak uočio slabiji apetit, bezvoljnost, anemiju, depresiju te posljedično gubitak tjelesne mase. Postoje i slučajevi uginuća tipičnih nositelja uslijed fascioloidoze pa su tako opisana uginuća jelena običnoga (BALBO i sur., 1987.) i bjelorepog jelena (PURSGLOVE i sur., 1977.). Patološke promjene na jetri uključuju zadebljale rubove jetre s fibroznim priraslicama po serozi, jetra je povećana zbog fibroznih inkapsuliranih pseudocista ispunjenih zrelim metiljima (PYBUS, 2001.). Po površini jetre se vidi fibrin te raspršene difuzne naslage tamnog pigmenta, a u jetri brojne pseudociste različitih veličina ispunjene smeđom mukoznom tekućinom te promjene u tkivu tipične za cirozu jetre (KARAMON i sur., 2015.). Crni ili tamno zeleni pigment je željezo porfirin koji nastaje u

crijevima nezrelih i zrelih metilja kao nusprodukt razgradnje krvi (CAMPBELL, 1960.; BLAŽEK i GILKA, 1970.). Nalaz željezo porfirina je karakterističan znak za invaziju velikim američkim metiljem te za sada nije utvrđen kod invazija drugim metiljima (CHROUST, 1987.). Kada metilj prestane s migracijom kroz jetreni parenhim, kao odgovor nositelja stvara se pseudocista tankih stijenki pomoću koje se sprječava daljnja migracija metilja kroz parenhim jetre (PYBUS, 2001.), ali i stvaraju povoljni uvjeti za daljnji opstanak metilja u jetri. Kako se u pseudocisti nakuplja sve više tamno zelene tekućine, zbog pritiska dolazi do atrofije okolnog jetrenog parenhima (SWALES, 1935.). Pseudociste komuniciraju preko žučovoda s tankim crijevom te na taj način raspadni produkti metabolizma s jajašcima metilja izlaze iz pseudociste te preko probavnog sustava nositelja dospijevaju u vanjski okoliš (CONBOY i STROMBERG, 1991.). Kod aberantnih nositelja (srna obična, muflon (*Ovis musimon*), eksperimentalno divokoza (*Rupicapra rupicapra*), te ovca, koza) ne dolazi do zaustavljanja migracije mladog metilja, te je kod njih karakterističan izostanak stvaranja pseudocisti. Uslijed toga mladi metilj svojom migracijom dovodi do opsežnoga razaranja jetrenoga parenhima, nekroze, perforacije jetrene kapsule, a isto tako svojom migracijom može perforirati i u druge trbušne i prsne organe, od kojih najčešće migrira



Slika 5. Jetra jelena običnoga invadiranoga metiljem *Fascioloides magna.* (foto M. Bujanić)



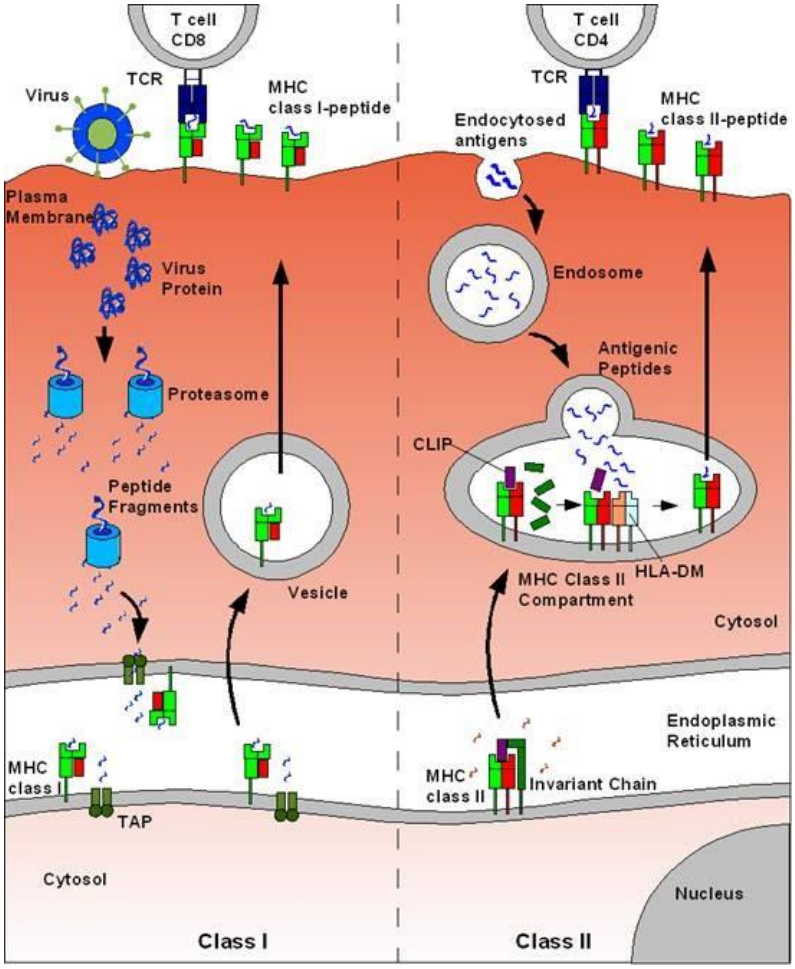
Slika 6. Presjek pseudociste u jetrenom parenhimu. (foto M. Bujanić)

u pluća (FOREYT i TODD, 1976.b; FOREYT i LEATHERS, 1980.). Kod aberantnih nositelja, uginuća nastala uslijed opsežnih razaranja jetrenoga tkiva i izraženih krvarenja nisu rijetka. Kod nositelja tipa slijepa ulica (domaće i divlje svinje, goveda, konji...) jedan od ključnih makroskopskih znakova invazije velikim američkim metiljem je prisutnost tamne pigmentacije u različitim organima (ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.), a još je vidljiva fibroza i debela stijenka pseudociste u kojoj metilj ostaje izoliran (PYBUS, 2001.). Ovaj tip nositelja zatvaranjem metilja u takvu cistu s izrazito debelim stjenkama postupno dovodi do uginuća metilja. Klinički znakovi invazije u pravilu izostaju. U novije vrijeme KONJEVIĆ i sur. (2017.) su opisali u svinje divlje nastanak pseudocista s tankim stjenkama, kao kod jelena, što možebitno ukazuje na evoluciju u odnosu nositelj-domaćin. I kod aberantnih i kod nositelja tipa slijepa ulica do sada nisu zabilježena izlučivanja jajašaca izmetom u okoliš, te oni predstavljaju završetak razvojnog ciklusa metilja i nemaju ulogu u daljnjoj epidemiologiji fascioloidoze.

2.2. Glavni sustav tkivne podudarnosti

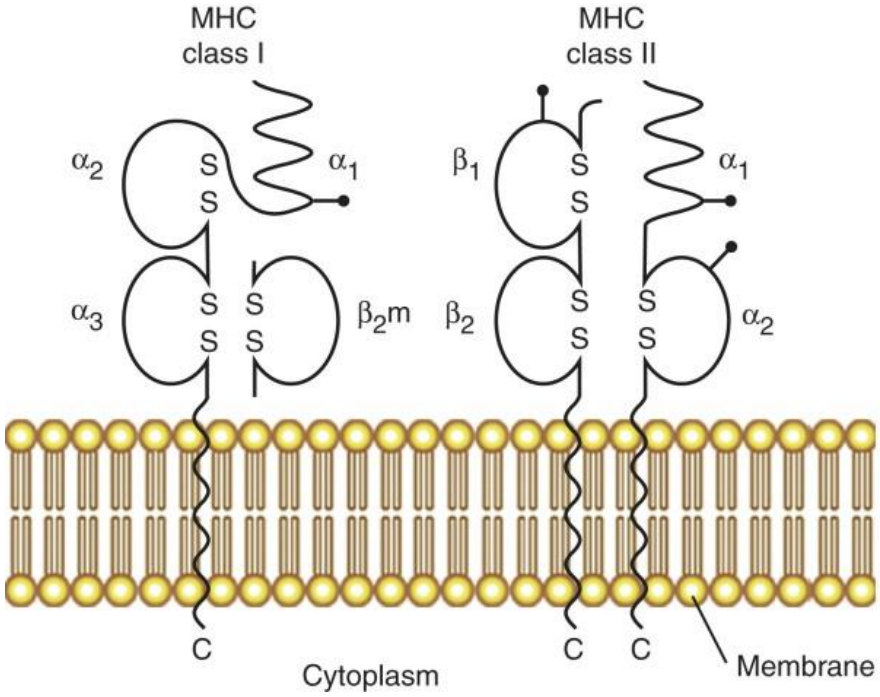
Kako bi organizam mogao pokrenuti obrambeni odgovor, odnosno reagirati na infekciju ili invaziju različitim patogenima, morao je razviti i sustav njihovog prepoznavanja. Taj sustav prepoznavanja vlastitoga od stranoga tkiva temelji se na složenim organskim molekulama (bjelančevinama, glikoproteinima, lipoproteinima, polisaharidima, lipopolisaharidima, nukleinskim kiselinama) koje se nalaze na površini svake stanice. Ove molekule pokreću imunosnu reakciju u organizmu, odnosno drugim riječima organizam ih prepoznaje kao antigen (CONNER i HARTL, 2004.). Tkivni antigeni su glikoproteini i nalaze se na svim stanicama pojedinog organizma. Kada je riječ o tkivnim antigenima vlastitog organizma govorimo o autolognim, a ukoliko su od drugog organizma (mikroorganizma) o alogenim ili ksenogenim antigenima. Tkivne antigene kodiraju geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti (**MHC** – engl.

Major **H**istocompatibility **C**omplex). Pojam MHC gena prvi puta spominje Peter A. Gorer 1936. godine (KLEIN, 1986.). Kao takav, MHC sustav se pojavio još prije oko 528 do 766 milijuna godina i javlja se samo u čeljustoustih kralježnjaka (DANCHIN i sur., 2004.). Smatra se da tokom evolucije MHC sustava dolazi do duplikacija gena i nastanka paralognih genskih regija. Tkivni antigeni su transmembranski glikoproteini uklopljeni u staničnu membranu. Dijelimo ih u dvije osnovne skupine: prva skupina su antigeni tkivne podudarnosti skupine I (molekule MHC skupine I), a druga skupina antigeni tkivne podudarnosti skupine II (molekule MHC skupine II) (MALE i sur., 2006.). Ovisno o naravi istraživanja, antigene tkivne podudarnosti neki autori uobičavaju zvati receptorima ili glikoproteinima, dok pojam antigeni koriste kada je riječ o slučaju stranih molekula, patogena ili pak prilikom transplantacije organa. Glikoproteini MHC skupine I građeni su od dva lanca, duljeg α-lanca i kraćeg β_2-mikroglobulina te se nalaze na svim tjelesnim stanicama koje imaju jezgru. Dulji α-lanac sastoji se od tri domene (α_1, α_2 i α_3) (DAY i SCHULTZ, 2013.). MHC geni skupine I kodiraju glikoproteine MHC skupine I, a oni prikazuju virusne i tumorske antigene citotoksičnim T-limfocitima. Da bi ih prikazali, proteinski antigeni se pomoću enzima razgrađuju do peptida te u endoplazmatskom omrežju nastaje kompleks peptid-receptor MHC skupine I. Taj kompleks prepoznaju citotoksični T-limfociti nakon izlaganja na površini stanice (Slika 7). Domene α lanca (α1 i α2) varijabilni su dijelovi molekule koji stvaraju žlijeb s zatvorenim krajevima čija je funkcija vezanje antigenih peptida veličine 8 do 10 aminokiselina. Domena α3 je nevarijabilna i veže se za molekulu $CD8^+$ na citotoksičnim T limfocitima (KLEIN i sur., 1997.; DENGJEL i sur., 2005.).



Slika 7. Shema razgradnje i prikazivanja stranih antigena T-limfocitima od strane receptora MHC skupine I i II (izvor: http://markyhb.com/PhD_thesis.htm)

Glikoproteini MHC skupine II sastoje se od dva transmembranska lanca, α-lanca koji ima α_1 i α_2 domenu te β-lanca koji ima β_1 i β_2 domenu, a nalazimo ih na površini nekih imunosnih stanica (makrofagi, dendritične stanice, B-limfociti) (DAY i SCHULTZ, 2013.). Ta skupina glikoproteina prikazuje vanstanične antigene pomoćničkim T-limfocitima. Makrofagi, dendritične stanice i B-limfociti ih fagocitiraju, prerađuju i prikazuju na svojoj površini u okviru MHC receptora skupine II (Slika 8). Domene α1 i β1 su varijabilne te formiraju žlijeb otvorenih krajeva čija je funkcija vezivanje antigenskih peptida veličine od 10 do 30 aminokiselina. Konstantna domena β2 vezana je na pomoćničkim T-limfocitima za molekulu $CD4^+$ (KLEIN i sur., 1997.; DENGJEL i sur., 2005.).

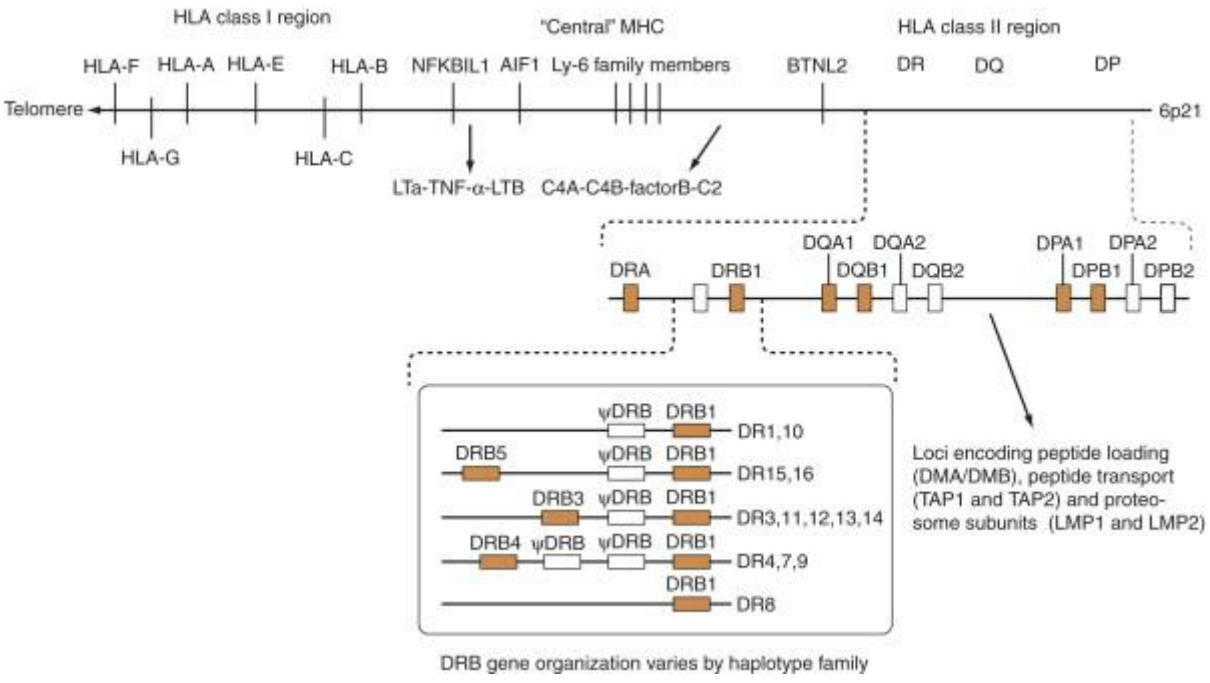


Slika 8. MHC glikoproteini skupine I i skupine II uklopljeni u dvosloj fosfolipida (GREGERSEN, 2008.).

Kao što je već navedeno, glikoproteini MHC skupine I i II određeni su kompleksom gena tkivne podudarnosti. Osnovna svojstva sustava MHC gena u najvećem broju vrsta su poligenost, odnosno da se sastoje od velikog broja gena, te polimorfnost, odnosno da su ti geni prisutni u populaciji u obliku mnogobrojnih različitih alela koji se međusobno razlikuju vrlo često u velikom broju polimorfnih mjesta nastalih mutacijama, i to najčešće substitucijama nukleotida. Ovi dijelovi genoma koji sudjeluju u prikazivanju antigena (MHC geni) najvarijabilniji su lokusi koji daju upute za sintezu proteina u kralježnjaka. Prvi proučen i dobro poznat glavni sustav tkivne podudarnosti je onaj u miša, a dijeli se u tri skupine. Geni skupine I su izrazito heterozigotni i broje oko 40 gena svrstanih u regije K, D, L, Qa i Tla. Kodiraju

glikoproteine koji se sastoje od dva polipeptidna lanca, lakog i teškog. Polimorfnost glikoproteina skupine I proizlazi iz varijabilnosti α-1 i α-2 nukleotidnog slijeda teškog lanca. MHC gene skupine II čine geni A-β, A-α, E-β i E-α koji tvore glikoproteine I-A (A-β i A-α) i I-E (E-β i E-α). Oba lanca glikoproteina, α (Mr=34 000) i β (Mr=29 000) dijelom se nalaze u stanici, a njihovi vanstanični dijelovi α-2 i β-2 jako sliče segmentu teškog lanca MHC skupine I (α-3). Kod čovjeka se sustav MHC gena nalazi na šestom kromosomu, a s obzirom da se sustav glikoproteina tkivne podudarnosti nalazi na leukocitima nazivamo ga HLA sustavom (engl. **H**uman **L**eukocyte **A**ntigens). Molekula HLA skupine I sastoji se od α lanca (45 kD) kodiranog od strane MHC gena klase I, a taj α lanac povezan je nekovalentnim vezama s β2 mikroglobulinskim lancem (12 kD) kodiranim na 15. kromosomu. MHC antigeni skupine I povezani su sa membranom jednim transmembranskim segmentom α lanca (Slika 8). Molekula HLA skupine II građena je od α (32 kD) i β (28 kD) lanca koji su povezani nekovalentnom vezom, a oba su kodirana sa MHC genom klase II i uklopljeni u membranu (GREGERSEN, 2008.). Ljudski MHC sustav uključuje oko 4 milijuna parova baza na kratkom dijelu 6. kromosoma. Na Slici 9. je vidljivo da su geni HLA skupine I i HLA skupine II smješteni na različitim mjestima na kromosomu. Pri tome se α lanac HLA gena klase I nalazi na telomernoj strani MHC molekule, a sastoji se od klasičnih dijelova HLA-A, HLA-B i HLA-C koji se još nazivaju klasa Ia gena. Postoje još dijelovi HLA-G, HLA-E, HLA-F koji se ubrajaju u klasu Ib gena, a zbog njihovog ograničavajućeg polimorfizma smatralo se da nisu funkcionalni. Međutim, pokazalo se da imaju značajnu imunološku funkciju, posebice HLA-G i HLA-E koji mogu djelovati kao ligandi inhibitornih receptora prirodnih stanica ubojica. HLA geni klase II smješteni su centromerno od klase I i njihov raspored je puno kompliciraniji. Oni su podijeljeni u tri glavne podregije, DP, DQ i DR, od kojih se svaki lokus sastoji od gena za α i β lanac koji se nazivaju DPA i DPB, DQA i DQB, DRA i DRB. Razina polimorfizma nije jednaka za sve gene. Geni za β lance su u pravilu polimorfniji te mogu sadržavati i do stotinu alela, dok su geni

za α lance manje polimorfni. Zbog te varijabilnosti došlo je do izrazite zamršenosti pri nomenklaturi tih gena, posebice sa DR podregijom, čiji α lanac nema značajnih varijacija alela, dok su geni β lanca izrazito polimorfni i razlikuju se po broju među različitim jedinkama populacije (Slika 9). DQ podregija sadrži samo jedan par gena α i β lanca, označenih DQA1 i DQB1. Za razliku od drugih lokusa DRB lokus ima gene za dodatni β lanac u čovjeka. Polimorfizam DRB lokusa dobro je istražen kod porodice Bovidae, te mačaka i pasa (AMMER i sur., 1992.; YUHKI i O'BRIEN, 1997.; WAGNER i sur., 1999.).



Slika 9. Shematski prikaz rasporeda MHC gena kod ljudi (GREGERSEN, 2008.)

Među vrstama, ali i unutar pojedine vrste, postoji veliki stupanj polimorfizma na MHC lokusima pa za pojedini lokus u nekoj populaciji može biti prisutan veliki broj alela. Kod ljudi je nulkeotidna raznolikost među alelima veća od genomskog prosjeka za dva reda veličine (GAUDIERI i sur., 2000.; GARRIGAN i HEDRICK, 2003.). Polimorfna nukleotidna mjesta

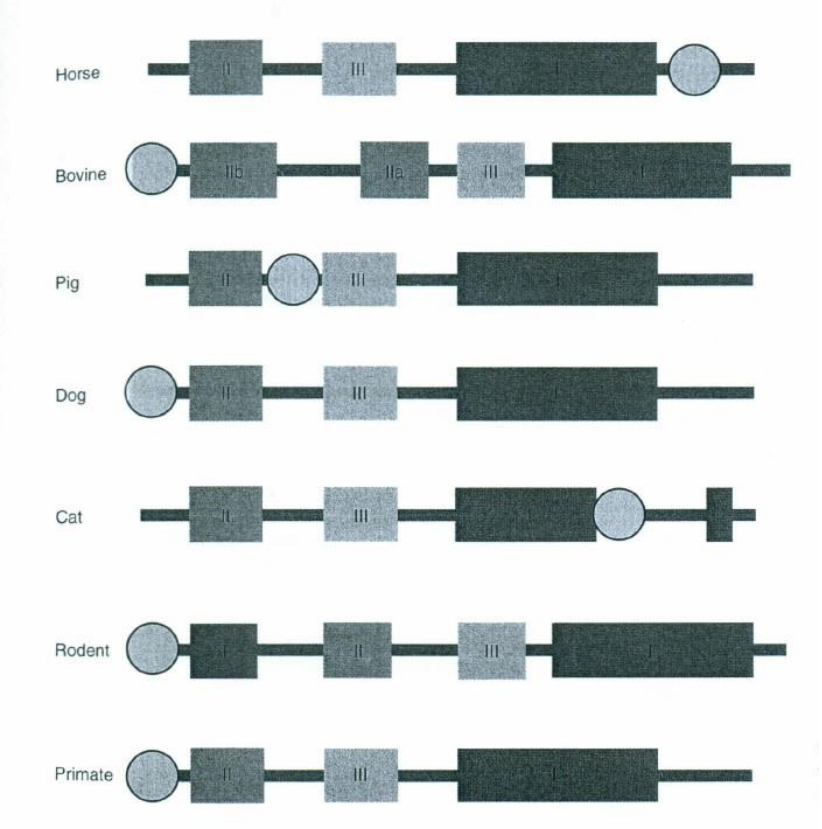
po kojima se razlikuju aleli koncentrirana su unutar hipervarijabilnih regija, a one kodiraju dio receptora u obliku žlijeba na koji prileže antigenski peptid te se to mjesto zove vezno mjesto (engl. peptid-binding region, PBR). Ta vezna mjesta receptora pokazuju visok stupanj različitosti i u broju alela koji ih kodiraju i u aminokiselinskom slijedu koji ih grade (HUGHES i YEAGER, 1998.). Vrlo bitno svojstvo MHC gena je njihova kodominantna ekspresija, odnosno, proteinski produkti / glikoproteinski receptori izraženi na površini stanica nastaju od oba roditeljska alela.

Podregije lanaca građene su od introna i egzona. Egzoni su neprekinuti kodirajući dijelovi deoksiribonukleinske kiseline (DNA), a introni su nekodirajuća područja umetnuta između egzona. Kod sisavaca je većina istraživanja MHC gena klase II usmjerena na drugi egzon DRB podregije, zbog toga što je dio gena koji kodira dio molekule bitan za vezanje antigena. Taj lokus je pokazatelj genske varijacije, odnosno nositelj funkcionalne raznolikosti receptora, jer je na tom području dokazana najveća različitost među alelima (MURRAY i sur., 1999.; SOMMER, 2005.).

2.2.1. MHC geni klase II kod životinja

MHC geni su kod konja smješteni na dvadesetom kromosomu. Za razliku od ostalih sisavaca, kod njega je DRA lokus polimorfan te je do sada poznato barem 11 alela (TIZARD, 2013.). Taj opsežan polimorfizam DRA lokusa kod magaraca na području Balkana istraživali su ARBANASIĆ i sur. (2013.a). Oni su identificirali osim 5 već poznatih alela i 2 nova alela. Kod goveda MHC geni su specifični po inverziji jednog velikog segmenta kromosoma, zbog čega je dio MHC gena klase II smješten skroz do centromere 23. kromosoma, odnosno, MHC sustav je razdvojen u dvije podregije, MHC geni klase IIa i IIb, međusobno razdvojene sa „prazninom“ od 17 centimorgana (cM) (Slika 10). MHC geni klase II kodiraju dvije molekule

proteina, DQ i DR, od kojih je DQ lokus često dupliciran. DQA, DQB i DRB su polimorfni lokusi, dok DRA nije polimorfan (TIZARD, 2013.).



Slika 10. Raspored pojedinih skupina MHC gena kod različitih domaćih životinja. (TIZARD, 2013.)

Ovce imaju smješten MHC sustav na 20-om kromosomu. Kod njih se regija MHC gena klase II sastoji od 12 lokusa, DRA, DRB, DQA1, DQA2, DQB1, DQB2, DNA, DOB, DYA, DYB, DMA i DMB, od kojih se lokus DRB javlja u 4 alela, a DQA2 se javlja u 2 alela (TIZARD, 2013.). Sustav MHC gena u svinja nalazi se na 7. kromosomu i podijeljen je centromerom, a specifičnost njihovog MHC sustava je da je najkraći od svih sisavaca, sastoji se od svega oko 2 milijuna parova baza. Klasa II MHC gena ima lokuse SLA-DR, -DQ, -DM i –DO, a nema lokusa DP (TIZARD, 2013.). Lokusi psećeg MHC sustava nalaze se na 12. kromosomu te je njihova polimorfnost jako izražena kod MHC gena klase II. Kod lokusa DRB1 su identificirana 62 alela, DQA1 lokus ima 21 alel, a DQB1 lokus 48 alela. Pojedini haplotipovi

se javljaju kao karakteristike specifičnih pasmina, a ujedno postoje velike razlike između različitih pasmina. Ta visoka varijabilnost između različitih pasmina, ali ujedno niska unutar-pasminska varijabilnost pomaže kod proučavanja razlika osjetljivosti na pojavu infekcije i autoimunih bolesti pojedinih pasmina pasa (TIZARD, 2013.). Kod mačaka je MHC sustav smješten na kromosomu B2 i po veličini je između mišjeg i ljudskog MHC sustava. MHC sustav klase II nema funkcionalan DP lokus, a DQ lokus je izbrisan, što je karakteristika jedino kod mačaka. Da bi se to kompenziralo, javlja se velika polimorfnost DR lokusa sa dva DRB gena i 24 alela, te tri DRA gena (TIZARD, 2013.).

2.2.2. Istraživanja raznolikosti MHC gena u divljih životinja

Istraživanja MHC gena u divljih životinja usmjerena su u dva pravca, istraživanje stupnja varijabilnosti te povezivanje varijabilnosti s određenim uzročnicima bolesti. Pri tome, glede odnosa prema bolesti postoje dvije pretpostavke, jedna koja predmnijeva da su heterozigotne jedinke rezistentnije te druga koja pak govori da je otpornost/prijemljivost uvjetovana točno specifičnim alelima (DOHERTY i ZINKERNAGEL, 1975.; TAKAHATA i NEI, 1990.). Unatoč činjenici da su obje pretpostavke postavljene razmjerno davno, rasprave o tome koja je od njih točna traju do danas (SOMMER, 2005.; PIERTNEY i OLIVER, 2006.). Do danas su provedena brojna istraživanja raznolikosti MHC gena na različitim vrstama sisavaca, pa su tako HEDRICK i sur. (2001.) proveli istraživanje na divljim konjima (*Equus przewalskii*). Proučavali su MHC gene kod 14 jedinki s različitih lokacija te su utvrdili da postoji šest različitih sekvenci DRB lokusa MHC gena klase II od kojih se u najviše jedinki pojavljuju samo dvije. MIKKO i sur. su 1997. godine kod sjevernoameričkih bizona (*Bison bison*) utvrdili visoku polimorfnost na DRB3-lokusu MHC gena klase II (devet različitih alela). Uspoređivali su i polimorfizam lokusa DRB3 poredbeno kod bizona i goveda te su utvrdili postojanje istih sekvenci kod obje vrste. Interalelne rekombinacije kod bizona i goveda značajno su utjecale na

stvaranje raznolikosti alela na istraživanom lokusu. HEDRICK i sur. (2000.) su istraživanjem na arapskim oriksima (*Oryx leucoryx*) našli samo tri izrazito divergentna DRB alela, što je najvjerojatnije posljedica genetskog bottle-necka s obzirom da je populacija u divljini izumrla te jedine primjerke ove vrste imamo podrijetlom od malog broja u zatočeništvu. Slične rezultate sa niskom raznolikošću alela polučilo je i istraživanje koje su RADWAN i sur. (2007.) proveli na europskim bizonima (*Bison bonasus*). Istraživanje je naime pokazalo da 172 pretražene jedinke na lokusu DRB3 MHC gena klase II imaju raznolikost u svega 4 alela. Pored toga, isti autori su proučavali i povezanost pojedinih alela sa osjetljivošću na pojavu postitisa, ali nisu dobili potvrdne rezultate. Slično kao i kod arapskih oriksa i populacija Europskog bizona je nakon istrebljenja u slobodnoj prirodi vraćena u divljinu kroz posebne programe od svega nekoliko jedinki iz zatočeništva. Nisku varijabilnost nalazimo i u geparda (*Aconyx jubatus*), azijskog lava (*Panthera leo persica*) i losa (*Alces alces*). Ipak treba naglasiti kako niska varijabilnost MHC gena nije nužno povezana s niskom genetskom varijabilnošću. Takav je slučaj u primjerice europskog dabra (*Castor fiber*), Rudolfijevog kita (*Balaenoptera borealis*), kita perajara (*Balaenoptera physalus*) i južnog morskog slona (*Mirounga leonina*). Kod nekih vrsta životinja dolazi do sve veće fragmentacije njhovog staništa, pada njihove brojnosti te populacije opstaju na tek manjem području. Tako su AGUILAR i sur. (2004.) radili istraživanja na otočnoj lisici (*Urocyon littoralis dickeyi*) s otoka San Nicolas koja je specifičan primjer izolirane populacije koja živi u prirodnim uvjetima. Unatoč izoliranoj populaciji, nivo raznolikosti na lokusima MHC gena ostao je vrlo visok. Slično tome, kod Malagaškog divovskog skočimiša (*Hypogeomys antimena*) je SOMMER (2003.) uočila da na MHC markerima nije otkriven značajniji učinak smanjenja protoka gena zbog izolacije staništa. Nadalje, očuvanost raznolikosti unatoč smanjenju brojnosti populacije i fragmentaciji i gubitku staništa utvrđena je i na primjeru vukova (*Canis lupus*) u Hrvatskoj (ARBANASIĆ i sur., 2013.b). AXTNER i SOMMER (2011.) su proučavali povezanost pojave imunosupresije pod

utjecajem parazita s MHC genima klase II. Istraživanjem su zaključili da invazija žutogrlog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) oblićima *Heligmosomoides polygyrus* ima sistemski imunosupresivni učinak. Istraživanja o povezanosti određene bolesti s točno određenim alelima provode se već desetljećima te njihovi rezultati daju osnove za daljnja istraživanja i rasprave. Tako su pronađeni specifični aleli povezani s mnogim bolestima ljudi, poput ankiloznog spondilitisa, reumatskog artritisa, Sjögrenovog sindroma i brojnih drugih. 1950-ih započela je sustavna analiza varijacija otpornosti na parazite te je to danas jedno od glavnih područja istraživanja (WAKELIN i BLACKWELL, 1993.). Da domaće životinje pokazuju odstupanja u otpornosti prema invazijama praživotinjama i oblićima dokazano je još početkom 20. stoljeća, a do danas je poznato da se takve varijacije pojavljuju i unutar i između određenih vrsta i pasmina domaćih životinja. Postoje podaci o postojanju alela povezanih s poboljšanom otpornošću na invazije oblićima (STEAR i sur., 2007.). Pored toga utvrđeno je da pojava određenih alela MHC gena dovodi do pojačane otpornosti ovaca na invazije želučano-crijevnim oblićima (SCHWAIGER i sur., 1995.). RADWAN i sur. (2010.) su istraživali uzrok velikog postotka invazije europskih bizona (*Bison bonasus*) hematofagnim oblićima *Ashworthius sidemi*. Oni su utvrdili 4 visoko divergentna alela na DRB lokusu MHC gena klase II, ali nisu našli poveznicu između specifičnih alela i postotka invazije parazitima. Nasuprot tomu, povećanje gustoće populacije zbog okupljanja tijekom zimskog hranjenja bilo je izravno povezano s povećanjem invazije ovim oblićima, što je i razumljivo zbog samog rizika prijenosa uzročnika. DITCHKOFF i sur. (2005.) su utvrdili povezanost između specifičnog alela na DRB lokusu sa otpornošću na invaziju ekto- ili endoparazitima kod različitih populacija bjelorepih jelena (*Odocoileus virginianus*). ZHANG i sur. (2015.) su utvrdili statistički značajnu povezanost alela *Aime*-DRB1*10 i prijemljivosti na parazite kod pandi (*Ailuropoda melanoleuca*), podupirući pri tome pretpostavku o određenim alelima odgovornim za otpornost/prijemljivost. S druge strane, na primjeru jelena običnog u Španjolskoj (*Cervus*

elaphus hispanicus) istraživano je kako MHC geni, veličina slezene i tjelesno stanje utječu na pojavu bolesti. Utvrdilo se da postoji veliki funkcionalni značaj MHC gena klase II (lokus DRB-2) kod obrane od parazitskih oboljenja te povezanost lokusa DRB-2 s veličinom slezene i tjelesnim stanjem same životinje (FERNANDEZ-DE-MERA i sur., 2009.). Konačno, odnos parazita, razvoja rogovlja i MHC gena u jelena običnoga proučavali su BUCZEK i sur. (2016.). Mnoga istraživanja MHC sustava prikazuju povezanost između pojedinih MHC alela/haplotipova i otpornosti, odnosno s druge strane, sklonosti ka invaziji parazitima (SOMMER, 2005.). Zbog ključne uloge MHC gena u imunološkom sustavu, odnosno zbog funkcije prikazivanja parazitskih antigena T-limfocitima, balansirajuća selekcija posredovana parazitima predstavlja se kao glavna evolucijska sila za održavanje MHC polimorfizma.

Prema svemu do sada iznesenome geni glavne tkivne podudarnosti (MHC) predstavljaju važan čimbenik u obrani organizma. Ovi geni ujedno predstavljaju najraznolikije gene u kralješnjaka. Ipak, uloga raznolikosti ovih gena u otpornosti/prijemljivosti na određene bolesti do danas nije u potpunosti razjašnjena. Naime, znanstvenici i dalje nalaze potvrde i za pretpostavku koja govori o odnosu heterozigotnosti prema bolesti, kao i za pretpostavku da su za otpornost/sklonost nekom oboljenju zaslužni točno specifični aleli. Uz takvo stanje stvari niti jedna od navedenih pretpostavki se ne može odbaciti, a sve više se čini da jedna drugu niti ne isključuju. U svakom slučaju pored navedenoga, raznolikost MHC gena zanimljiva nam je i kroz prizmu međuodnosa i promjena uzročnika bolesti i divljih životinja, neovisno o tome da li će se utvrditi povezanost između MHC gena i otpornosti prema bolesti.

2.3. Jelen obični

Ukoliko promatramo razvoj jelena s evolucijskog stajališta, on počinje prije 35 milijuna godina, u razdoblju oligocena kada su se pojavili prvi primjerci u tipu malih vodenih mošusnih jelena (JANICKI i sur., 2007.). Prvi jeleni nisu imali rogovlje, a karakterizirala ih je lubanja tipične građe za punorošce s naglašenim dugim očnjacima. Za razliku od današnjih jelena ovi prvi jeleni su imali žučni mjehur, a nastanjivali su šumsko-močvarno područje središnje Europe i Azije. Daljnji nalazi jelena datiraju od prije 20-25 milijuna godina, iz razdoblja miocena, kada se pojavljuju prvi rogovi kao tipične morfološke osobitosti karakteristične za jelena, u obliku šiljkana ili vilaša. U razdoblju poliocena dolazi do polaganog smanjivanja zuba očnjaka te se počinju javljati jeleni s rogovima u tipu vilaša (četverci) karakterističnoga za jelena *Cervus variablis*, te jeleni s tri paroška (šesterci) u tipu kineskog ili Per'Davidovog jelena (*Elaphurus davidianus*) za kojega se smatralo da je bio početak grane unutar koje se razvio i jelen lopatar. Tijekom filogenetskog razvoja očnjaci su se uglavnom izgubili ili značajno reducirali te su postali biserci, a u svega nekoliko vrsta su se zadržali do danas.

Tablica 2. Zoološko razvrstavanje jelena običnoga (IUCN, 2017.)

Domena	Eukaryota
Carstvo	Metazoa
Koljeno	Chordata
Potkoljeno	Vertebrata
Razred	Mammalia
Red	Artiodactyla
Podred	Ruminantia
Porodica	*Cervidae*
Rod	*Cervus*
Vrsta	*Cervus elaphus*

Jelen obični se ubraja u koljeno svitkovaca (Chordata), potkoljeno kralješnjaka (Vertebrata), razred sisavaca (Mammalia), podrazred plodvaša (Placentalia), red parnoprstaša (Artiodactyla), podred preživača (Ruminantia), porodicu jelena (*Cervidae*), potporodicu pravih jelena (*Cervinae*), rod jelena (*Cervus*) i vrstu jelen obični (*Cervus elaphus*). U Hrvatskoj je najrasprostranjeniji u nizinskom staništu u šumama uzduž rijeke Dunava, Drave i Save, u gorskom staništu u Gorskom kotaru, Velikoj i Maloj Kapeli, nešto manje na Velebitu i Ličkoj Plješivici, te u mediteranskom staništu u dijelu Hrvatskog primorja i u Istri. Jelen obični ima veliki radijus kretanja u potrazi za šumskim površinama. Izbjegava otvorene prostore, a ako i zađe u njih tražeći hranu to čini noću (TROHAR, 2004.).



Slika 11. Rasprostranjenost jelena običnoga u Republici Hrvatskoj (izvor JANICKI i sur., 2007.)

Prema engleskom zoologu Broocku, životinjske vrste iz porodice jelena možemo podijeliti u dvije velike podporodice zbog razlika na temelju specifične građe metakarpalnih kostiju prednjih nogu: pravi jeleni (*Plesiometacarpalia*) i nepravi jeleni (*Telemetacarpalia*). Podporodica pravih jelena u koju ubrajamo i jelena običnoga ima zadržane gornje i donje dijelove druge i pete metakarpalne kosti dok su kod nepravih jelena prisutne samo distalne epifize tih kostiju. Još jedna specifičnost anatomske građe jelena je da nemaju žučni mjehur. Divljač dijelimo prema tradicionalnoj lovačkoj podjeli na divljač niskog i visokog lova. U divljač visokog lova ubrajamo i sve vrste jelena pa samim time i jelena običnoga. Danas se ovakva podjela rijetko koristi. Novija lovačka podjela dijeli divljač prema tjelesnom pokrovu na dlakavu i pernatu divljač. Sukladno tome jelen obični se ubraja u dlakavu divljač. Prema zakonskoj podjeli navedenoj u Zakonu o lovstvu (ANONIMUS, 2005.) jeleni se ubrajaju u krupnu divljač zaštićenu lovostajem te spadaju u našu zavičajnu divljač. Mužjak se naziva jelen, ženka košuta, a mlado oba spola od teljenja do kraja ožujka druge kalendarske godine tele ili jelenče. Nakon tog razdoblja mužjake do čišćenja prvih rogova nazivamo jelenčić, a mlade ženke do prvog teljenja košutice (JANICKI i sur., 2007.).



Slika 12. Mužjaci jelena običnoga s rogovljem u bastu. (foto D. Konjević)

Tijelo jelena je skladne i snažne građe, nešto više u grebenu negoli u križima. Navedena karakteristika u kombinaciji s visokim i snažnim nogama predstavlja građu primjerenu za dugotrajno i ustrajno trčanje. Visina tijela u grebenu je 120-150 cm, a duljina od vrha njuške do korijena repa 225-275 cm (ČEOVIĆ, 1940.). Tjelesna masa odraslog jelena je u pravilu od 125 do 250, a iznimno rijetko do 300 kg, a košute od 70 do 150 kg. U proljeće i jesen tijelo im je obraslo dlakom rđasto-crvene boje dok je u zimi dlaka gušća i dulja te tamno smeđe boje. Mirisne žlijezde se kod mužjaka nalaze na korijenu repa, a kod ženki na čelu. Oba spola ih imaju na vanjskoj strani skočnog zgloba. Također, oba spola ispod tamnog i krupnog oka imaju duboku udubinu koju nazivamo suzište te se u njemu nalazi mirisna žljezda. Kod ove vrste divljači sva osjetila su odlično razvijena. Iako imaju astigmatični vid dobro razlikuju predmete u okolini. Jelenu je vrat obrastao grivom, odnosno duljom dlakom koje čini sekundarnu spolnu

oznaku. Samo mužjaci nosi rogovlje. Jelen se kreće korakom, kasom ili trkom (TROHAR, 2004.; JANICKI i sur., 2007.). Prema ponašanju, ovu vrstu ubrajamo u životinje sumraka. Znaju biti aktivne i po dnevnom svijetlu u slučaju da nema uznemiravanja u staništu. Na aktivnost uvelike utječe duljina trajanja osvjetljenja i intenzitet sunčeve svjetlosti. U slučaju da je svijetlost slabija i kraće traje, životinje su aktivnije tijekom dana i obrnuto. Jeleni imaju jako razvijeni socijalni nagon te zbog toga cijele godine žive u krdima unutar kojeg su odnosi među jedinkama ustanovljeni prema principima hijerarhije. Postoje dva tipa krda, prvo čine košute s teladi i jedno- do dvogodišnjim jelenima te takva krda vode košute, a drugo čine jeleni ostalih starosti te njih vode mladi jeleni. Stari jeleni žive osamljeno izvan krda. Osim socijalnog nagona, kod jelena postoji i nagon sezonskog premještanja po području staništa. Ljeti odlaze u brdske predjele, a zimi u nizinske te se ovakav tip migracije naziva vertikalnim. Također su poznate migracije duž vodenih tokova rijeka, posebno u doba rike i ovakva seljenja se nazivaju horizontalnim. Osim zbog zadovoljenja potreba za parenjem sele se i iz potrebe za hranom. Pripadnici porodice jelena imaju rogovlje, produženja čeone kosti, koji su po građi prava kost te se zbog toga nazivaju punoroščima. Njima rogovi rastu iz rožišta koji nastanu još prije rođenja u oba spola, ali kod ženki ubrzo propadaju. Novi rogovi narastu kroz nekih 120 dana od ožujka/travnja do kraja srpnja (TROHAR, 2004.). Sam ciklus rasta roga prolazi kroz četiri faze: faza rasta, mineralizacije, skidanja čupe (čupa / bast / runja / liko / velvet – specifičan kožni pokrov roga za vrijeme njegovog rasta) te faza odbacivanja roga. U početku je rog građen od hrskavice, tijekom rasta je obavijen kožom i dlakom (čupa/runje), a ispod kože i sredinom roga prolaze krvne žile koje prehranjuju rog. Rast roga potiču brojni ekološki i fiziološki čimbenici. Porastom količine spolnog hormona u krvi zaustavlja se rast i potiče mineralizacija roga. U srpnju jelen skida čupu na način da rogovima struže po grmlju, drveću i drugoj vegetaciji. S obzirom da se ispod kože koju skida nalazi krv dolazi do njenog miješanja sa sastojcima kore drveća i sa zrakom te na taj način nastaje boja roga. Posljednjih dana rasta i

mineralizacije rog postaje ikričav zbog taloženja minerala. Punoroščima svake godine otpadaju rogovi, a nakon odbacivanja odmah mu počinju rasti novi. Sa svakim novim ciklusom rasta roga, ukoliko su zadovoljeni svi čimbenici koji utječu na njegov rast, nastaje razgranatija forma rogovlja bogatija paroščima. Rog se sastoji od grane koja na bazi ima vijenac, i od parožaka. Parošci mogu na vrhu roga tvoriti krunu. Maksimalan razvoj rog postigne u 9.-12. godini nakon čega se vrijednost rogovlja smanjuje. U većine jelena prvo rogovlje se pojavljuje u drugoj godini života, nakon 6 do 9 mjeseci se odbacuje te izrasta novo. Taj je godišnji "ciklus rasta rogovlja" pravilan u jelenskih vrsta umjerenog klimatskog područja i ponavlja se tijekom cijelog života jedinke (JANICKI, 2004.; JANICKI i sur., 2007.).

Jelene ubrajamo u preživače. Od 24 sata jelen najviše vremena potroši na traženje i uzimanje hrane, zatim na preživanje, a ostatak otpada na mirovanje i san. Jelenska divljač hranu traži i uzima u pet do sedam navrata tijekom 24 sata. Višekratno uzimanje uvjetovano je činjenicom da uzimaju hranu velike zapremnine te im zbog toga burag ne može odjednom primiti količinu hrane potrebnu za 24 sata. Jeleni najviše konzumiraju zeleno bilje, pretežno lišće, izbojke i grančice listača, također pasu travu i jedu zeljasto bilje. U slučaju oskudice brste grančice i izbojke četinjača, a u slučaju potrebe gule koru s drveća. Pretpostavlja se da je razlog tome pomanjkanje hrane, nemogućnost pristupa do prikladnih vrsta hrane ili pomanjkanje mikroelemenata, vitamina i drugih tvari u redovitoj hrani. Guljenje kore negdje u potpunosti izostaje, dok u drugih populacija znade biti izrazito naglašeno. Također vole jesti i razne plodove kao što su divlje voće, žir, bukvica, kesten, gljive, zeleno žito, mladi kukuruz. Jeleni hranom primaju suvišne količine kalija, a nedovoljne količine natrija te zato ližu prirodnu ili umjetnu sol. Osim vode za piće, koju djelomično dobivaju i iz hrane, potrebna im je i voda za kaljužanje (CAR, 1967.; JANICKI i sur., 2007.).

Potpuno formirano zubalo odrasog jelena ima 34 zuba koji su izrasli do dobi od oko tri godine (WAGENKNECHT, 1984.). Zubna formula jelena je I 0/3, C 1/1, P 3/3 i M 3/3. Košuta

donese tele na svijet sa 8 mliječnih sjekutića. Nakon mjesec dana tele dobije mliječne očnjake i po tri mliječna pretkutnjaka što je ukupno 22 mliječna zuba. S navršenom prvom godinom života teletu počinju ispadati mliječni zubi te ih zamjenjuju stalni. Tek se u trećoj godini života u potpunosti izgradi zubalo. Za ovu životinjsku vrstu značajno je da kutnjaci nemaju mliječne prethodnike (TROHAR, 2004.; JANICKI i sur., 2007.). Po zubima se dob životinje može razmjerno točno odrediti samo u razdoblju formiranja zuba, odnosno do 30 mjeseci života. Nakon toga se dob prema zubalu može određivati samo orijentaciono makroskopski, i to prema istrošenosti zuba, odnosno, na presjeku prema stupnju taloženja sekundarne zubnine (metoda po Eidmanu). Detaljnije opise upotrebe zubala u procjeni dobi, uključujući i složenije metode pomoću inkrementnih linija rasta te dodatnih analiza rendgenom i slično daju KONJEVIĆ i sur. (2006.) te ŠKVORC i sur. (2018.). Većina tih metoda u svakodnevnoj praksi je u manjoj primjeni.

Životni vijek jelena iznosi 15 do 20 godina. Parenje jelena naziva se rika jer se mužjaci u to doba javljaju specifičnim glasom, a njihovo glasanje zovemo rikanje ili rika. Ono počinje krajem kolovoza ili početkom rujna te traje 5 do 6 tjedana, ali sve ovisi o vremenskim prilikama. Rika je bolja za hladnijeg vremena, a ako je toplo zna se otegnuti i u listopad. Također, u nizinama počinje prije nego u brdskim staništima. Ranije počinju rikati stari jeleni, a za vrijeme rike dolazi do borbi između jelena za pravo parenja na mjestima koja se nazivaju "rikališta". To su čistine unutar šume ili neke livade. Jeleni riču da bi dozvali i okupili što više košuta u harem, najčešće od 4 do 6. U doba parenja jeleni mogu oslabiti i do 30 kg. Bređost u košuta traje 230-240 dana ili oko 34 tjedna, nakon kojih košuta oteli jedno ili dva teleta tjelesne mase od 7 do 12 kg. Telad nema razvijene mirisne žlijezde te nakon poroda ostaje prikrivena u travi koja predstavlja najbolji zaklon od prirodnih neprijatelja. Tele siše od 3 do 4 mjeseca i osamostali se s 9 do 12 mjeseci života (DARABUŠ I JAKELIĆ, 2002.; JANICKI i sur., 2007.).

Dob žive divljači kod oba spola ocjenjuje se po obliku glave i tijela te po ponašanju. Uz navedeno, kod muških grla koja su razvila rog dob se može procijeniti još i po vremenu kada skidaju čupu s rogova, kada odbacuju rog te prema obliku roga. Dob mrtve jelenske divljači ocjenjuje se po stupnju sraštenosti hrskavice epifize bedrene kosti, stupnju okoštalosti grkljana, stupnju razvoja dentina te stupnju istrošenosti zubala. Također, dob se može ocijeniti i po visini krune zuba sjekutića, po kutu što ga zatvaraju sjekutići s vodoravnom podlogom na kojoj stoji vilica te po odnosu duljine i visine rožišta. U svakodnevnoj primjeni najčešće u obzir dolaze dinamika izmjene mliječnog u stalno zubalo, stupanj istrošenosti zubala i stupanj okoštalosti hrskavice bedrene kosti (CAR, 1967.).

3. CILJ I PRETPOSTAVKA ISTRAŽIVANJA

Jelen obični jedna je od najvažnijih vrsta divljači u Republici Hrvatskoj. Iako je riječ o zavičajnoj vrsti rasprostranjenoj na većem dijelu Republike Hrvatske do danas nema podataka o raznolikosti MHC gena jelena običnog. Pretpostavka istraživanja je da u jelena običnih na području Republike Hrvatske postoji relativno visoka raznolikost MHC gena. Također je pretpostavka da postoje razlike u distribuciji alela MHC gena između zapadnog i istočnog područja Hrvatske.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1) utvrditi raznolikost MHC gena jelena običnoga

2) utvrditi postoje li razlike između populacija jelena Slavonije i Baranje, Moslavine, te Gorskog kotara

3) utvrditi postoje li razlike vezano uz invaziju velikim američkim metiljem

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Područje uzorkovanja

Za ovo istraživanje koristio sam uzorke prikupljene u okviru uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost pod oznakom UIP 3421 "Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja". Uzorci su prikupljeni u okviru provođenja redovitog odstrela prema lovno-gospodarskoj osnovi u lovnim sezonama 2014./2015. – 2016./2107. u lovištima na području Radinja, Spačve, Vrbanje, Tikveša, Lipovljana i Gorskog kotara. Pritom su dostavljane jetre jelena običnoga, koje sam prvo analizirao makroskopskim pregledom pri čemu sam odredio ima li priraslica po jetri, promjena boje i oblika površine jetre, te da li je prisutan željezo-porfirin. Istraživanje je obuhvatilo patološki nalaz 117 grla jelenke divljači, od čega je uzorak jetre od 91 grla skupljen u posavskom bazenu i Baranji (21 košuta, 34 jelena i 36 grla nepoznatog spola), odnosno od 26 grla iz Gorskog kotara (5 košuta, 7 jelena i 14 grla nepoznatog spola). Lokacije sam odabrao prema prisutnosti i invadiranosti metiljem *Fascioloides magna*. Državno otvoreno lovište br. XIV/9: "PODUNAVLJE-PODRAVLJE" nalazi se u sjevernoistočnom dijelu hrvatskog Podunavlja te se prostire uz lijevu i desnu obalu rijeke Dunav. Unutar lovišta je jednim dijelom smješten i Park prirode "Kopački rit" koji ima veliki utjecaj na epidemiologiju fascioloidoze. Na ovom području se nalazi veliki broj rukavaca, depresija, brana, kanala i vlažnih livada koji pogoduju zadržavanju vode tijekom cijele godine, dijelom u vidu povremenih ili trajnih vodotoka. Vegetaciju čini karakteristična ritska šuma, prilagođena čestim plavljenjima, izmjenama vode, dugačkim trajanjima, ponekad i više od pola godine. Biljne zajednice ovoga područja čine asocijacije rakite (*Salix purpurea*), krhke vrbe (*Salix fragilis*), bademaste vrbe (*Salix triandra*), bijele vrbe (*Salix alba*), košaračke vrbe (*Salix viminalis*), te bijele i crne topole (*Populus alba* i *Populus nigra*). Od glavnih vrsta krupne divljači u lovištu obitavaju jelen obični, srna obična i svinja divlja. Državno otvoreno lovište

broj: III/39 - "OPEKE II" ubraja se u nizinska lovišta s poplavama, nadmorske visine do 99 m. Lovište se teritorijalno nalazi na području Sisačko-moslavačke županije, a ovlaštenik prava lova je Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Ukupna površina lovišta iznosi 8342 ha, od čega šume zauzimaju 5927 ha, poljoprivredne površine 2024 ha, a vode stajaćice i tekućice 103 ha. Razdoblja povišenog vodostaja javljaju se tijekom godine u dva navrata, u proljeće i u jesen, kada dolazi do plavljenja gotovo 70% lovišta. Srednja godišnja količina oborina iznosi 915 mm. Zajedničko otvoreno lovište VIII/110 „CRNA GORA“ je lovište gorskog tipa, a smješteno je u sjevernom dijelu Primorsko-goranske županije na granici sa Republikom Slovenijom. Nadmorska visina lovišta kreće se od najniže točke 380 m do najviše točke 1197 m (vrh Crne gore). Karakter lovišta je brdsko-planinski. Zemljopisni položaj lovišta je u najsjevernijem dijelu Gorskog kotara. Teren je vrlo razveden, a tlo silikatno, vrlo teško prohodno i većim dijelom pretežu vapnenci s vrtačama, škrapama i glavicama. Ako se izuzme rijeka Čabranka i povremeni potoci Tršćanka i Sušica, lovište uglavnom pati od bezvodnosti. Od vegetacije dolaze slijedeće zajednice: - Dinarska bukovo-jelova šuma (*Abieti-Fagetum dinaricum* Treg. 1957.), šuma jele s rebračom (*Blechno-Abieteum* Horv.), smrekova šuma na dolomitu (*Piceetum dolomiticum* Ht. 1950.), bukova šuma s rebračom (*Blechno-Fagetum* Ht. 1950.), šuma bukve s kukurjekom (*Helleboro-Fagetum* Pelcer) i šuma crnog graba s crnjušom (*Erico-Ostryetum* Horv.). U lovištu od glavnih vrsta divljači dolaze jelen obični, srna obična, svinja divlja i smeđi medvjed (*Ursus arctos*). Pored njih u lovištu se također nalaze i sivi vuk (*Canis lupus*) i euroazijski ris (*Lynx lynx*).Od prikupljenih jetara uzeo sam uzorak tkiva za molekularnu analizu nukleotidnih sekvenci DRB II MHC gena u Eppendorf epruvetu, pohranio u 96%-tnom alkoholu, pravilno obilježio internim brojevima zbog daljnje sljedivosti uzoraka i smrznuo na -20^{o}C do daljnjih analiza.

4.2. Parazitološka pretraga jetara

Tkivo jetre rezao sam podužnim rezovima na slojeve debljine oko 2 cm i temeljito pregledavao svaki isječak obostrano. Utvrđene promjene (lezije jetrenog tkiva i nađene metilje) razvrstao sam prema osobitostima, na mlade i zrele metilje te metilje u raspadu, a promjene na migratorne puteve metilja i pseudociste. Prema starosti procesa pseudociste sam razvrstao na nezrele i zrele ciste te ciste u raspadu. Pobrojane promjene upisao sam u Excell tablicu za daljnju obradu rezultata. U tablicama sam koristio nazivlje pojedinih razvojnih stadija metilja i pseudocisti koje se spominje u dostupnoj literaturi o prethodnim istraživanjima na području Republike Hrvatske.



Slika 13. Prikaz načina rezanja jetre prigodom parazitološke pretrage. Vidljivi znaci željezo-porfirina, pseudociste i metilji. (foto M. Bujanić)

4.3. Koprološka pretraga izmeta

Koprološkom pretragom izmeta utvrđujemo prisutnost jajašaca i ličinki parazita u izmetu. Sama pretraga koju sam provodio uključuje sedimentaciju, flotaciju i imunoflorescenciju. Nakon što sam iz završnoga crijeva uzeo uzorak izmeta, u urinsku čašu sam izdvojio 5g i razmutio ga u vodi, te procijedio kroz sito na kojem je zaostao krupni dio otopine. Procijeđenu otopinu sam ulio u epruvetu i centrifugirao na 2500 okretaja u minuti kroz pet minuta. Izdvojenu tekućinu sam bacio, a na sediment nadodao flotacijsku otopinu cink-sulfata ($ZnSO_4$), zatim sam pomoću vorteksa napravio homogenu otopinu te na vrh epruvete stavio pokrovno stakalce i sve zajedno ponovno centrifugirao. Flotacijska otopina je zbog različitih specifičnih težina koncentrirala i izdvojila jajašca i ličinke parazita na samom vrhu tekućine, odnosno zalijepila ih na pokrovno stakalce. Pokrovnicu sam nakon centrifugiranja stavio na predmetnicu i pod mikroskopom odredio prisutnost jajašaca pojedinih parazita. Imunoflorescencijom sam utvrđivao prisutnost cisti bičaša *Giardia* sp. (ECKERT i sur., 2008.), ali to nije izravni dio ovoga doktorskoga rada.

4.4. Izolacija DNA, Sangerovo sekvenciranje i sekvenciranje sljedeće generacije (engl. Next Generation Sequencing)

Za izolaciju DNA koristio sam komercijalni paket Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), te proveo postupak prema uputama proizvođača. Izoliranu DNA pohranio sam u hladnjaku na 4°C. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnaža se odsječak genomske DNA (egzon 2 lokusa DRB MHC skupine II) duljine oko 300 pb. U svrhu umnažanja koristio sam komercijalni komplet HotStarTaqMaster Mix koji sadrži pufer, dNTP-ove i HotStarTaq DNA polimerazu. Početnice za provedbu PCR reakcije odabrao sam iz literature (SIGURDARDOTTIR i sur., 1991.). To su bile početnice LA31 (5'-

GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT-3') i LA32 (5'-TTCGCGTCACCTCGCCGCTG-3'). Reakcijska smjesa je sadržavala 1/2 ukupnog volumena HotStarTaq Master Mixa, 0,2 µM svake početnice, 1/10 ukupnog volumena izolirane DNA, te vode do konačnog volumena. Konačni volumen je bio ili 8 µL za potrebe provjere uspješnosti PCR reakcije ili 20 µL za potrebe sekvenciranja. Uvjeti PCR reakcije bili su sljedeći: 5 min početnoga zagrijavanja na 95°C nakon čega je slijedilo 35 ciklusa PCR-a od kojih se svaki sastojao od 1 min na 95°C, 30 sec na 50°C, te 1 min na 72°C. PCR reakcija je završavala konačnom elongacijom tijekom 10 min na 72°C. Nakon umnažanja su PCR produkti ohlađeni na 4°C i spremljeni u hladnjak do elektroforeze. Potvrdu prisutnosti PCR produkta proveo sam elektroforezom na agaroznom gelu. Uspješno umnožene PCR produkte poslao sam na sekvenciranje u poduzeće Macrogen, Južna Koreja.

S obzirom da sam utvrdio da su elektroferogramski ispisi sekvenci sadržavali više od 2 alela po jedinci, zaključio sam da je DRB lokus dupliciran u istraženih jedinki, te sam dalje proveo sekvenciranje egzona 2 lokusa DRB korištenjem tehnologije sekvenciranja sljedeće generacije (NGS, engl. Next Generation Sequencing) na opremi S5 Termo Fisher.

Kako bismo pripremili knjižnicu za analiziranje egzona 2 DRB lokusa MHC sustava skupine II pomoću NGS tehnologije najprije sam pripremio PCR produkte koristeći produljene uzvodne početnice. Takve početnice sadrže slijedove nukleotida koji predstavljaju adapter, barkod i linker, a na koje se nadovezuje početnica koja je specifična za regiju genoma koju želimo amplificirati i sekvencirati (LA31 u ovom istraživanju). Za analizu svake jedinke sam koristio drukčiju sekvencu produljene uzvodne početnice, a razlikovale su se upravo u barkod slijedu (u prilogu, Tablica 15).

Za svaki uzorak sam proveo po 3 PCR reakcije, koristeći produljene uzvodne početnice i nizvodnu početnicu LA32, u ukupnom volumenu od 25 µL. Prisutnost PCR produkata svakog triplikata sam provjerio na 2 %-tnom agaroznom gelu te su se PCR produkti iz triplikata spojili

u jednu tubicu. Takve uzorke sam očistio pomoću Agencourt magnetskih kuglica na način da sam prvo pripremio 10 ml svježeg 70 %-tnog etanola. Zatim sam dodao 0,7 PCR volumena Agencourt magnetskih kuglica u pripremljeni uzorak te pomoću pipete dobro izmiješao uzorak. Nakon kratkog centrifugiranja pripremljenu smjesu inkubiramo kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim tubice postavimo na magnetski stalak i pričekamo tri minute da se tekućina potpuno izbistri te na kraju pomoću pipete odvojimo supernatant. Epruveta ostaje na magnetskom stalku te u nju dodajemo 500µL 70 %-tnog etanola, inkubiramo 30 sekundi i lagano okrećemo epruvetu dva puna kruga kako bi magnetske kuglice sporo prošle kroz tekućinu. Nakon 30 sekundi pipetom odvojimo supernatant i još jednom ponovimo ispiranje s etanolom. Nakon kratkog centrifugiranja vratio sam epruvetu na magnetni stalak i s pipetom odvojio preostali etanol te inkubirao do maksimalno 5 minuta da se kuglice s DNA osuše. Nakon toga sam maknuo epruvetu s magnetnog stalka i dodao 25 µL TE pufera te dobro promiješao pipetom, a zatim i vorteksom, te na kraju centrifugirao. Epruvetu sam vratio na magnetni stalak i inkubirao jednu minutu, a kad je tekućina postala bistra, supernatant koji predstavlja naš uzorak sam prebacio u novu epruvetu. Koncentraciju PCR produkta sam izmjerio s Qubit 3.0 fluorometrijom pomoću Qubit dsDNA Assay Kit reagensa. Sve uzorke sam normalizirao na način da sam pripremio jednake koncentracije te ih sjedinio u jednu zajedničku knjižnicu. Knjižnicu sam pročistio s Agencourt magnetskim kuglicama te ponovno izmjerio koncentraciju s Qubit 3.0 fluorometrom koristeći se Qubit dsDNA HS Assay Kit reagensima. Tako pripremljena knjižnica nanesena je na protočnu ćeliju Ion 510 Chip te je reakcija sekvenciranja provedena na S5 Termo Fisher sekvenatoru.

4.5. Računalna analiza rezultata

Očitanja dobivena sekvenciranjem analizirana su uzorak po uzorak u sljedećim koracima:

1. Filtriranje očitanja po duljini.

2. Generiranje konsenzusne sekvence i višestrukog poravnanja sekvenci (engl. MSA – Multiple Sequence Alignment) za sva očitanja.

3. Podjela očitanja u skupine prema razlikama u odnosu na konsenzusnu sekvencu.

4. Ponavljanje točaka 2 i 3 za grupe očitanja dobivene u točki 3.

5. Određivanje reprezentativnih sekvenci za svaku grupu i odabir do četiri najbolje sekvence.

6. Usporedba s poznatim referencama i zbirna analiza.

Duljina očitanja za svaki uzorak značajno je varirala, s najmanjim duljinama od oko 25 parova baza i najvećim duljinama i preko 400 parova baza. Međutim, za svaki uzorak najveći broj očitanja bio je duljine 296 parova baza te su gotovo sva očitanja bila unutar raspona od 290 do 310 parova baza. U prvom koraku, sva očitanja čija je duljina izlazila izvan tog raspona, izbačena su iz daljnje analize.

Nakon toga, nad svim preostalim očitanjima izgrađen je POA graf (engl. POA – partial order alignment), koristeći alat SPOA (https://github.com/rvaser/spoa). Iz grafa je određena konsenzusna sekvenca, te višestruko poravnanje sekvenci. Konsenzusna sekvenca dobivena u prvom koraku predstavlja reprezentativnu sekvencu svih očitanja zajedno. U slučaju kada se u uzorku nalazi više različitih alela, ona ne mora imati biološko značenje, međutim može poslužiti da očitanja razdvojimo u manje skupine koje će predstavljati pojedine alele.

Koristeći matricu višestrukog poravnanja, pronađene su kandidatne lokacije na kojima se za podjednak broj očitanja nalaze različite nukleotidne baze (npr. 'C' i 'T'). Očitanja su nakon toga podijeljena u skupine prema različitim vrijednostima nukleotida na određenoj lokaciji. Za svaku je skupinu ponovno izrađen POA graf, te je određena konsenzusna sekvenca i višestruko poravnanje. Postupak razdvajanja na manje grupe ponovljen je još jednom. Kada u postupku razdvajanja očitanja u manje grupe nisu uočene značajne razlike u matrici višestrukog poravnanja, zaključeno je da trenutna skupina očitanja predstavlja samo jedan alel, te je postupak zaustavljen.

Nakon što su oba koraka razdvajanja očitanja u grupe završena, za svaku grupu generirana je konsenzusna sekvenca. U slučaju kada je postojalo više od četiri grupe, odabrane su one četiri grupe očitanja s najvećim brojem očitanja jer su smatrane najvjerodostojnijima. Konsenzusna sekvenca uzeta je kao predstavnik svake grupe te su sa svih konsenzusnih sekvenci uklonjeni adapteri. Sekvence su zatim uspoređene s poznatim sekvencama koristeći egzaktnu usporedbu nizova te alat Minimap2 (https://github.com/lh3/minimap2). Za sve korake u filtriranju očitanja, analizi POA grafa, grupiranju sekvenci te za dodatne analize napisane su programske skripte koristeći programski jezik Python.

4.6. Program MEGA 5.01 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

MEGA X je računalni paket čija je namjena evolucijska analiza nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova (TAMURA i sur., 2013.). Program MEGA koristio sam za pregled nukleotidnih sljedova alela pronađenih u ovom istraživanju, prevođenje nukleotidnih sljedova u aminokiselinske, odabir najprikladnijeg nukleotidnog supstitucijskog modela, te računanje nukleotidne evolucijske udaljenosti među alelima.

Najprikladniji model nukleotidne supstitucije utvrđen je programom Model Selection, koji je implementiran u programskom paketu MEGA. Analiza koristi statističku metodu Maximal Likelihood, a najboljim supstitucijskim modelima smatraju se oni sa najnižim Bayesovim informacijskim kriterijem. Evolucijsku udaljenost računao sam među alelima pronađenim u uzorku. Za računanje nukleotidne evolucijske udaljenosti koristio sam model Tamura 3-parameter uz Gama distribuciju (T92+G). T92 model u obzir uzima nejednak udio različitih nukleotida u sekvenci, a T92+G, ugrađuje i gama parametar (G). Gama parametar pretpostavlja da varijacije u učestalosti supstitucija među različitim nukleotidnim mjestima imaju oblik gama distribucije.

4.7. Statistička obrada podataka

Razlike u učestalosti invadiranosti metiljem između spolova, prisutnosti pojedinih alela MHC gena te povezanosti alela i jačine invazije ispitane su Fisher-ovim egzaktnim testom (ZAR, 1999.), $\chi 2$ testom te McNemar $\chi 2$ testom (TIBCO Software Inc., 2018.). Razlike u broju metilja po razvojnoj fazi ispitane su t-testom. Za ispitivanje normaliteta raspodjele korišteni su Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk test (ZAR, 1999.).

Normalitet raspodjele podataka testiran je Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovima. Za ispitivanje povezanosti među varijablama korišten je Spearmann-ov rang korelacijski koeficijent. Testiranje podatka među skupinama provedeno je T-testom i Kruskal-Wallis testom.

Dobiveni podaci analizirani su pomoću Statsoft 13 programa (TIBCO Software Inc., 2018.).

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Rezultati parazitoloških analiza

Prikaz rezultata koprološke pretrage izmeta dan je u Tablicama 3. i 4.

Tablica 3. Rezultati koproloških pretraga izmeta uzoraka jelena običnoga iz Gorskog kotara

INTERNA OZNAKA	LOKACIJA	PODACI O ŽIVOTINJI	PARAZITOLOŠKI NALAZ
J 1 GK	Gorski kotar		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 2 GK	Gorski kotar		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, pojedina jajašca strongilidnog tipa, 1 cista *Giardia* sp.
J 3 GK	Gorski kotar		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, pojedine oociste *Eimeria* sp.
J 4 GK	Gorski kotar	Ž	Negativan
J 5 GK	Gorski kotar	M	Negativan
J 6 GK	Gorski kotar	Ž	Negativan
J 7 GK	Gorski kotar	M	Negativan
J 8 GK	Gorski kotar	Ž	Negativan
J 9 GK	Gorski kotar	M	Negativan
J 10 GK	Gorski kotar	Ž	Negativan
J 11 GK	Gorski kotar	M	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 12 GK	Gorski kotar	M	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 13 GK	Gorski kotar	M	Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca *Capillaria* sp.
J 14 GK	Gorski kotar	M	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 15 GK	Gorski kotar	tele	Negativan
J 16 GK	Gorski kotar	Ž	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 17 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 18 GK	Gorski kotar		Negativan
J 19 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 20 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 21 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa
J 22 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 23 GK	Gorski kotar		Negativan
J 24 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa
J 25 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 26 GK	Gorski kotar		Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa

Tablica 4. Rezultati koproloških pretraga uzoraka izmeta jelena običnoga iz Lipovljana

INTERNA OZNAKA	LOKACIJA	PODACI O ŽIVOTINJI	PARAZITOLOŠKI NALAZ
J 9 L	Lipovljani		Negativan
J 10 L	Lipovljani		Negativan
J 11 L	Lipovljani		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 12 L	Lipovljani		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, pojedina jajašca *Capillaria* sp.
J 13 L	Lipovljani		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 14 L	Lipovljani		Negativan
J 15 L	Lipovljani		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, 1 jajašce *Nematodirus* sp.
J 16 L	Lipovljani		Negativan
J 17 L	Lipovljani		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, pojedina jajašca *Capillaria* sp.
J 18 L	Lipovljani		Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 19 L	Lipovljani		Negativan
J 20 L	Lipovljani		Negativan
J 21 L	Lipovljani	košuta	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 22 L	Lipovljani		Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca *Capillaria* sp.
J 23 L	Lipovljani		Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca *Fascioloides magna*
J 24 L	Lipovljani		Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 25 L	Lipovljani		Ličinke fam.*Protostrongylidae*, jajašca *Fascioloides magna*
J 26 L	Lipovljani	tele	Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa
J 27 L	Lipovljani	košuta	Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, pojedina jajašca strongilidnog tipa
J 28 L	Lipovljani	jelen, 3god	Pojedine ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca *Fascioloides magna*
J 29 L	Lipovljani	130kg, Ž, 4-5god	Ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 30 L	Lipovljani	M, 150kg, 4-5god	Jajašca *Fascioloides magna*, ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa
J 31 L	Lipovljani	Ž, 3-4god, 100kg	Negativan
J 32 L	Lipovljani	3-5god, Ž, 100kg	ličinke fam. *Protostrongylidae*
J 33 L	Lipovljani	Ž, 120kg, 5-8god	Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa, 1 jajašce *Fascioloides magna*
J 34 L	Lipovljani	M, 200kg, 8god	Oociste
J 35 L	Lipovljani	Ž, 2-3god, 100kg	Ličinke fam. *Protostrongylidae*, jajašca strongilidnog tipa
J 36 L	Lipovljani		Ličinke fam. *Protostrongylidae*

Tablica 5. Rezultati parazitološke pretrage jetara jelena običnoga iz Lipovljana.

INTERNA OZNAKA	NALAZ PARAZITOLOŠKE PRETRAGE JETARA							POSEBNE NAPOMENE
	Nezrela cista	**Zrela cista**	**Mladi metilj**	**Zreli metilj**	**Migracija**	**Cista u raspadu**	**Metilj u raspadu**	
J 9 L	6	48	5	95	3	1	1	
J 10 L	1	25	2	50	4	1	0	
J 11 L	3	54	4	108	3	1	0	
J 12 L	0	3	5	6	5	0	0	
J 13 L	0	14	3	28	4	0	0	
J 14 L	1	11	8	20	8	1	0	
J 15 L	0	0	2	0	2	0	0	
J 16 L	0	58	2	116	3	2	0	
J 17 L	1	1	3	2	2	2	0	Puno ožiljkastog tkiva
J 18 L	0	3	1	6	1	5	0	Puno ožiljkastog tkiva i propalih cista
J 19 L	1	15	2	30	3	2	0	
J 20 L	48	26	88	41	15	15	13	
J 21 L	48	77	93	158	4	1	1	
J 22 L	4	6	8	11	3	24	16	Perihepatitis
J 23 L	5	38	10	76	1	0	0	Prominira hematin (točkice), perihepatitis
J 24 L	0	1	1	2	0	10	2	
J 25 L	2	7	3	10	0	35	33	Vilozni perihepatitis, na presjeku hemosiderin
J 26 L	3	1	7	1	1	19	0	Prominira hematin (točkice), perihepatitis
J 27 L	0	20	0	56	0	13	0	
J 28 L	0	104	0	178	0	2	0	
J 29 L	3	8	10	11	8	19	6	
J 30 L	2	17	4	39	2	4	4	
J 31 L	6	14	14	30	5	2	3	
J 32 L	0	0	0	0	0	2	1	Izliječena
J 33 L	2	0	7	0	1	28	18	
J 34 L	1	12	5	22	3	15	8	
J 35 L	0	0	2	0	2	4	0	
J 36 L	2	5	11	10	5	4	0	

Tablica 6. Rezultati parazitološke pretrage jetara jelena običnoga iz Radinja (Brodsko-posavska županija).

INTERNA OZNAKA	NALAZ PARAZITOLOŠKE PRETRAGE JETARA							POSEBNE NAPOMENE
	Nezrela cista	**Zrela cista**	**Mladi metilj**	**Zreli metilj**	**Migracija**	**Cista u raspadu**	**Metilj u raspadu**	
J 1 B	1	0	2	0	1	10	0	Fe-porfirin
J 2 B	0	10	0	20	0	0	0	
J 3 B	0	0	0	0	0	0	0	Propucana jetra
J 4 B	0	13	2	25	2	1	0	Fe-porfirin
J 5 B	0	0	0	0	0	0	0	Propucana jetra
J 6 B	0	0	0	0	0	0	0	
J 7 B	1	5	2	10	1	0	0	Fe-porfirin
J 8 B	0	7	0	14	0	2	0	
J 9 B	0	0	0	0	0	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis, izliječen
J 10 B	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis, izliječen
J 11 B	0	1	1	2	2	3	0	Fe-porfirin, ožiljno tkivo
J 12 B	0	0	1	0	1	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 13 B	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis, izliječen
J 14 B	0	8	0	18	0	4	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 15 B	0	8	3	15	3	1	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 16 B	0	0	0	0	0	0	0	
J 17 B	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin
J 18 B	0	0	0	0	0	0	0	Propucana jetra
J 19 B	0	0	0	0	0	0	0	
J 20 B	6	19	6	34	6	10	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 21 B	3	4	10	8	5	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 22 B	3	5	2	10	3	1	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 23 B	9	16	21	32	5	2	0	Fe porfirin, perihepatitis
J 24 B	4	38	4	81	0	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 25 B	1	40	5	84	2	6	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 26 B	6	45	9	90	6	5	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 27 B	2	25	9	51	7	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis

J 28 B	12	16	33	32	5	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 42 B	0	0	0	0	0	30	17	Fe-porfirin, perihepatitis
J 43 B	13	19	30	61	19	0	0	Perihepatitis
J 44 B	2	65	4	143	1	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis

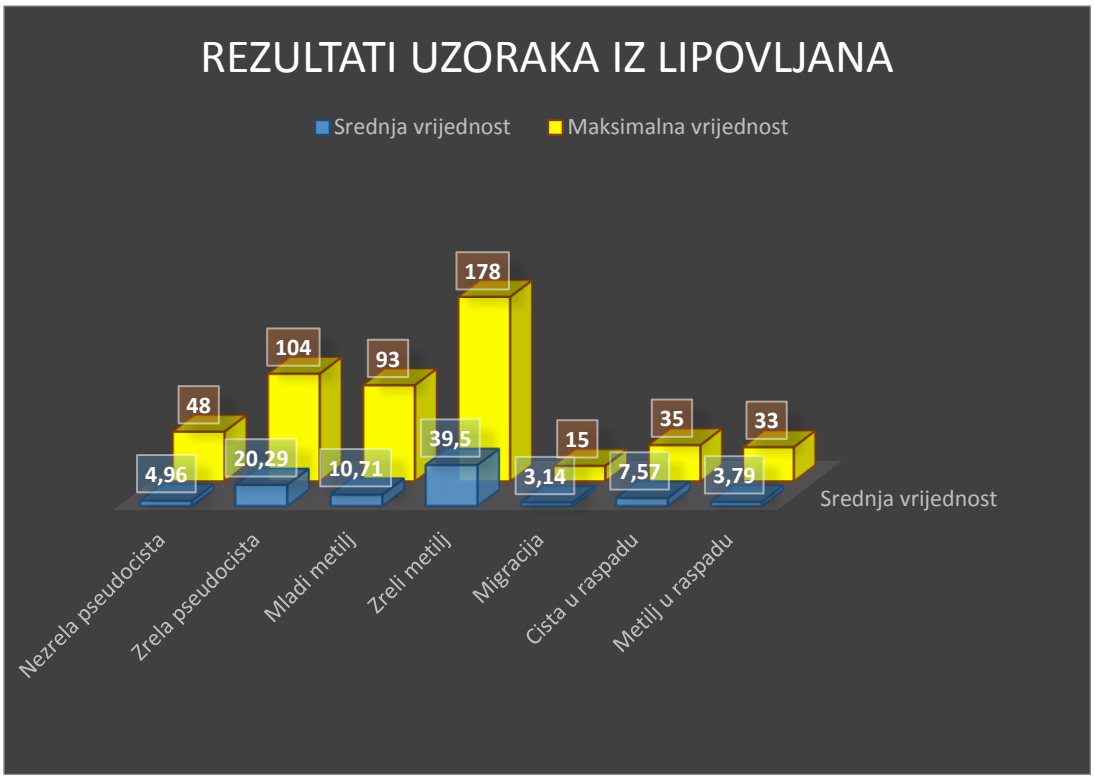
Tablica 7. Rezultati parazitološke pretrage jetara jelena običnoga iz Vukovarsko-srijemske županije (Vrbanja (J 1 V - J 8 V); Spačva (J 1 S - J 11 S)).

INTERNA OZNAKA	NALAZ PARAZITOLOŠKE PRETRAGE JETARA							POSEBNE NAPOMENE
	Nezrela cista	**Zrela cista**	**Mladi metilj**	**Zreli metilj**	**Migracija**	**Cista u raspadu**	**Metilj u raspadu**	
J 1 V	1	0	2	0	1	0	0	Fe-porfirin
J 2 V	0	0	0	0	0	0	0	
J 3 V	0	2	2	4	1	7	2	Fe-porfirin
J 4 V	0	4	4	8	4	0	0	Fe-porfirin, *Cysticercus Tenuicollis*
J 5 V	0	0	1	0	1	0	0	
J 6 V	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin
J 7 V	1	5	5	11	5	0	0	Fe-porfirin
J 8 V	0	1	1	2	2	0	0	Fe-porfirin
J 1 S	2	0	6	0	2	0	0	
J 2 S	2	1	8	4	2	2	3	Perihepatitis, Fe-porfirin
J 3 S	0	6	3	13	0	2	4	Perihepatitis, Fe-porfirin
J 4 S	1	0	1	0	1	0	0	
J 5 S	0	0	0	0	0	0	0	
J 6 S	0	0	1	0	1	5	10	Perihepatitis, Fe-porfirin
J 7 S	0	0	2	0	2	0	0	Fe-porfirin
J 8 S	0	0	4	2	1	puno	puno	Fe-porfirin
J 9 S	0	1	1	2	1	2	0	Fe-porfirin, fokalna nekroza
J 10 S	0	0	3	0	2	0	0	Fe-porfirin
J 11 S	0	3	3	9	1	0	0	Fe-porfirin

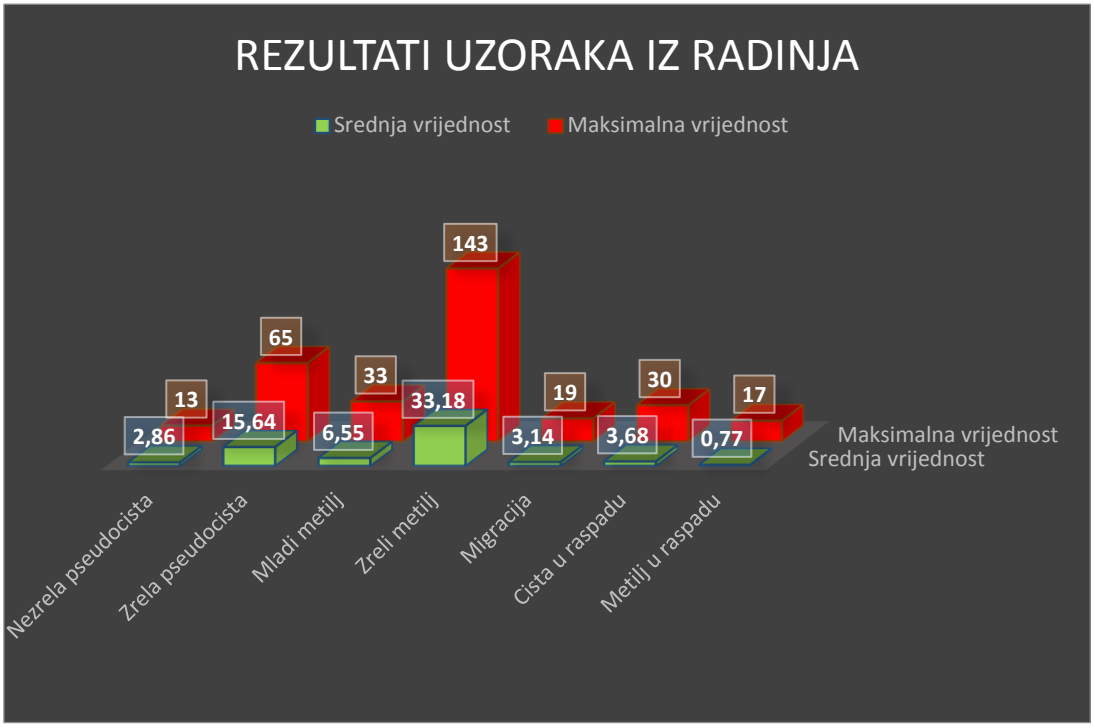
Tablica 8. Rezultati parazitološke pretrage jetara jelena običnoga iz Tikveša (Osječko-baranjska županija).

INTERNA OZNAKA	NALAZ PARAZITOLOŠKE PRETRAGE JETARA							POSEBNE NAPOMENE
	Nezrela cista	**Zrela cista**	**Mladi metilj**	**Zreli metilj**	**Migracija**	**Cista u raspadu**	**Metilj u raspadu**	
J 29 B	5	13	11	26	2	3	0	Fe porfirin, perihepatitis
J 30 B	0	0	1	0	2	0	0	Perihepatitis, Fe-porfirin
J 31 B	0	0	0	0	0	0	0	Perihepatitis, Fe-porfirin, izliječen
J 32 B	1	3	3	6	2	1	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 33 B	0	1	0	2	2	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 34 B	11	29	17	59	3	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 35 B	2	16	6	32	2	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 36 B	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin, perihepatitis
J 37 B	0	0	0	0	0	0	0	Fe-porfirin, izliječen
J 38 B	0	0	0	0	1	1	0	Fe porfirin
J 39 B	0	0	0	0	0	2	0	Fe-porfirin, perihepatitis, izliječen
J 40 B	0	0	0	0	0	0	0	
J 41 B	0	8	0	16	1	1	0	Fe-porfirin, perihepatitis

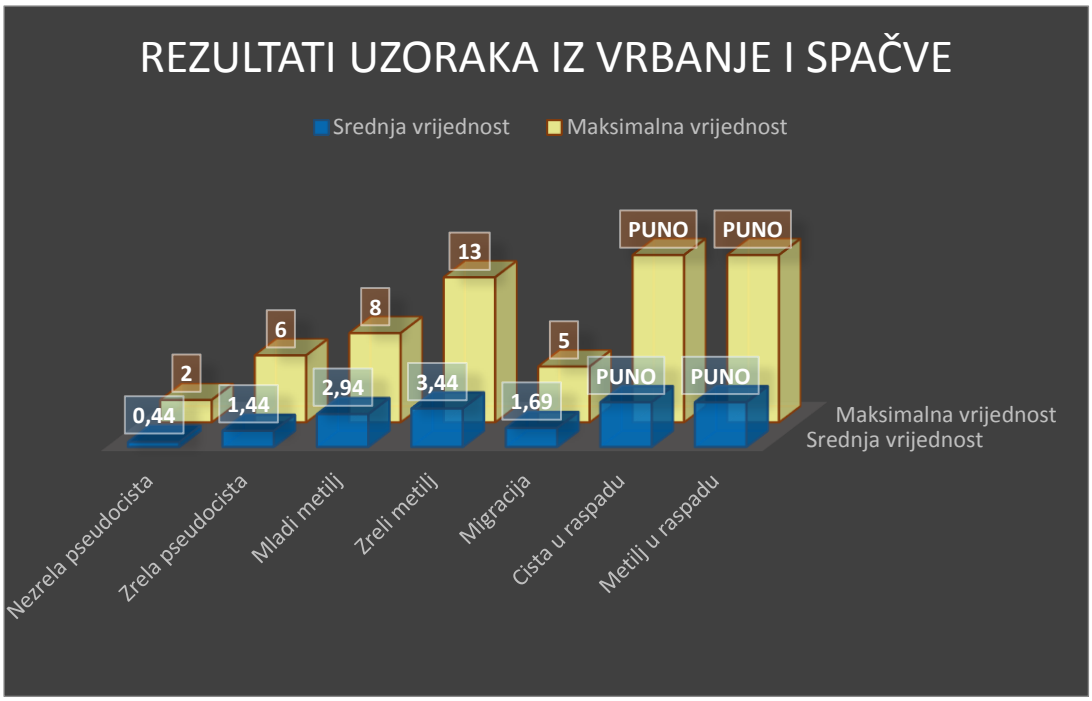
Prevalencija pozitivnih grla u ovom istraživanju je slijedeća: Lipovljani (P=100%), Radinje (P=70,97%), Vrbanja (P=75%), Spačva (P=90,9%), Tikveš (P=69,23%). Ukupna prevalencija je 82,42%.



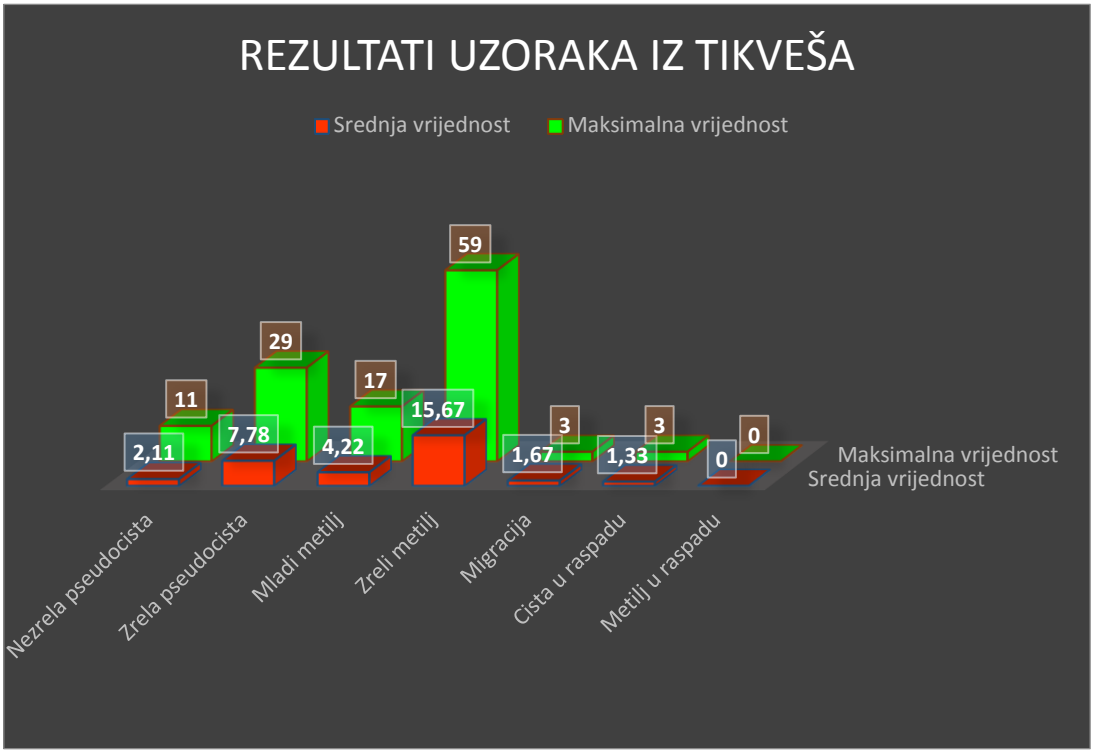
Grafikon 1. Nalaz pojedinih stadija metilja ili pseudocista u jetrima jelena iz Lipovljana (maksimalna i srednja vrijednost nalaza).



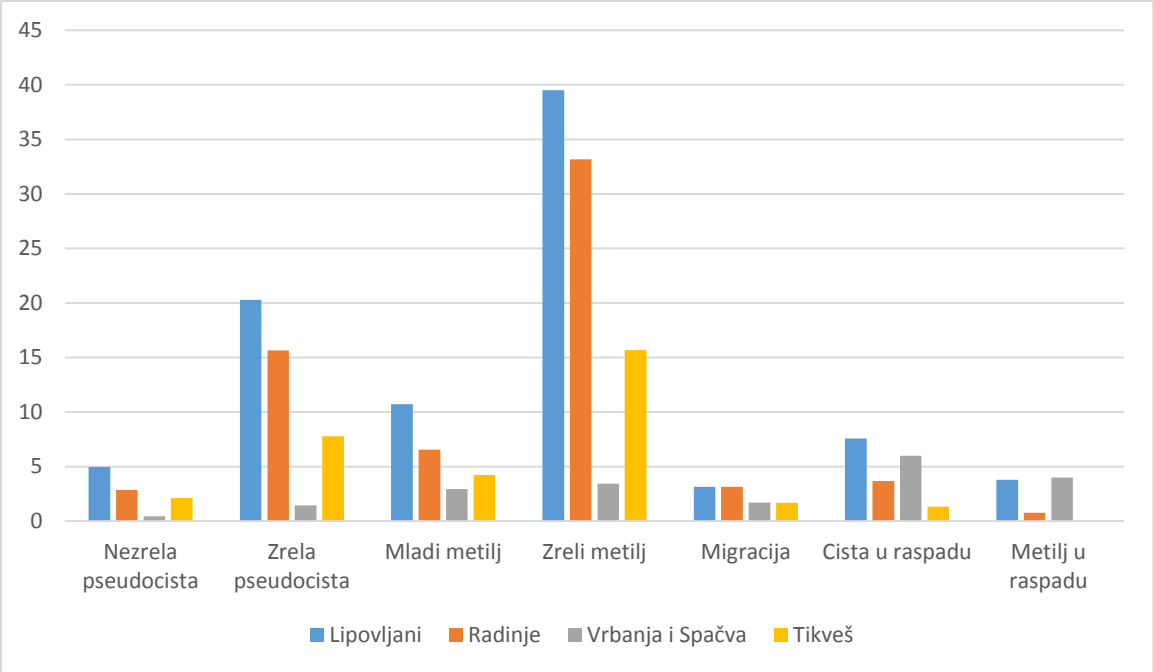
Grafikon 2. Nalaz pojedinih stadija metilja ili pseudocista u jetrima jelena iz Radinja (maksimalna i srednja vrijednost nalaza).



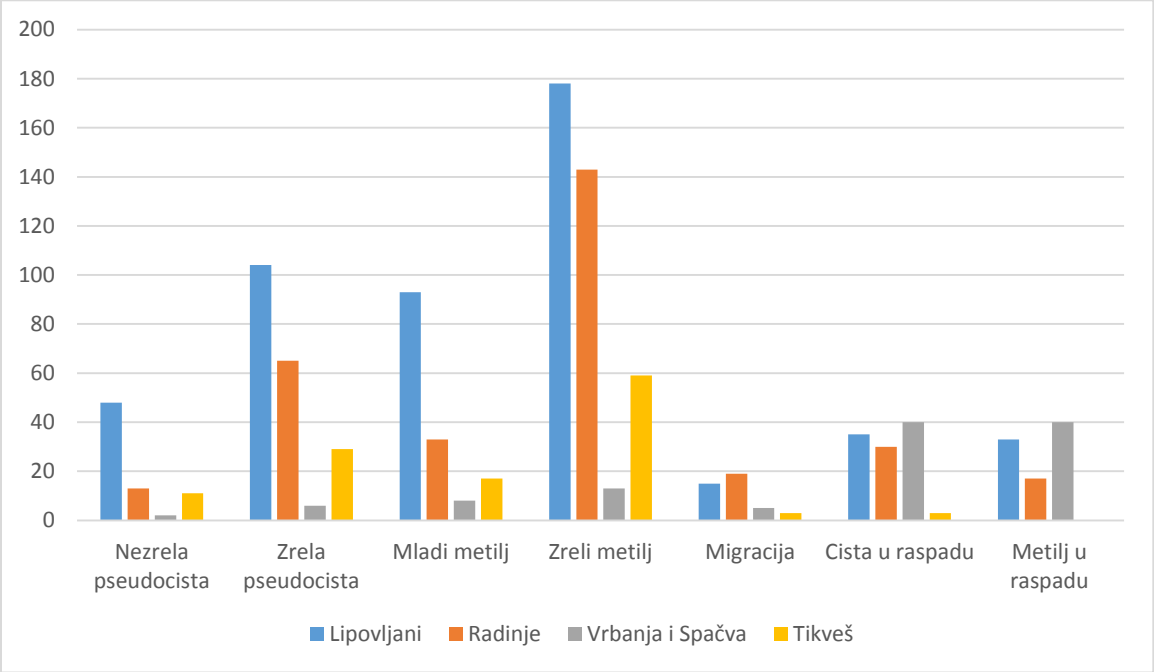
Grafikon 3. Nalaz pojedinih stadija metilja ili pseudocista u jetrima jelena iz Spačvanskog bazena (maksimalna i srednja vrijednost nalaza).



Grafikon 4. Nalaz pojedinih stadija metilja ili pseudocista u jetrima jelena iz Tikveša (maksimalna i srednja vrijednost nalaza).

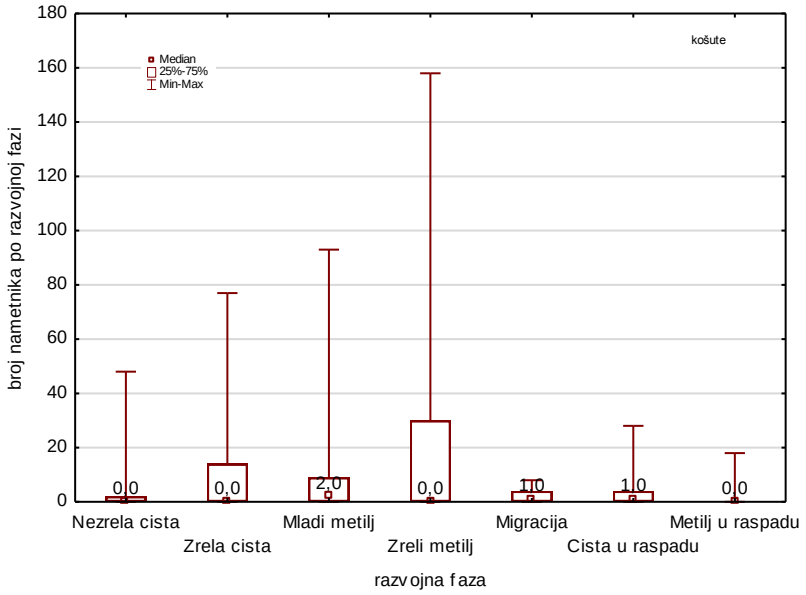


Grafikon 5. Poredbeni prikaz srednjih vrijednosti rezultata prema lokacijama uzorkovanja.

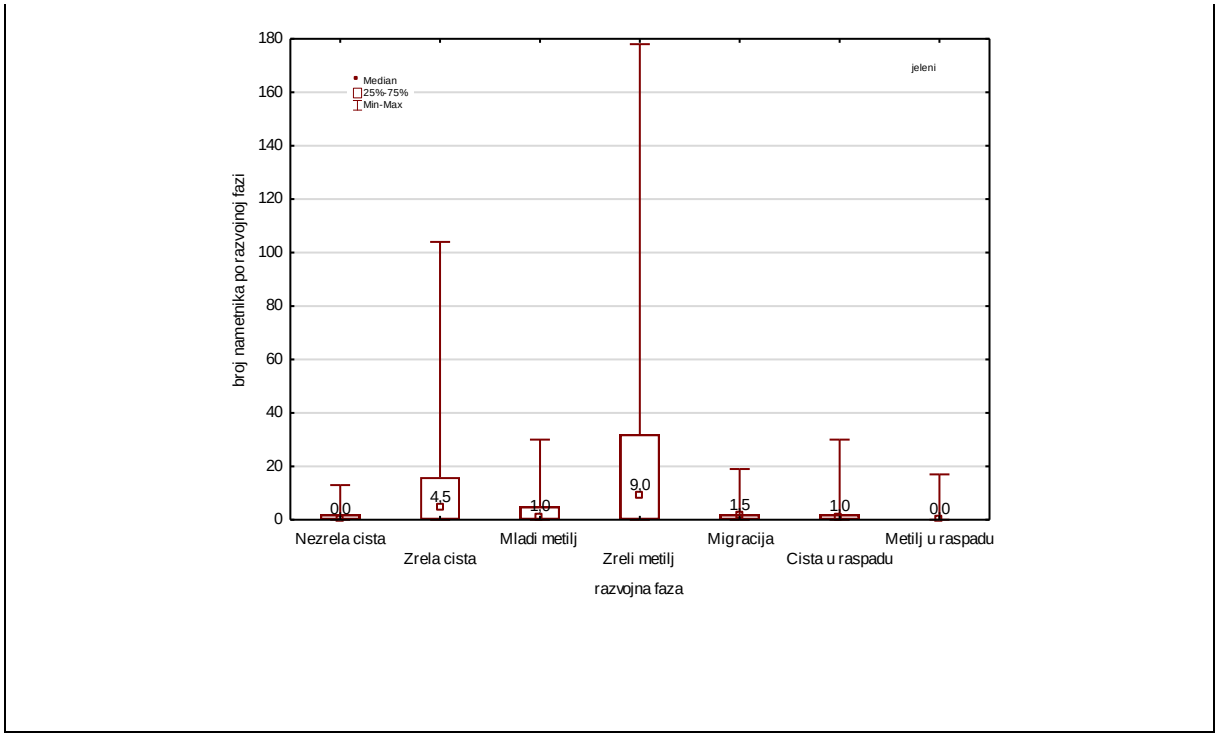


Grafikon 6. Poredbeni prikaz maksimalnih vrijednosti rezultata prema lokacijama uzorkovanja.

Očekivano, na području Gorskog kotara niti jedan prikupljeni uzorak nije bio invadiran velikim američkim metiljem, dok je na području Posavine i Baranje 75 od 91 prikupljenog uzorka bio pozitivan na invaziju metiljem (82.42 %). Fisher-ov egzaktni test je pokazao kako nema razlike u frekvenciji invadiranosti prema spolu (košuta i jelena) (p=0,0625), ali i da učestalost invadiranih i neinvadiranih grla nije međusobno identična ($\chi 2$=6,72; p<0,01 i McNemar $\chi 2$=15,57, p<0,0001).



Grafikon 7. Broj metilja po grlu i razvojnoj fazi pronađeni u jetrima košuta



Grafikon 8. Broj metilja po grlu i razvojnoj fazi pronađeni u jetrima jelena

T-test je pokazao kako nema razlike u broju metilja prema pojedinoj razvojnoj fazi (Tablica 9). Stoga su za ispitivanje razlika u broju metilja po grlu između razvojnih faza metilja podaci objedinjeni za oba spola i za ona grla kod kojih nije određen spol.

Tablica 9. Rezultati t-testa za ispitivanje razlike u broju metilja prema pojedinoj razvojnoj fazi između košuta i jelena

RAZVOJNA FAZA	BROJ METILJA		*t*-vrijednosti	*p*
	KOŠUTE	JELENI		
Nezrela cista	3,857143	1,852941	1,032826	0,306375
Zrela cista	10,71429	13,00000	-0,398040	0,692200
Mladi metilj	8,809524	3,911765	1,274675	0,207984
Spolno zreli metilj	22,23810	26,47059	-0,374649	0,709417
Migracija	2,095238	1,970588	0,142728	0,887046
Cista u raspadu	4,238095	2,764706	0,827756	0,411521
Metilj u raspadu	1,380952	0,852941	0,533000	0,596262

Tablica 10. Rezultati ispitivanja razlika u broju metilja između različitih razvojnih faza (različiti brojevi ukazuju na statistički znakovite razlike uz prag $p<0,05$)

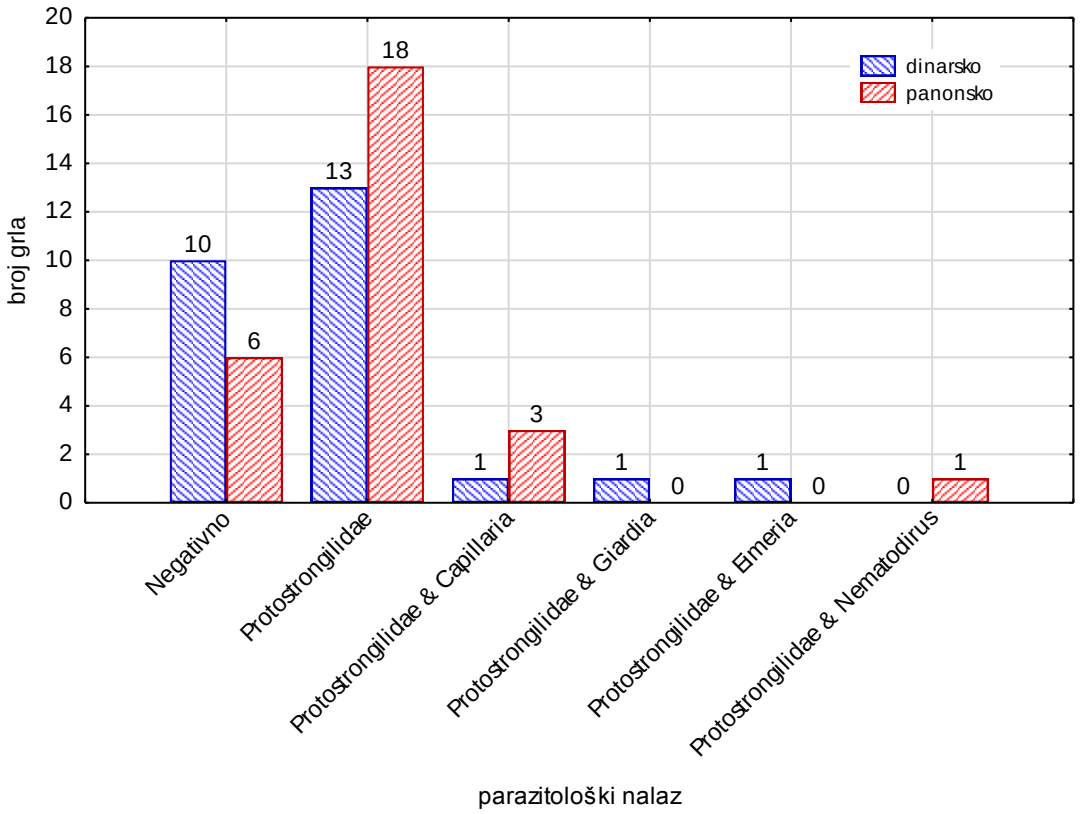
RAZVOJNA FAZA	BROJ METILJA	KOEFICIJENT VARIJABILNOSTI
Nezrela cista	2,5 [b]	293
Zrela cista	11,0 [b]	170
Mladi metilj	5,8 [b]	241
Spolno zreli metilj	22,3 [a]	166
Migracija	2,2 [b]	137
Cista u raspadu	5,7 [b]	378
Metilj u raspadu	3,8 [b]	569

Prema rezultatima Kruskal-Wallis testa broj metilja po grlu je statistički znakovito ([a]) najviši u fazi spolno zrelog metilja (22,3 metilja) u odnosu na ostale razvojne stadije ovog parazita, a između ostalih razvojnih faza nema razlike ([b]) u brojnosti. Razlog može biti i izrazito visoka varijabilnost u broju metilja po grlu (Tablica 10). Najmanju varijabilnost (CV=137) pokazuje broj metilja u stadiju migracije, a najveću, brojnost metilja u raspadanju (CV=569). Međutim, broj spolno zrelih metilja po grlu ima relativno malu varijabilnost (CV=166).

Tablica 11. Povezanost broja metilja u odnosu na različite razvojne faze (crveno obojeni brojevi ukazuju na statistički znakovite razlike uz prag $p<0,05$)

VARIJABLE	Zrela cista	Mladi metilj	Zreli metilj	Migracija	Cista u raspadu	Metilj u raspadu
Zrela cista	-	0,596095	0,994680	0,545788	0,321902	0,063766
Mladi metilj	0,596095	-	0,600997	0,804890	0,309209	0,268109
Zreli metilj	0,994680	0,600997	-	0,542048	0,327253	0,080634
Migracija	0,545788	0,804890	0,542048	-	0,153072	0,051602
Cista u raspadu	0,321902	0,309209	0,327253	0,153072	-	0,572949
Metilj u raspadu	0,063766	0,268109	0,080634	0,051602	0,572949	-

Većina razvojnih faza pokazuje međusobnu povezanost glede broja metilja, a ta je povezanost pozitivna. Izuzetak su faza metilja u raspadu koja ne pokazuje povezanost s razvojnim fazama zrele pseudociste, spolno zrelog metilja i metilja u migraciji te brojnost pseudocista u raspadanju i metilja u migraciji. Povezanost je najveća između broja zrelih pseudocista i broja spolno zrelog metilja (R_s=0,995), a nakon toga između broja mladih metilja i metilja u migraciji (R_s=0,805). Najmanju ovisnost pokazuje broj mladih metilja i metilja u raspadanju (R_s=0,268) (Tablica 11).



Grafikon 9. Broj ostalih parazita u jelenima s područja Lipovljana i Gorskog kotara

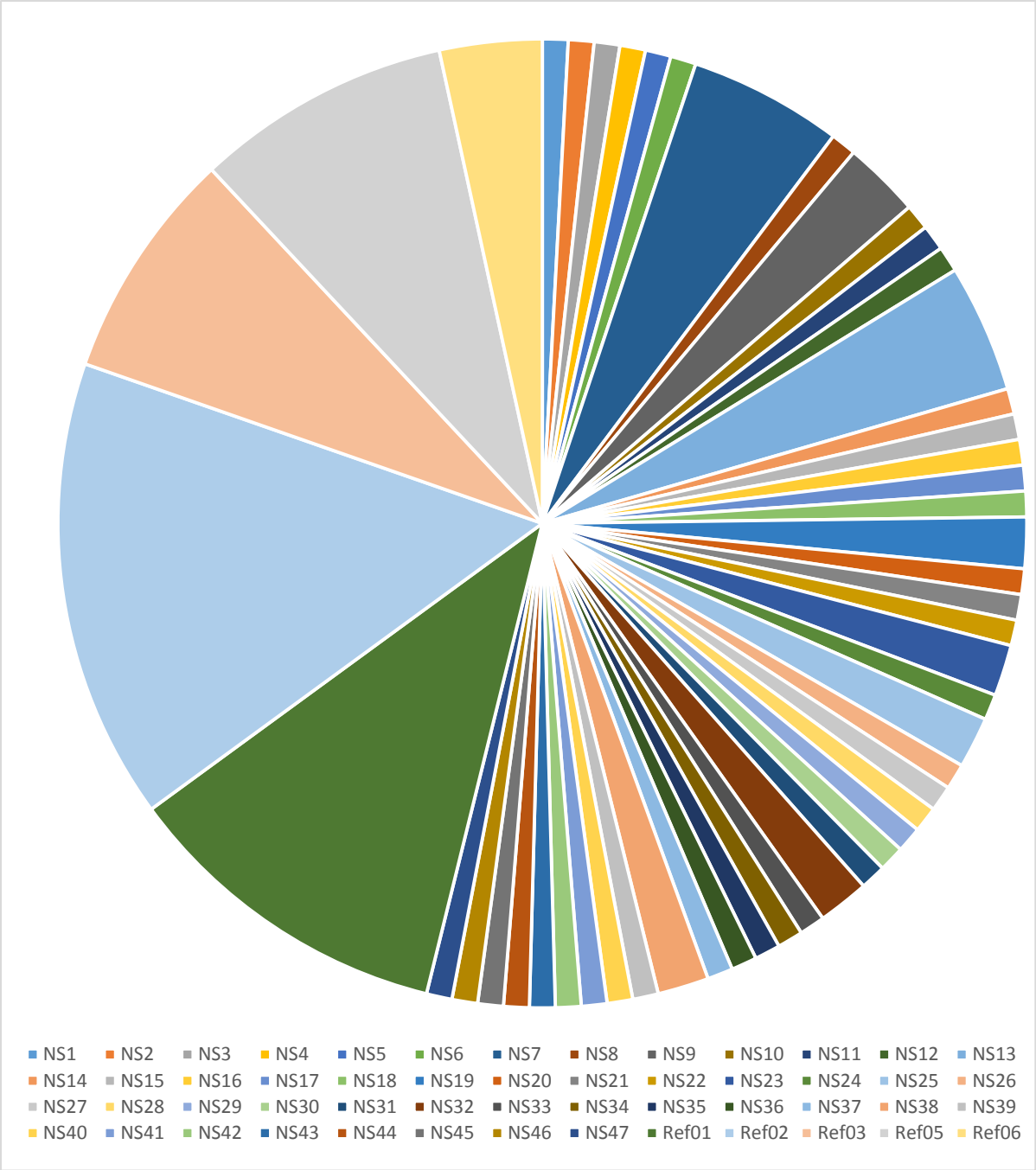
Invadiranost ostalim parazitima u fascioloidozne divljači varirala je od negativne pa do invadiranosti s jednim ili dva druga parazita. Budući da su na crijevne parazite bili pretraženi samo uzorci s područja Lipovljana i Gorskog kotara provedeno je testiranje između ova dva područja. Fisher-ov egzaktni test je pokazao kako nema razlike u frekvenciji invadiranosti jelenske divljači među lokalitetima (p=0,1420), ali i da je učestalost invadiranih i neinvadiranih grla međusobno identična ($\chi 2$=3,78; p=0,055 i McNemar $\chi 2$=3,68, p=0,052).

5.2. Genetička varijabilnost DRB lokusa s osvrtom na invadiranost metiljem *F. magna*

Analizirao sam egzon 2 DRB lokusa MHC klase II kod odabranih 48 jedinki jelena običnoga, od čega u dva uzorka nije uspjelo umnažanje. Uzorke sam odabrao prema lokalitetima, rezultatima pozitivnih, odnosno negativnih nalaza na fascioloidozu, te kvaliteti uzorka pročišćene DNA. Upotrebljenim početnicama umnožen je DNA slijed dugačak 249 pb. Dobiveni odsječak obuhvaća dio kodirajuće regije egzona 2, od 12-tog do 260-og nukleotidnog mjesta. U istraženom uzorku utvrđeno je ukupno 44 DRB alela. Popis pronađenih alela u uzorku i njihova zastupljenost prikazani su u Grafikonu 10, a prisutnost pojedinih alela po jedinkama prikazana je u Tablici 12. U tablici je vidljivo da jedinke imaju jedan do četiri alela, što ukazuje na postojanje dvaju DRB lokusa kod jelena. Nukleotidni sljedovi pronađenih alela prikazani su na Slici 14. Četiri alela otprije su poznata. To su aleli DRB_NS36, DRB_NS38, DRB_ref01 i DRB_ref02 čiji se sljedovi mogu naći u Genskoj banci pod pristupnim brojevima DQ225349, EU573266, EU573273 i EU573271. Ostali aleli pronađeni u ovom istraživanju, njih 40, su novi i do sad neutvrđeni kod jelena. Broj polimorfnih nukleotidnih mjesta među nukleotidnim sljedovima je 88. Pronađeni aleli translatiraju se u 43 jedinstvena aminokiselinska slijeda. Iste aminokiselinske produkte imaju aleli DRB_ref05 i DRB_NS47. Aminokiselinski sljedovi u koje se translatiraju DRB aleli prikazani su na Slici 15. Usporedbom aminokiselinskih nizova utvrđena su 43 promjenjiva aminokiselinska mjesta. Za alele utvrđene u ovom istraživanju, pomoću programa MEGA odredio sam evolucijsku udaljenost. Algoritam za računanje evolucijske udaljenosti odabran je na temelju najniže vrijednosti Bayesovog informacijskog kriterija. Za naše podatke odabran je T92+G (Tamura 3-parameter) model nukleotidne supstitucije. Uz odabrani model, korištena je Bootstrap metoda s 10000 ponavljanja. Srednja vrijednost evolucijskih udaljenosti među alelima iznosila je 0.15. Pokazatelji raznolikosti među pronađenim alelima prikazani su u Tablici 13.

Tablica 12. Prisutnost pojedinih alela po jedinkama.

Uzorak	Alel 1	Alel 2	Alel 3	Alel 4
J10_L_CE_IonXpress_030	ref02	ref01		
J10_S_CE_IonXpress_027	ref05			
J11_L_CE_IonXpress_031	ref01	ref02		
J11_S_CE_IonXpress_028	NS25	ref02	ref01	
J12_L_CE_IonXpress_032	ref06	NS41	ref06	
J13_L_CE_IonXpress_033	NS19	NS20		
J14_L_CE_IonXpress_034	ref03	NS2	NS3	ref01
J15_L_CE_IonXpress_035	ref06			
J16_L_CE_IonXpress_036	NS4			
J17_L_CE_IonXpress_037	ref02	ref03	NS17	NS18
J18_L_CE_IonXpress_038	ref02			
J19_L_CE_IonXpress_039	ref05			
J1_S_CE_IonXpress_018	ref06			
J20_L_CE_IonXpress_040	ref01	ref02	NS26	
J21_L_CE_IonXpress_041	ref02	ref01	NS34	NS35
J23_L_CE_IonXpress_043	ref02	ref01	NS44	
J25_L_CE_IonXpress_045	ref02	ref01	ref05	NS9
J27_L_CE_IonXpress_046	ref02	ref01		
J28_L_CE_IonXpress_015	NS38	NS39	NS40	NS7
J29_B_CE_IonXpress_005	ref05			
J2_S_CE_IonXpress_019	ref02	ref01		
J30_B_CE_IonXpress_006	ref02	NS16		
J31_B_CE_IonXpress_007	ref03			
J32_B_CE_IonXpress_008	ref02	ref01	ref05	NS9
J33_B_CE_IonXpress_009	ref05	ref03	NS14	NS15
J34_B_CE_IonXpress_010	ref03	NS45	NS46	
J35_B_CE_IonXpress_011	NS32	NS36		NS32
J36_B_CE_IonXpress_012	NS10	NS11	NS7	NS12
J37_B_CE_IonXpress_013	ref03			
J38_B_CE_IonXpress_014	ref03	NS21	ref03	
J3_S_CE_IonXpress_020	ref01	ref02	ref05	NS9
J40_B_CE_IonXpress_016	ref05	ref06		
J41_B_CE_IonXpress_017	ref03			
J4_GK_CE_IonXpress_051	NS30	NS23	NS7	NS31
J4_S_CE_IonXpress_021	ref05	ref06		
J5_GK_CE_IonXpress_052	ref02			
J5_S_CE_IonXpress_022	NS7			
J6_GK_CE_IonXpress_001	ref02	NS23	NS24	
J6_S_CE_IonXpress_023	NS38	NS7	NS43	
J7_GK_CE_IonXpress_002	ref02			
J7_S_CE_IonXpress_024	NS7	ref03	NS8	
J8_GK_CE_IonXpress_003	ref05	NS42		
J8_S_CE_IonXpress_025	ref06	NS19	ref06	
J9_GK_CE_IonXpress_004	NS27			
J9_L_CE_IonXpress_029	NS47	ref03		
J9_S_CE_IonXpress_026	ref02	ref01	NS32	NS33

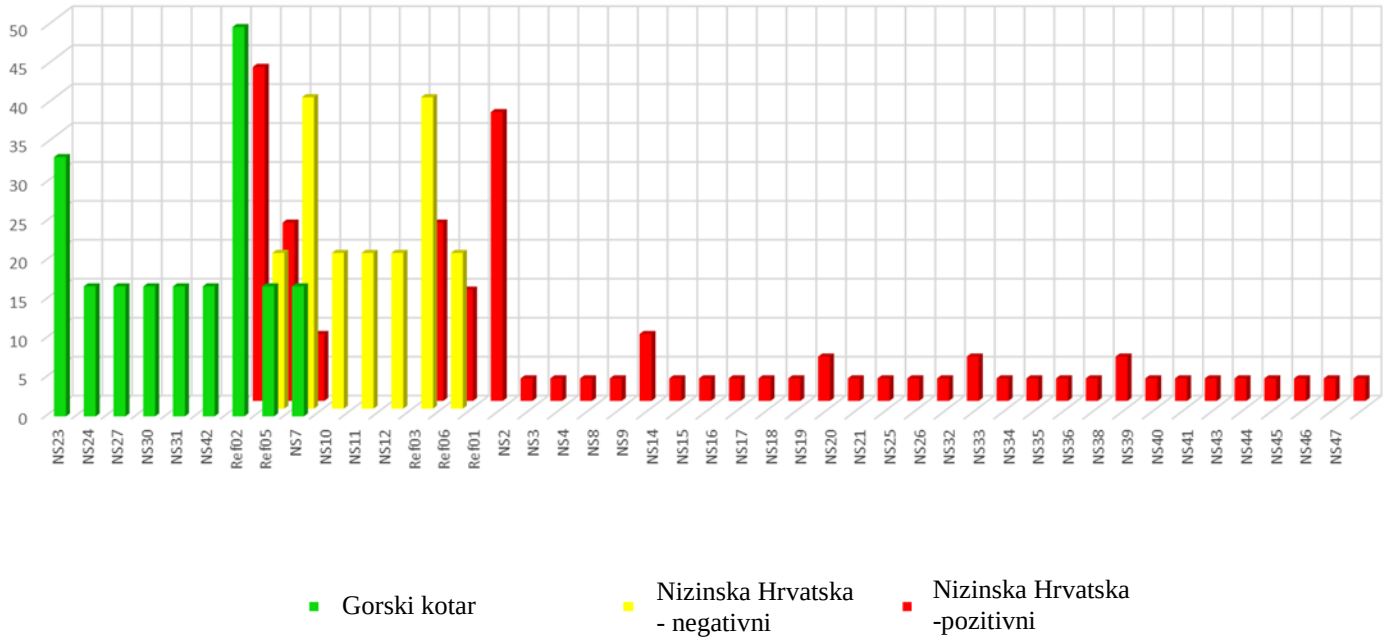


Grafikon 10. Popis pronađenih alela u uzorku i njihova zastupljenost

Tablica 13. Pokazatelji raznolikosti DRB alela pronađenih u istraženom uzorku jelena.

Lokus	Broj utvrđenih alela	Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Model nukleotidne supstitucije	Nukleotidna evolucijska udaljenost	Broj jedinstvenih aminokiselinskih sljedova	Broj varijabilnih aminokiselinskih mjesta
DRB	44	88	T92+G	0.15	43	43

T92 – Tamura 3 parametar model nukleotidne supstitucije, G – parametar gama distribucije



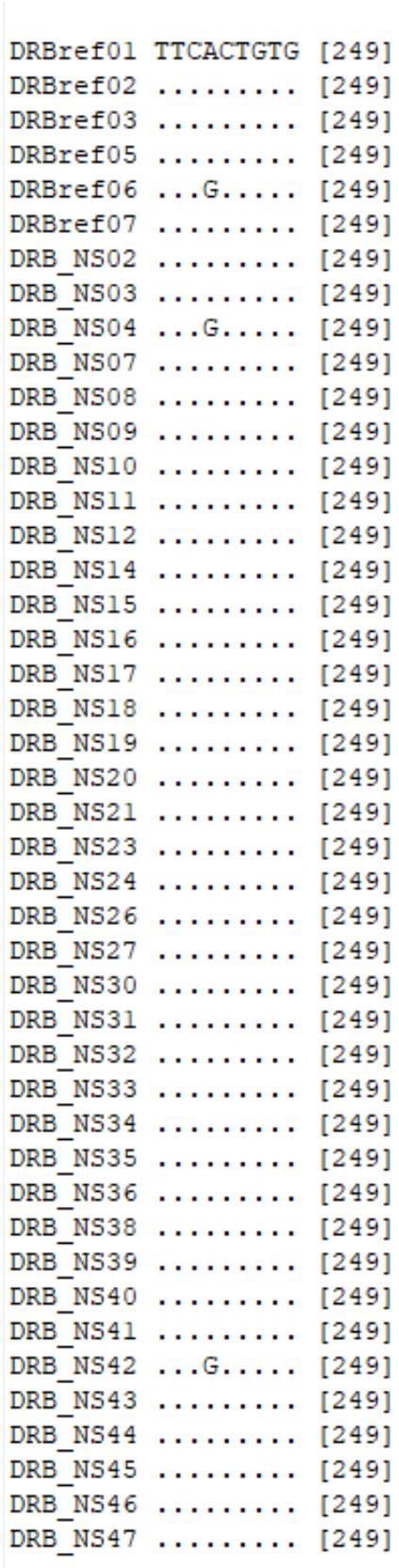
Grafikon 11. Frekvencija pojedinih alela na području Gorskoga kotara (zelena boja) i nizinskoga dijela Hrvatske (negative jedinke – žuta boja; pozitivne jedinke – crvena boja).

```
DRBref01 GAGCATCTTAAGGCCGAGTGTCATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGATGCAGTTCCTGGCG [ 60]
DRBref02 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRBref03 ...T...A....AG.............C..........C.....G..GG..A.....A. [ 60]
DRBref05 CT.T..GC....AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRBref06 CT.T..AC..C.AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRBref07 .......A....TG.............C................G...........CA. [ 60]
DRB_NS02 CT....A..........A..........C..........C.....G..GG..A.....A. [ 60]
DRB_NS03 ...T...A....AG.............C..........C.....G..GG........A. [ 60]
DRB_NS04 CT.T..AC..C.AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS07 CT.T..AC..C..G.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS08 CT.T..AC..C.AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS09 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS10 ...T..GC....AG.............C..........C.....G..GG..A.....AC [ 60]
DRB_NS11 ...T..TAC...AG.........................C.....G...G.......CAC [ 60]
DRB_NS12 ...T..AC....AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS14 CT.T..GC....AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS15 ...T...A....AG.............C..........C.....G..GG..A.....A. [ 60]
DRB_NS16 ..................................................................... [ 60]
DRB_NS17 ..................................................................... [ 60]
DRB_NS18 ...T...A....AG.............C..........C.....G..GG..A.....A. [ 60]
DRB_NS19 ...T...A....AG.........................C......G...G........AC [ 60]
DRB_NS20 ...T..GC....AG.............C..........C.....G............CA. [ 60]
DRB_NS21 CT.T..AC..C..G.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS23 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS24 ............AG.........................C..................... [ 60]
DRB_NS26 ...T..GC....AG.............C..........C.....G.............. [ 60]
DRB_NS27 ...T..TAC...AG......C.........................G...G.......CAC [ 60]
DRB_NS30 ..................................................................... [ 60]
DRB_NS31 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS32 .....G.......G.............C..........C.....G...G.C.....CA. [ 60]
DRB_NS33 ...........................................C............C.....CA. [ 60]
DRB_NS34 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS35 ...T..GC....AG.............C..........C.....G.............. [ 60]
DRB_NS36 CT.T..AC..C.AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS38 ...T..GC....AG.............C..........C.....G..G...A.....AC [ 60]
DRB_NS39 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS40 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS41 ...T...A....AG.........................C......G...G........AC [ 60]
DRB_NS42 CT.T..AC..C.AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
DRB_NS43 ...T..GC....AG.............C..........C.....G..G...A.....AC [ 60]
DRB_NS44 ...T..GC....AG.............C..........C.....G...G........AC [ 60]
DRB_NS45 ..................................................................... [ 60]
DRB_NS46 ...T...A....AG.............C..........C.....G..GG..A.....A. [ 60]
DRB_NS47 CT.T..GC....AG.............C..........C.....G..GG........AC [ 60]
```

```
DRBref01 AGATACTTCTATAACGGAGAAGAGTACGCGCGCTTCGACAGCGACGTGGGCGAGTTCCGG [120]
DRBref02 ..............C.G..........T................TG............. [120]
DRBref03 ......A........C.G..........T................TG........A.... [120]
DRBref05 ........................T..T................TG........A.... [120]
DRBref06 ............................T................TG........A.... [120]
DRBref07 ......A........C.G..........T................TG........A.... [120]
DRB_NS02 ...C..A..................T.CT.........................A.... [120]
DRB_NS03 ..............C.G..........T................TG............. [120]
DRB_NS04 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS07 ............................T................TG........AT... [120]
DRB_NS08 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS09 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS10 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS11 ....G...T.C...T.........AC..T.........................A.... [120]
DRB_NS12 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS14 ........................T..T................TG........A.... [120]
DRB_NS15 ......A....................T................TG........A.... [120]
DRB_NS16 ..................................................... [120]
DRB_NS17 .....................................................A.... [120]
DRB_NS18 ......A........C.G..........T................TG........A.... [120]
DRB_NS19 .........C....T..........T..T.......A........TG........A.... [120]
DRB_NS20 ......A........C.G..........................TG............. [120]
DRB_NS21 ......A....................T................TG........A.... [120]
DRB_NS23 ..............C.G..........T................TG............. [120]
DRB_NS24 ..................................................... [120]
DRB_NS26 ..............C.G..........................TG............. [120]
DRB_NS27 ........T.C...T.........AC..T.............................. [120]
DRB_NS30 ..................................................... [120]
DRB_NS31 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS32 ......A........C.G................A..........TG............. [120]
DRB_NS33 ......A.....................................TG............. [120]
DRB_NS34 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS35 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS36 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS38 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS39 ..............C.G..........T................TG............. [120]
DRB_NS40 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS41 ..............T............T................TG........A.... [120]
DRB_NS42 ............................T................TG........A.... [120]
DRB_NS43 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS44 ............................T................TG............. [120]
DRB_NS45 ..................................................... [120]
DRB_NS46 ......A........C.G..........T................TG........A.... [120]
DRB_NS47 ........................T..T................TG........A.... [120]
```

```
                                                
```

```
DRBref01 GAGCAGCACCGGGCAGAGGTGGACAGGTACTGCAGACACAACTACGGGGTCGGTGAGAGT [240]
DRBref02 ......A.G.....C.........C.GTG.....................TAT....... [240]
DRBref03 ....G.A.G.....CA.T.......C.........T.............TAT....... [240]
DRBref05 ......ACG.....C.........C.....................C.G..T....... [240]
DRBref06 ......ACG.....C.....................................TCT...C... [240]
DRBref07 ......A.G.....C.C.....................................T....... [240]
DRB_NS02 ...G..AGG.....C.C....A...C.........T..................... [240]
DRB_NS03 ......A.G..............C.....................TAT....... [240]
DRB_NS04 ......ACG.....C.....................................TAT....... [240]
DRB_NS07 ......AGG.....C.........C..................................... [240]
DRB_NS08 ......AGG.....C.........C..................................... [240]
DRB_NS09 ......A.G.....C.........C.....................TAT....... [240]
DRB_NS10 ....G.A.G.....CA.T.......C.....................TT....... [240]
DRB_NS11 ......AGG.....C.C.......C..................................... [240]
DRB_NS12 ......AGG.....CA........C..................................... [240]
DRB_NS14 ......ACG.....C.........C.....................C.G..T....... [240]
DRB_NS15 ....G.A.G.....CA.T.......C.........T.............TAT....... [240]
DRB_NS16 .........G..................................................... [240]
DRB_NS17 ...G..AGG............A...C..................................... [240]
DRB_NS18 ......A.G.....CA........C.........T.............TAT....... [240]
DRB_NS19 ......AGG.....C.........C.GTG.....................T....... [240]
DRB_NS20 ....G.GCG.....C.........C.GTG.....................TTT....... [240]
DRB_NS21 ......AGG.....C.C....A...C..................................... [240]
DRB_NS23 ......A.G.....C.C.......C.GTG.....................TAT....... [240]
DRB_NS24 ......c..G..............C.....................TAT....... [240]
DRB_NS26 ......A.G.....C.........C.GTG.....................TAT....... [240]
DRB_NS27 ...G.CG.A.....C.CA.......C..T................C.............. [240]
DRB_NS30 .........G..............C..................................... [240]
DRB_NS31 ......A.G.....C.........C..................................... [240]
DRB_NS32 ...G..TTG.....C.C.......C..................................... [240]
DRB_NS33 ...G..TTG..............C..................................... [240]
DRB_NS34 ......A.G.....C.....................................TAT....... [240]
DRB_NS35 ........G.....C.....................................TAT....... [240]
DRB_NS36 ......ACG.....C.....................................TAT....... [240]
DRB_NS38 ......A.G.....C.........C.GTG.....................TTT....... [240]
DRB_NS39 ......A.G.....C.........C.GTG.....................TAT.....TG [240]
DRB_NS40 ......A.G.....C.........C.GTG.....................TTT....... [240]
DRB_NS41 ......A.G.....C.........C.....................TAT....... [240]
DRB_NS42 ......ACG.....C.....................................TCT...C... [240]
DRB_NS43 ......A.G.....C.........C.GT.....................TTT....... [240]
DRB_NS44 ......A.G.....C.....................................TAT....... [240]
DRB_NS45 ...G..AGG..............C..................................... [240]
DRB_NS46 ......A.G.....C.........C.........T.............TAT....... [240]
DRB_NS47 ......ACG.....C.........C.....................G..T....... [240]
```



Slika 14. Nukleotidni sljedovi pojedinih alela DRB lokusa. Nukleotidi identični onima u prvoj liniji označeni su točkom.

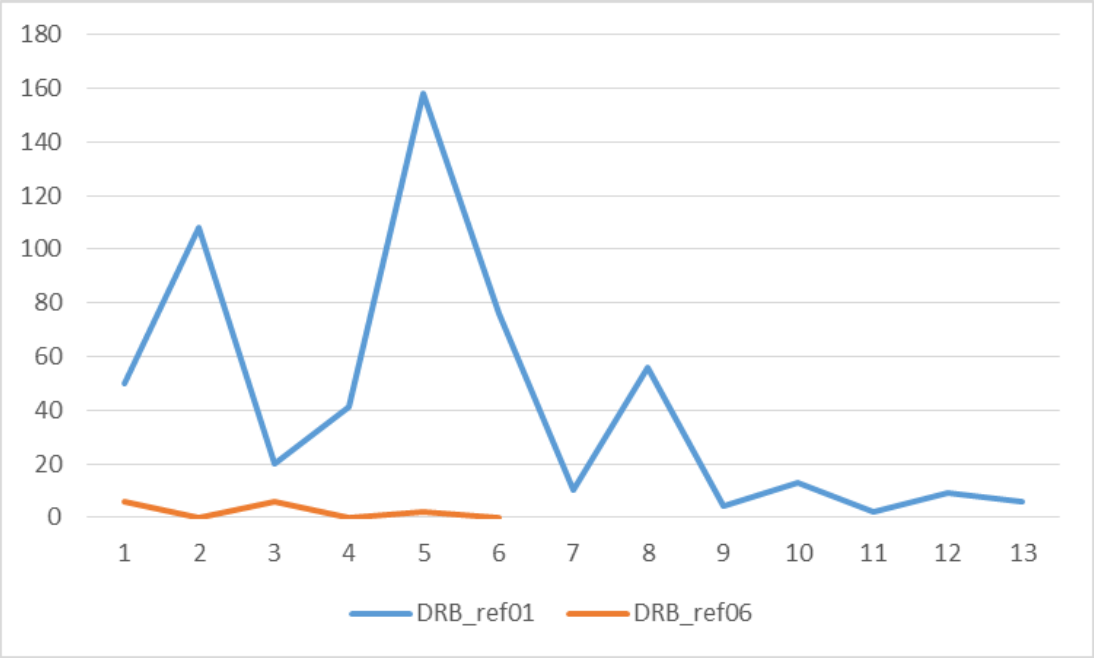
```
DRBref01 EHLKAECHFFNGTERMQFLARYFYNGEEYARFDSDVGEFRAVTELGRPDAKYWNSQKEIL [60]
DRBref02 .YA.S....S...Q.VR..D.....R...V.....W...........S........DFM [60]
DRBref03 .YH.S....S...Q.VGY.E..I..R...V.....W..Y.........S...M.....L. [60]
DRBref05 LYA.S....S...Q.VG..D.........FV.....W..Y.........V.E.L.....YM [60]
DRBref06 LYTTS....S...Q.VG..D.........V.....W..Y.........S.........YM [60]
DRBref07 ..H.C....S.....V...Q..I..R...V.....W..Y.........S...Y.....L. [60]
DRB_NS02 L.I......S...Q.VGY.E.HI.....FL........Y.........E..S......L. [60]
DRB_NS03 .YH.S....S...Q.VG..E.....R...V.....W.....................L. [60]
DRB_NS04 LYTTS....S...Q.VG..D.........V.....W..Y.........S.........YM [60]
DRB_NS07 LYTTG....S...Q.VG..D.........V.....W..Y...........EL......F. [60]
DRB_NS08 LYTTS....S...Q.VG..D.........V.....W..Y...........EL......F. [60]
DRB_NS09 .YA.S....S...Q.VR..D.........V.....W...........S........DFM [60]
DRB_NS10 .YA.S....S...Q.VGY.D.........V.....W..Y...........E.......L. [60]
DRB_NS11 .YY.S.........Q.VR..H.C.S....TV........Y...........EL......L. [60]
DRB_NS12 .YT.S....S...Q.VG..D.........V.....W..Y...........EL......L. [60]
DRB_NS14 LYA.S....S...Q.VG..D.........FV.....W..Y.........V...L.....YM [60]
DRB_NS15 .YH.S....S...Q.VGY.E..I......V.....W..Y.........S...M.....L. [60]
DRB_NS16 ..................................................... [60]
DRB_NS17 ....................................Y..................... [60]
DRB_NS18 .YH.S....S...Q.VGY.E..I..R...V.....W..Y.........S.........L. [60]
DRB_NS19 .YH.S..........VR..D...H....FV..N..W..Y...A.....A.EH........ [60]
DRB_NS20 .YA.S....S...Q.V...Q..I..R.........W..................... [60]
DRB_NS21 LYTTG....S...Q.VG..D..I......V.....W..Y...........EL......L. [60]
DRB_NS23 .YA.S....S...Q.VR..D.....R...V.....W...........S........DFM [60]
DRB_NS24 ....S.........Q.....................................M [60]
DRB_NS26 .YA.S....S...Q.V.........R.........W.....................M [60]
DRB_NS27 .YY.S..........VR..H...S....TV..................EL.....DT. [60]
DRB_NS30 ..................................................... [60]
DRB_NS31 .YA.S....S...Q.VR..D.........V.....W.....................DF. [60]
DRB_NS32 .Q..G....S...Q.VRL.Q..I..R.....Y...W.............E.......YM [60]
DRB_NS33 .............Q...L.Q..I............W.....................M [60]
DRB_NS34 .YA.S....S...Q.VR..D.........V.....W..Y.........S........DFM [60]
DRB_NS35 .YA.S....S...Q.V.............V.....W..................... [60]
DRB_NS36 LYTTS....S...Q.VG..D.........V.....W..Y.........S.........YM [60]
DRB_NS38 .YA.S....S...Q.VEY.D.........V.....W.....................DFM [60]
DRB_NS39 .YA.S....S...Q.VR..D.....R...V.....W...........S........DFM [60]
DRB_NS40 .YA.S....S...Q.VR..D.........V.....W...........S........DFM [60]
DRB_NS41 .YH.S..........VR..D.........V.....W..Y.........S..... [60]
DRB_NS42 LYTTS....S...Q.VG..D.........V.....W..Y.........V.E.L.....YM [60]
DRB_NS43 .YA.S....S...Q.VEY.D.........V.....W.....................DF. [60]
DRB_NS44 .YA.S....S...Q.VR..D.........V.....W...........S..........M [60]
DRB_NS45 ..................................................... [60]
DRB_NS46 .YH.S....S...Q.VGY.E..I..R...V.....W..Y...................L. [60]
DRB_NS47 LYA.S....S...Q.VG..D.........FV.....W..Y.........V.E.L.....YM [60]
```

```
DRBref01 EQHRAEVDRYCRHNYGVGESFTV [83]
DRBref02 ..K.....TV.......I..... [83]
DRBref03 .RK..N..T...Y....I..... [83]
DRBref05 ..T.....T.......GV..... [83]
DRBref06 ..T..............LD..A. [83]
DRBref07 ..K..A...........V..... [83]
DRB_NS02 .ER..A.NT...Y.......... [83]
DRB_NS03 ..K.....T........I..... [83]
DRB_NS04 ..T.............I...A. [83]
DRB_NS07 ..R.....T.............. [83]
DRB_NS08 ..R.....T.............. [83]
DRB_NS09 ..K.....T........I..... [83]
DRB_NS10 .RK..N..T........F..... [83]
DRB_NS11 ..R..A..T.............. [83]
DRB_NS12 ..R..K..T.............. [83]
DRB_NS14 ..T.....T.......GV..... [83]
DRB_NS15 .RK..N..T...Y....I..... [83]
DRB_NS16 ...G.................... [83]
DRB_NS17 .ER....NT.............. [83]
DRB_NS18 ..K..K..T...Y....I..... [83]
DRB_NS19 ..R.....TV.......V..... [83]
DRB_NS20 .RA.....TV.......F..... [83]
DRB_NS21 ..R..A.NT.............. [83]
DRB_NS23 ..K..A..TV.......I..... [83]
DRB_NS24 ...G....T........I..... [83]
DRB_NS26 ..K.....TV.......I..... [83]
DRB_NS27 .DE..A..TF.....R....... [83]
DRB_NS30 ...G....T.............. [83]
DRB_NS31 ..K.....T.............. [83]
DRB_NS32 .EL..A..T.............. [83]
DRB_NS33 .EL.....T.............. [83]
DRB_NS34 ..K.............I..... [83]
DRB_NS35 ..Q.............I..... [83]
DRB_NS36 ..T.............I..... [83]
DRB_NS38 ..K.....TV.......F..... [83]
DRB_NS39 ..K.....TV.......I.M... [83]
DRB_NS40 ..K.....TV.......F..... [83]
DRB_NS41 ..K.....T........I..... [83]
DRB_NS42 ..T..............LD..A. [83]
DRB_NS43 ..K.....TV.......F..... [83]
DRB_NS44 ..K.............I..... [83]
DRB_NS45 .ER.....T.............. [83]
DRB_NS46 ..K.....T...Y....I..... [83]
DRB_NS47 ..T.....T.......GV..... [83]
```

Slika 15. Aminokiselinski sljedovi pojedinih alela DRB lokusa. Aminokiseline identične onima u prvoj liniji označene su točkom.

Usporedbom prisutnosti alela DRB_ref02 i alela DRB_ref05 u nizinskoj i gorskoj populaciji nije utvrđena statistički znakovita razlika (DRB_ref05 - $\chi 2$ s Yatesovom korekcijom iznosi 0,0025, a p=0,96; DRB_ref02 - $\chi 2$ s Yatesovom korekcijom iznosi 0,0013, a p=0,97). S druge strane, usporedbom prisutnosti alela DRB_ref01 koji se javlja isključivo u nizinskom području dobivena je statistički značajna razlika između uzoraka s područja Lipovljana i Baranje ($\chi 2 = 4,928$, a p=0,026411). Alel DRB_ref02 se statistički znakovito više pojavljuje u jelena na području Lipovljana u odnosu na jelene na području Baranje ($\chi 2 = 3,931$, p=0,0473). S druge strane, alel DRB_ref03 se najčešće pojavljuje u jelena u Baranji, i to statistički znakovito u odnosu na jelene iz Lipovljana ($\chi 2 = 5,1481$, p = 0,023272) i Spačve ($\chi 2 = 4,5365$, p = 0,033).

S obzirom na činjenicu da su aleli DRB_ref01 i DRB_ref06 utvrđeni isključivo u nizinskoj populaciji jelena, provedena je usporedba navedenih alela s obzirom na invadiranost metiljem *F. magna* (Grafikon 12).



Grafikon 12. Broj spolno zrelih metilja u jelena s odgovarajućim DRB_ref01 ili DRB_ref06 alelom.

Tablica 14. Prikaz prosječnog broja metilja prema lokaciji i alelima DRB_ref01 i DRB_ref06.

	Lipovljani	**Baranja**	
DRB_ref01	65 *64.42* (0.01)	7 *7.58* (0.04)	**72**
DRB_ref06	3 *3.58* (0.09)	1 *0.42* (0.80)	**4**
	68	**8**	**76**

Usporedbom nalaza parazitološke pretrage jetre i prisutnosti pojedinih alela MHC DRB gena uočena je razlika u invadiranosti jelena ovisno o vrsti alela. Pri tome je razlika između invadiranosti jelena s DRB_ref01 i DRB_ref06 alelom statistički znakovita (χ^2 = 0,939, df = 1, χ^2/df = 0,94, p = 0,332) (Tablica 14). Preostali aleli pojavljuju se uglavnom znatno rjeđe i ne mogu se dovesti u svezu s invazijom metiljem *F. magna*.

6. RASPRAVA

Odnos nositelja i parazita je odnos između beskralješnjaka (parazit) i nekog drugog organizma (nositelj), u kojemu parazit živi na račun nositelja. Ovaj odnos se može značajno razlikovati u ovisnosti o vrsti parazita, prilagodbi nositelja na parazita i obrnuto, te naravno o obrambenim sposobnostima nositelja. Proučavanje takvoga odnosa zahtijeva sveobuhvatnost, a sukladno tome u novije se vrijeme sve više zagovara kombinirani pristup uključujući istodobno i vremensku i prostornu komponentu (KOSKELLA, 2014.; PENCZYKOWSKI i sur., 2016.). Prema PENCZYKOWSKI i sur. (2016.) opći je stav da su ekspresija otpornosti nositelja ili pak s druge strane invazivnosti parazita daleko od stabilnih svojstava koje zagovara većina epidemioloških modela. Nasuprot tome, ove osobitosti su rezultat varijacija živih i neživih čimbenika. Upravo je iz toga razloga odnos parazit-nositelj, a ovdje u primjeru invazije metiljem *Fascioloides magna* na području Europe, iznimno zanimljiv. Naime, kako je već rečeno u poglavlju Pregled dosadašnjih spoznaja, u Europi metilj *F. magna* predstavlja nezavičajnu vrstu metilja (za pregled vidi KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.). Drugim riječima, unosom nezavičajnih vrsta jelena na područje Europe ljudi su unesli i metilja koji je posljedično došao u kontakt s čitavim spektrom naivnih potencijalnih nositelja, što je pružilo mogućnost promatranja razvoja novih asocijacija parazit-nositelj. S druge strane, danas na primjeru Republike Hrvatske imamo područja na kojima veliki američki metilj i sva tri tipa nositelja koegzistiraju tijekom razdoblja od oko 20 godina, ali i područja na kojima metilj nikada nije bio prisutan tijekom povijesti. Upravo iz navedenih činjenica fascioloidoza predstavlja ne tako čest primjer gdje možemo proučavati razvoj odnosa parazita i nositelja na primjeru velikih, slobodnoživućih životinja. U suprotnom stanju odnosa istraživači kombiniraju istraživanja s koevolucijom u pokusnim uvjetima (npr. EIZAGUIRRE i sur., 2012.), koja uglavnom ne obuhvaća sve složene interakcije koje se događaju u prirodnom okolišu, a mogu imati utjecaja i na odnos nositelj-parazit.

Istražujući invadiranost jelena običnoga velikim američkim metiljem u ovome su doktoratu potvrđeni nalazi ŠIMUNOVIĆA (2017.) za područje državnog otvorenog lovišta br. XIV/9 "PODUNAVLJE-PODRAVLJE" i KONJEVIĆ i sur. (2018.) za područje državnog otvorenog lovišta br. XIV/11 "SPAČVA", koji su utvrdili kako nema razlika u invaziji velikim američkim metiljem među spolovima, ali da je prevalencija pozitivnih grla statistički znakovita s porastom dobi jelena. Ovdje treba svakako istaknuti kako je porast prevalencije s dobi razumljiv s obzirom da dulji život jedinke povećava i rizik kontakta s metacerkarijama metilja pa svake sljedeće godine postoji nova mogućnost invazije. Ukoliko se tome doda da je životni vijek metilja unutar pseudociste oko 5 godina, sasvim je razumljiva pozitivna veza između spomenutih varijabli. Nasuprot tome neovisnost prevalencije u odnosu na spol jelena je donekle neočekivana. Naime, izražena sklonost poglavito horizontalnim, ali i vertikalnim migracijama jelenske divljači je također u dosadašnjim istraživanjima ocijenjena kao jedan od rizičnih čimbenika u širenju fascioloidoze s obzirom da jeleni često tijekom migracija dolaze u područja s višom prevalencijom pozitivnih grla kao što je primjerice slučaj migracije kroz nacionalne parkove i parkove prirode ili dolazak iz susjednih zemalja u kojima se ne provode mjere kontrole bolesti. Sukladno tome, bilo je za očekivati da će izraženije sklonosti migracijama mužjaka, u odnosu na ženke (KLEVELAND, 2007.) rezultirati mogućom jačom invadiranošću mužjaka, ali to nije potvrđeno statističkim analizama. Pored navedenoga, u prethodnim istraživanjima na području Republike Hrvatske nije utvrđena niti razlika u ovisnosti o lokaciji prikupljanja uzoraka (ŠIMUNOVIĆ, 2017.; KONJEVIĆ i sur., 2018.). Navedeno se pripisuje izrazito pogodnim okolišnim čimbenicima koji podržavaju razvojni ciklus i održavanje velikog američkog metilja u većem dijelu nizinskih staništa u Republici Hrvatskoj.

U ovom istraživanju identificirana su 44 DRB alela duljine 240 parova baza. Od njih, četiri alela otprije su poznata i zavedena su u Genskoj banci pod pristupnim brojevima DQ225349, EU573266, EU573273 i EU573271. U ovom istraživanju ovi aleli su privremeno označeni kao

DRB_NS36, DRB_NS38, DRB_ref01 i DRB_ref02. Preostalih 40 alela utvrđenih u ovom istraživanju predstavljaju nove i u Gensku banku do sada ne uvedene alele jelena običnoga. Navedeni broj alela sukladan je istraživanju BUCZEK i sur. (2016.) koji su na 177 uzoraka jelena običnoga utvrdili 46 različitih alela. Razlika je u činjenici da su navedeni autori utvrdili maksimum od sedam alela kod jedne jedinke te iz toga zaključili da uzorkovani jeleni imaju barem četiri lokusa MHC DRB gena. U našem istraživanju je utvrđeno maksimalno 4 alela po jedinci, iz čega se može zaključiti kako jeleni iz ovoga uzorka imaju 2 lokusa MHC DRB gena. Ovdje također treba napomenuti kako su i druga istraživanja na jelenu običnom također utvrdila visoku varijabilnost MHC DRB gena uz tvrdnju o dva lokusa (SWARBRICK i sur., 1995.; MIKKO i sur., 1999.). Pri tome su SWARBRICK i sur. (1995.) utvrdili 49 različitih alela u istraživanju koje je obuhvatilo 50 jelena običnih. Iz navedenoga je razvidno kako je riječ o MHC genima visoke varijabilnosti, što ujedno upućuje na vitalnu populaciju s dobrim potencijalom obrane od različitih patogena. Pored toga, različita istraživanja na skandinavskim populacijama jelena su pokazala i kako je heterozigotnost veća u jelena običnoga u odnosu na srnu običnu, losa (*Alces alces*) ili soba (*Rangifer tarandus*) (BACCUS i sur., 1983.). S obzirom da su u ovom istraživanju prikupljeni uzorci jelena iz nizinskoga (Slavonija, Baranja i Moslavina) i gorskoga staništa (Gorski kotar), isti su razmatrani zasebno. Pri tome je vidljivo da je u jelena iz Gorskoga kotara (n=6) utvrđeno 9 različitih alela. Ono što je posebno zanimljivo jest da su svega 3 od navedenih 9 alela zajednički s jelenskim populacijama iz nizinske Hrvatske (DRB_ref02, DRB_ref05, DRB_NS7). Navedeni je podatak zanimljiv iz dva razloga. Prvi razlog je prisutnost/odsutnost parazita, s obzirom da se raznolikost alela jednim dijelom dovodi u svezu s takozvanom balansirajućom selekcijom uvjetovanom prisutnošću različitih patogena. Naime, iz koproloških nalaza razvidno je kako je parazitofauna jelena običnoga na području Gorskoga kotara razmjerno siromašna (pripadnici porodice *Strongylidae*, *Protostrongylidae* i roda *Capillaria*). Pored toga za ovaj su doktorat dodatno odabrani jeleni s

negativnim koprološkim nalazom. Ipak, kako se spomenuti paraziti nalaze uobičajeno u jelenskim populacijama različitih staništa u Hrvatskoj te se trenutno negativan koprološki nalaz ne može uzeti kao mjerodavan kod prosudbe utjecaja parazita na MHC gene valja dakle istaknuti da pojedinačni negativan nalaz nema utjecaj na nalaz sekvenciranja. Sukladno tome, drugi razlog se čini vjerojatnijim objašnjenjem navedenih razlika. Naime, prema morfološkim razlikama između jelena Gorskog kotara i nizinske Hrvatske, koje se očituju poglavito u tjelesnoj masi te veličini i rasponu rogovlja (JANICKI i sur., 2007.), a posebice prema određenim preliminarnim genetskim istraživanjima, sve je češća tvrdnja da su jeleni u Hrvatskoj grupirani u dva podtipa, zapadni (dinarski) i istočni (panonski). Drugim riječima, nalaz svega tri zajednička alela između ove dvije istraživane skupine mogao bi se objasniti pripadnošću različitim subpopulacijama. Pojašnjenje za navedenu tvrdnju nalazimo primjerice u istraživanjima provedenim na europskom i američkom losu, gdje su MIKKO i ANDERSSON (1995.) utvrdili svega jedan zajednički alel među ovim podvrstama losa koje obitavaju na dva različita kontinenta. Slično su utvrdili VAN DER WALT i sur. (2001.) na primjeru bontebok (*Damaliscus pygargus pygargus*) i blesbok antilope (*Damaliscus pygargus phillipsi*), kao i SCHASCHL i sur. (2005.) na primjeru pirenejske (*Rupicapra rupicapra pyrenaica*) i alpske divokoze (*Rupicapra rupicapra rupicapra*). U oba je istraživanja utvrđena podudarnost u svega 2 alela, što su autori pripisali zajedničkim pretcima, ili pak mogućim križanjima uslijed prirodnih migracija ili pak unosa od strane ljudi. U našem slučaju je vrlo vjerojatno riječ o oba mehanizma, s obzirom da su poznate ne samo prirodne migracije jelena, već i kupovina i premještanje jelena iz različitih područja u selekcijsko-uzgojne svrhe. Usporedbom prisutnosti najčešćih alela u obje populacije hi-kvadrat testom nije utvrđena statistička znakovitost. Nasuprot tome, utvrđena je raznolikost među nizinskim populacijama. Tako je primjerice utvđena statistički znakovita razlika u prisutnosti DRB_ref01 i DRB_ref02 alela koji su znatno češće utvrđeni u jelena s područja Lipovljana u odnosu na jelena s područja Baranje. S druge

strane, baranjski jeleni imaju statistički znakovito višu frekvenciju alela DRB_ref03 u odnosu na jelene s područja Lipovljana i Spačvanskog bazena. Iako su dosadašnja istraživanja u nekoliko navrata potvrdila kako niska genetička raznolikost i raznolikost MHC gena nisu uvijek u korelaciji (HEDRICK i sur., 2000.; SOMMER, 2003.; AGUILAR i sur., 2004.; RADWAN i sur., 2007.), postoji vrlo velika vjerojatnost kako je riječ o genetski raznolikoj populaciji jelena običnoga.

Istraživanja usmjerena na povezanost alela MHC gena s parazitskim invazijama su sve češća u posljednje vrijeme (DITCHKOFF i sur., 2005.; STEAR i sur., 2007.; RADWAN i sur., 2010.; AXTNER i SOMMER, 2011.; ZHANG i sur., 2015.). Pri tome se odnos između alela i parazitskih invazija i dalje pretežito tumači kroz dvije pretpostavke, jedne o utjecaju heterozigotnosti i druge o postojanju specifičnih alela (DOHERTY i ZINKERNAGEL, 1975.; TAKAHATA i NEI, 1990.). Iako su ove pretpostavke postavljene razmjerno davno, znanstvenici i danas raspravljaju o tome koja je od njih ispravnija (SOMMER, 2005.; PIERTNEY i OLIVER, 2006.). Unatoč svemu, u posljednje vrijeme sve češće se javlja i teza kako se navedene dvije pretpostavke međusobno ne isključuju, već nadopunjuju te se ista čini znatno prihvatljivijom. Naime, do sada se niti jedna od njih nije u potpunosti pokazala samodostatnom. S druge strane je također potreban oprez u tumačenju utvrđenih varijacija alela. Naime, imunosni sustav je ograničenih sposobnosti kada je riječ o uklanjanju velikog američkoga metilja iz organizma. Prema tome teško je i govoriti o otpornosti na ovu bolest, iako su dosadašnja istraživanja dokazala pokretanje humoralnog imunosnog odgovora kod jelena i koza invadiranih prirodno, odnosno eksperimentalno metacerkarijama ovoga metilja (NOVOBILSKÝ i sur., 2007.b; SEVERIN, 2009.; SEVERIN i sur., 2015.). Dodatan problem u promatranju utjecaja MHC gena na otpornost prema invaziji velikim američkim metiljem u divljih jelena čini provedba programa liječenja, tako da je teško razlučiti učinak lijeka kroz smanjenje broja jajašaca i manji pritisak u okolišu od učinka imunosnog sustava. Shodno tome,

puno je prihvatljivije govoriti o promjenama u organizmu usmjerenima na borbu s novom parazitskom vrstom. Pored navedenoga vrlo se često postavlja pitanje koliko je vremena potrebno da se počnu javljati određene vidljive promjene u organizmu. Uvid u potencijal promjene MHC gena daju novija istraživanja na primjeru koljuške (*Gasterosteus aculeatus*), gdje je utvrđen porast frekvencije alela odgovornih za otpornost na invaziju oblićima vrste *Camallanus lacustris* i *Anguillicola crassus* (EIZAGUIRRE i sur., 2012.). Ono što je još impresivnije jest da se ovaj porast frekvencije primijetio već u drugoj generaciji nositelja. Sukladno takvim opažanjima nije nerealno niti očekivati određene promjene na MHC genima jelena koji su u suživotu s ovim parazitom već gotovo dva desetljeća. U skladu s time u ovom istraživanju utvrđena je pojava DRB_ref01 i DRB_ref06 alela isključivo u jelena s nizinskih staništa. Pri tome je DRB_ref01 alel utvrđen isključivo kod grla pozitivnih na fascioloidozu. S druge strane DRB_ref06 alel je utvrđen i kod grla koja su bila negativna, a odnos ova dva alela prema stupnju invazije je statistički znakovit. Također je zanimljiva i činjenica da je DRB_ref06 alel utvrđen u jelena sa slabijom invazijom velikim američkim metiljem, kako je i razvidno iz Grafikona 12, i to neovisno o lokacijama što je dosta važno s obzirom da je prevalencija pozitivnih grla viša na području Lipovljana. Još jedna značajna činjenica je i to da je alel DRB_ref06 novi alel, koji nije do sada opisan kod jelena običnoga. Ovakav trend daje naslutiti kako su oba alela, i DRB_ref01 i DRB_ref06 povezana s invazijom velikim američkim metiljem, ali i da potencijalno postoji zaštitni učinak alela DRB_ref06. Ovdje navodim potencijalno, s obzirom da je potrebno provesti i dodatna istraživanja s povećanjem broja uzoraka te uključivanjem jelena običnih s nizinskih područja na kojima nije formirano žarište fascioloidoze. Također treba imati na umu da postoji mogućnost i da su pojedini aleli odgovorni za odnos prema više vrsta srodnih parazita tako da povezivanje s jednim parazitom nije sasvim jednostavno (DITCHKOFF i sur., 2005.). Ipak, u našem je slučaju ovakva situacija puno vjerojatnija u slučaju invazije velikim jetrenim metiljem (*Fasciola hepatica*), ali isti nije

utvrđen već dulje vrijeme u jelena na navedenom području (KONJEVIĆ i sur., 2011.). Pored toga, s obzirom da je veliki američki metilj zasigurno najpatogeniji parazit jelena običnoga u Republici Hrvatskoj, za očekivati je da je i selekcijski pritisak na MHC gene viši kod invazije ovim metiljem negoli drugim parazitima. Na primjeru bjelorepog jelena DITCHKOFF i sur. (2005.) su utvrdili povezanost specifičnog alela na DRB lokusu s otpornošću na invaziju ekto- ili endoparazitima. S druge strane, na primjeru jelena običnog u Španjolskoj (*Cervus elaphus hispanicus*) utvrđeno je da postoji veliki funkcionalni značaj MHC gena klase II (lokus DRB 2) kod obrane od parazitskih oboljenja (FERNANDEZ-DE-MERA i sur., 2009.). Konačno, odnos parazita, razvoja rogovlja i MHC gena u jelena običnoga proučavali su BUCZEK i sur. (2016.).

Naposljetku moguće je zaključiti kako je varijabilnost MHC DRB lokusa jelena običnoga na području Republike Hrvatske visoka i u skladu s istraživanjima na drugim populacijama jelena običnoga. Također je razvidno kako u Hrvatskoj postoje dvije subpopulacije jelena običnoga, zapadna ili dinarska i istočna ili panonska, koje dijele zajednička tri alela. S obzirom da su MHC geni najraznolikiji geni kralješnjaka i da posjeduju veliku sposobnost promjene u razmjerno kratkom vremenskom roku, postoji mogućnost da su aleli DRB_ref01 i DRB_ref06 povezani s invazijom metiljem *Fascioloides magna* te sugeriraju na moguće genske prilagodbe jelena običnoga novoj vrsti parazita.

7. ZAKLJUČCI

- istraživanjem je utvrđena visoka raznolikost MHC DRB lokusa kod jelena običnoga, utvrđena su 44 alela, od čega su 4 alela otprije poznata i uvedena u Gensku bazu
- potvrđeno je postojanje dvije subpopulacije jelena običnoga, zapadna ili dinarska i istočna ili panonska koje međusobno dijele tri zajednička alela
- potvrđene su statistički znakovite razlike u prisutnosti pojedinih alela između populacija s područja Lipovljana u odnosu na područje Baranje, te Baranje u odnosu na područje Lipovljana i Spačvanskog bazena
- utvrđena je prisutnost DRB_ref01 alela isključivo kod grla pozitivnih na fascioloidozu
- utvrđen je statistički znakovito niži stupanj invazije velikim američkim metiljem kod jedinki koje imaju alel DRB_ref06 u odnosu na one s alelom DRB_ref01
- visoka raznolikost MHC DRB gena ukazuje na vitalnu populaciju jelena običnoga u Republici Hrvatskoj, a odnos alela DRB_ref01 i DRB_ref06 potencijalno na razvoj odnosa nositelj-parazit u slučaju fascioloidoze jelena običnoga

8. POPIS LITERATURE

AGUILAR, A., G. ROEMER, S. DEBENHAM, M. BINNS, D. GARCELON, R. K. WAYNE (2004): High MHC diversity maintained by balancing selectionin in an otherwise genetically monomorphic mammal. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 10, 3490-3494.

AMMER, H., F. W. SCHWAIGER, C. KAMMBERBAUER, M. GOMOLKA, A. ARRIENS, S. LAZARY, J. T. EPPLEN (1992): Exonic polymorphism vs intronic simple repeat hypervariability in MHC-DRB genes. Immunogenetics 35, 332-340.

ANONIMUS (2005): Zakon o lovstvu. Narodne novine br. 140/05.

APOSTOLO, C. (1996): The naturalistic aspects: flora, fauna and the environment. In: La Mandria Storia e natura del Parco (Lupo, M., M. Paglieri, C. Apostolo, E. Vaccarino, M. Debernardi, eds). Edizioni Eda, Torino.

ARBANASIĆ, H., A. GALOV, A. AMBRIOVIĆ-RISTOV, J. GRIZELJ, G. ARSENOS, B. MARKOVIĆ, T. DOVENSKI, S. VINCE, I. ČURIK (2013a): Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in balkan Donkeys: perspectives on selection and genealogy. Anim. Genet. 44, 711-716.

ARBANASIĆ, H., Đ. HUBER, J. KUSAK, T. GOMERČIĆ, J. HRENOVIĆ, A. GALOV (2013b): Extensive polymorphism and evidence of selection pressure on major histocompatibility complex DLA-DRB1, DQA1 and DQB1 class II genes in Croatian grey wolves. Tissue Antigens 81, 19-27.

AXTNER, J., S. SOMMER (2011): *Heligmosomoides polygyrus* infection is associated with lower MHC class II gene expression in *Apodemus flavicollis*: Indication for immune suppression?. Infect. Genet. Evol. 11, 2063–2071.

BACCUS, R., N. RYMAN, M. H. SMITH, C. REUTERWALL, D. CAMERON (1983): Genetic variability and differentiation ol large grazing mammals. J. Mammal. 64, 109-120.

BALBO, T., P. LANFRANCHI, L. ROSSI, P. G. MENEGUZ (1987): Health management of a red deer population infected by *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917. Ann. Fac. Med. Vet. Torino 32, 1–13.

BASSI, R. (1875): Sulla cachessia ittero-verminosa, o marciaia, causta dei Cervi, causata dal *Distomum magnum*. Il Medico Veterinario 4, 497–515.

BLAŽEK, K., F. GILKA (1970): Notes of the nature of the pigment of the trematode *Fascioloides magna.* Folia Parasitol. 17, 165–170.

BOJOVIĆ, D., L. K. HALLS (1984): Central Europe. In: White-tailed deer ecology and management (Halls, L. K., ed). Stackpole Books, Harrisburg.

BUCZEK, M., H. OKARMA, A. W. DEMIASZKIEWICZ, J. RADWAN (2016): MHC, parasites and antler development in red deer: no support for the Hamilton & Zuk hypothesis. J. Evol. Biol. 29, 617-632.

CAMPBELL, W. C. (1960): Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. J. Parasitol. 46, 769–775.

CAMPBELL, W. C. (1961): Notes of the egg and miracidium of *Fascioloides magna* (Trematoda). T. Am. Microsc. Soc. 80, 308–319.

CAR, Z. (1967): Razvrstavanje i prirodoslovlje divljači. U: Lovački priručnik (Dragišić, P., ur.). Lovačka knjiga, Zagreb, str. 114-116.

CHEN, M. G., K. E. MOTT (1990): Progress in assessment of mobidity due to *Fasciola hepatica* infection: a rewiew of recent literature. Trop. Dis. Bul. 57, 1-38.

CHROUST, K. (1987): Současný stav a možnosti tlumení motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u zvěře. Veterinářství 37, 514–515. (in Czech)

CONBOY, G. A., B. E. STROMBERG (1991): Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. Vet. Parasitol. 40, 241–255.

CONNER, J. K., D. L. HARTL (2004): A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.

ČEOVIĆ, I. (1940): Lovstvo. Tipografija d.d., Zagreb, 608 str.

DANCHIN, E. G. J., V. VITIELLO, A. VIENNE, O. RICHARD, P. GOURET, M. F. MCDERMOTT, P. PONTAROTTI (2004): The major histocompatibility complex origin. Immunol. Rev. 198, 216–232.

DARABUŠ, S., I. Z. JAKELIĆ (2002): Osnove lovstva. Hrvatski lovački savez, Zagreb, str. 68-76.

DAVIS, D. A., B. J. BOGITSH (1971): *Gorgoderina attenuata*: cytochemical and biochemical observations on the digestive tracts of digenetic trematodes. Exp. Parasitol. 29, 320-329.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013): Veterinarska imunologija, načela i primjena, hrvatsko izdanje. (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković – ur. hrv. izdanja). Medicinska naklada, Zagreb, str. 65-71.

DEMIASZKIEWICZ, A. W., I. KULIGOWSKA, A. M, PYZIEL, J. LACHOWICZ, R. KOWALCZYK (2015): Extension of occurrence area of the American fluke *Fascioloides magna* in south-western Poland. Ann. Parasitol. 61, 93–96.

DENGJEL, J., O. SCHOOR, R. FISCHER, M. REICH, M. KRAUS., M. MÜLLER (2005): Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 7922-7927.

DITCHKOFF, S. S., S. R. HOOFER, R. L. LOCHMILLER, R. E. MASTERS, R. A. VAN DEN BUSSCHE (2005): MHC-DRB evolution provides insight into parasite resistance in white-tailed deer. Southwest. Nat. 50, 57‑64.

DOHERTY, P. C., R. M. ZINKERNAGEL (1975): Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at H-2 gene complex. Nature 256, 50.

ECKERT J., K. T. FRIEDHOFF, H. ZAHNER, P. DEPLAZES (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, Erste Auflage, Enke.

EIZAGUIRRE, C., T. L. LENZ, M. KALBE, M. MILINSKI (2012): Rapid and adaptive evolution of MHC genes under parasite selection in experimental vertebrate populations. Nat. Commun. 10, 3:621.

ERHARDOVÁ, B. (1961): Vývojový cyklus motolice obrovské *Fasciola magna* v podmínkách ČSSR. Zool. Listy. 10, 9–16.

ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, B. (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Academia, Czech Academy of Sciences, Praque, 155 pp.

FERNANDEZ-DE-MERA, I. G., J. VINCENTE, V. NARANJO, Y. FIERRO, J. J. GARDE, J. DE LA FUENTE, C. GORTAZAR (2009): Impact of major histocompatibility complex class II polymorphisms on Iberian red deer parasitism and life history traits. Infect. Genet. Evol. 9, 1232‑1239.

FLORIJANČIĆ, T. (2006): Epizootiološka istraživanja fascioloidoze običnog jelena (*Cervus elaphus*) u istočnoj Hrvatskoj. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.

FLORIJANČIĆ, T., S. OZIMEC, A. OPAČAK, I. BOŠKOVIĆ, D. JELKIĆ, A. MARINCULIĆ, Z. JANICKI (2010): Importance of the Danube River in spreading the infection of red deer with *Fascioloides magna* in eastern Croatia. Paper presented at 38th IAD conference, Dresden, Germany.

FOREYT, W. J. (1992): Experimental *Fascioloides magna* infections of mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). J. Wildl. Dis. 28, 183–187.

FOREYT, W. J. (1996): Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally-induced *Fascioloides magna* infections. J. Wildl. Dis. 32, 556–559.

FOREYT, W. J., A. C. TODD (1976a): The development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. J. Parasitol. 62, 26–32.

FOREYT, W. J., A. C. TODD (1976b): Liver flukes in cattle: prevalence, distribution and experimental treatment. Vet. Med. Small Anim. Clin. 71, 816–822.

FOREYT, W. J., C. W. LEATHERS (1980): Experimental infection of domestic goats with *Fascioloides magna*. Am. J. Vet. Res. 41, 883–884.

FOREYT, W. J., W. M. SAMUEL, A. C. TODD (1977): *Fascioloides magna* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): observation of the pairing tendency. J. Parasitol. 63, 1050–1052.

GARRIGAN, D., P. W. HEDRICK (2003): Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. Evolution 57, 1707-1722.

GAUDIERI, S., R. L. DAWKINS, K. HABARA, J. K. KULSKI, T. GOJOBORI (2000): SNP profile within the human major histocompatibility complex reveals an extreme and interrupted level of nucleotide diversity. Genome Res. 10, 1579–1586.

GICZI, E. (2008): *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) infection of Hungarian red deer and roe deer stock and the possibility of protection. Dissertation. University of West Hungary

GREGERSEN, P. K. (2008): Genetics of Rheumatic Diseases. In: Kelley's Textbook of Rheumatology, 8th edn. (Firestein, G. S., R. C. Budd, E. D. Harris Jr., I. B. McInnes, S. Ruddy, J. S. Sergent, eds). Elsevier Inc., W. B. Saunders Company.

GRIFFITHS, H. J. (1962): Fascioloidiasis of cattle, sheep and deer in Northern Minnesota. J. Am. Vet. Med. Assoc. 140, 342–347.

HANNA, R. E., A. G. TRUDGETT (1983): *Fasciola hepatica*: development of monoclonal antibodies and their use to characterize a glycocalyx antigen in migrating flukes. Parasite Immunol. 5, 409-425.

HEDRICK, P. W., K. M. PARKER, E. L. MILLER, P. S. MILLER (2001): Major Histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski's horse. Genetics 152, 1701-1710.

HEDRICK, P. W., K. M. PARKER, G. A. GUTIÉRREZ-ESPELETA, A. RATTINK, K. LIEVERS (2000): Major Histocompatibility Complex variation in the Arabian Oryx. Evolution 54, 2145-2151.

HUGHES, A. L., M. YEAGER (1998): Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. Annu. Rev. Genet. 32, 415-434.

IUCN (2017): The IUCN Red List of Threatened Species. http://www.iucnredlist.org

JANICKI, Z. (2004): Ciklus rasta roga. U: Lovstvo (Mustapić, Z., ur.). Hrvatski lovački savez, Zagreb.

JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 17-22.

JANICKI, Z., D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2005): Monitoring and Treatment of *Fascioloides magna* in Semi-Farm Red Deer Husbandry in Croatia. Vet. Res. Comm. 29 (Suppl), 83-88.

JONES, A. (2005): Family *Fasciolidae*. In: Keys to the Trematoda: Volume 2 (Gibson D. I., A. Jones, R. A. Bray, eds.). CABI Publishing, New York. pp. 79-87.

KARAMON, J., M. LARSKA, A. JASIK, B. SELL (2015): First report of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in farmed fallow deer (*Dama dama*) in Poland—pathomorphological changes and molecular identification. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 59, 339–344.

KAŠNÝ, M., L. BERAN, V. SIEGELOVÁ, T. SIEGEL, R. LEONTOVYČ, K. BERÁNKOVÁ, J. PANKRÁC, M. KOŠŤÁKOVÁ, P. HORÁK (2012): Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. Vet. Med. 57, 101–109.

KLEIN, J. (1986): Seeds of time: Fifty years ago Peter A. Gorer discovered the H-2 complex. Immunogenetics 24, 331-338.

KLEIN, J., D. KLEIN, F. FIGUEROA, C. O'HUIGÍN (1997): Mayor histocompatibility genes in the study of fish phylogeny. In: : Molecular Systematics of Fishes (Kocher, T. D., C. A. Stepien, eds.). Academic Press, San Diego, pp. 271-283.

KLEVELAND, K. (2007): Seasonal home ranges and migration of red deer (*Cervus elaphus*) in Norway. Master Thesis. University of Oslo, Norway, 34 pp.

KONJEVIĆ, D., V. NJEMIROVSKIJ, H. BRKIĆ, Z. JANICKI, A. SLAVICA, K. SEVERIN, T. KEROS (2006): Neke karakteristike zuba kao parametar u prosuđivanju dobi divljači. Hrv. Vet. Vjesn. 29, 195-201.

KONJEVIĆ D., Z. JANICKI, T. ŽIVIČNJAK, A. SLAVICA, A. MARINCULIĆ (2011): Return of *Fasciola hepatica* into parasitic fauna of wild red deer from Baranja region. In: Infectious and Parasitic Diseases of Animals (Kočišová, A., M. Prokeš, eds). Proc. of sci. contributions and abstracts of 4th International Scientific Conference, Košice, 7-8 September 2011. UVLF Košice, Slovak Republic, p. 262.

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, V. ERMAN, A. GUDAN KURILJ, T. ŽIVIČNJAK, K. SEVERIN, S. TOMIĆ, F. MARTINKOVIĆ (2017): New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). Helminthologia 54, 77-80.

KONJEVIĆ, D., Z. JANICKI, P. CALMELS, D. STOJČEVIĆ JAN, A. MARINCULIĆ, M. ŠIMUNOVIĆ, M. PAVLAK, K. KRAPINEC, Z. POLJAK (2018): Evaluation of factors affecting the efficacy of treatment against *Fascioloides magna* in wild red deer population. Vet. Ital. 54, 33-39.

KOSKELLA, B. (2014): Bacteria-phage interactions across time and space: merging local adaptation and time-shift experiments to understand phage evolution. Am. Nat. 184 (Suppl 1), S9–S21.

KOTRLÁ, B., A. KOTRLÝ (1980): Dissemination of helminths by the introduction of game animals. Angew. Parasitol. 21, 79-82.

KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., E. BAZSALOVICSOVÁ, A. DEMIASZKIEWICZ (2015): Molecular characterization of *Fascioloides magna* (Trematoda: *Fascioloidae*) from south-western Poland based on mitochondrial markers. Acta Parasitol. 60, 544–547.

KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., L. JUHÁSOVÁ, E. BAZSALOVICSOVÁ (2016): The Giant Liver Fluke, *Fascioloides magna*: Past, Present and Future Research. Springer, pp. 1-50.

LANFRANCHI, P., F. TOLARI, R. FORLETTA, P. G. MENEGUZ, L. ROSSI (1985): The red deer as reservoir of parasitic and infectious pathogens for cattle. Ann. Fac. Med. Vet. Torino 30, 1–17.

MAJOROS, G., V. SZTOJKOV (1994): Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: *Fasciolata*) ih Hungary. Parasitol. Hung. 27, 27-38.

MALE D., J. BROSTOFF, D. ROTH, I. ROITT (2006): Immunology. 7th revised edition, Mosby Elsevier Ltd., 544 pp.

MARINCULIĆ, A., N. DŽAKULA, Z. JANICKI, Z. HARDY, S. LUČINGER, T. ŽIVIČNJAK (2002): Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. Vet. arhiv 72, 319-325.

MARINKOVIĆ, D., V. KUKOLJ, S. ALEKSIĆ-KOVAČEVIĆ, M. JOVANOVIĆ, M. KNEŽEVIĆ (2013): The role of hepatic myofibroblasts in liver cirrhosis in fallow deer (*Dama dama*) naturally infected with giant liver fluke (*Fascioloides magna*). BMC Vet. Res. 9, 45.

MIKKO, S., L. ANDERSSON (1995): Low major histocompatibility complex class II diversity in European and North American moose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4259-4263.

MIKKO, S., M. SPENCER, B. MORRIS, S. STABILE, T. BASU, C. STORMONT, L. ANDERSSON (1997): A comparative analysis of the MHC DRB3 polymorphism in the American Bison (*Bison bison*). J. Hered. 88, 499-503.

MIKKO, S., K. RØED, S. SCHMUTZ, L. ANDERSSON (1999): Monomorphism and polymorphism at MHC DRB loci in domestic and wild ruminants. Immunol. Rev. 167, 169-178.

MIRČETA J., M. PELIĆ, B. BOŽIĆ, J. PETROVIĆ, M. UROŠEVIĆ, B. STANKOV, D. BUGARSKI (2018): Prevalence of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in red deer (*Cervus elaphus*) in the region of floodplain forests of northern Serbia. Arh. Vet. Med. 11, 17 – 26.

MULVEY, M., J. M. AHO, C. LYDEARD, P. L. LEBERG, M. H. SMITH (1991): Comparative population genetic structure of a parasite (*Fascioloides magna*) and its definitive host. Evolution 45, 1628–1640.

MURRAY, B., R. MICHAUD, B. WHITE (1999): Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St. Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). Mol. Ecol. 8, 1127-1139.

NOVOBILSKÝ, A., E. HORÁČKOVÁ, L. HIRTOVÁ, D. MODRÝ, B. KOUDELA (2007a): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. Parasitol. Res. 100, 549–553.

NOVOBILSKÝ, A., M. KAŠNÝ, L. MIKEŠ, K. KOVAŘČÍK, B. KOUDELA (2007b): Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. Parasitol. Res. 101, 357-364.

PENCZYKOWSKI, R. M., A.-L. LAINE, B. KOSKELLA (2016): Understanding the ecology and evolution of host–parasite interactions across scales. Evol. Appl. 9, 37-52.

PFEIFFER, H. (1983): *Fascioloides magna*: Erster Fund in Österreich. Wien. Tierarztl. Monat. 70, 168–170.

PIERTNEY, S. B., M. K. OLIVER (2006): The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. Heredity 96, 7.

PLÖTZ, C., S. REHBEIN, H. BAMLER, H. REINDL, K. PFISTER, M. C. SCHEUERLE (2015): *Fascioloides magna*— epizootiology in a deer farm in Germany. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 128, 177–182.

PURSGLOVE, S. R., A. K. PRESTWOOD, T. R. RIDGEWAY, F. A. HAYES (1977): *Fascioloides magna* infection in white-tailed deer of southeastern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 171, 936–938.

PYBUS, M. J. (1990): Survey of hepatic and pulmonary helminths of wild cervids in Alberta, Canada. J. Wildl. Dis. 26, 453–459.

PYBUS, M. J. (2001): Liver flukes. In: Parasitic diseases of wild mammals, 2nd edn. (Samuel, W. M., M. J. Pybus, A. A. Kocan, eds). Iowa State University Press, Ames.

PYZIEL, A. M., A. W. DEMIASZKIEWICZ, I. KULIGOWSKA (2014): Molecular identification of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) from red deer from south-western Poland (Lower Silesian Wilderness) on the basis of internal transcribed spacer 2 (ITS-2). Pol. J. Vet. Sci. 17, 523–525.

RADWAN, J., A. KAWALKO, J. M. WOJCIK, W. BABIK (2007): MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. Mol. Ecol. 16, 531‑540.

RADWAN, J., A. W. DEMIASZKIEWICZ, R. KOWALCZYK, J. LACHOWICZ, A. KAWALKO, J. M. W0JCIK, A. M. PYZIEL, W. BABIK (2010): An evaluation of two potential risk factors, MHC diversity and host density, for infection by an invasive nematode *Ashworthius sidemi* in endangered European bison (*Bison bonasus*). Biol. Conserv. 143, 2049‑2053.

RAJKOVIĆ-JANJE, R., S. BOSNIĆ, D. RIMAC, T. GOJMERAC (2008): The prevalence of American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in red deer from Croatian hunting grounds. Eur. J. Wildl. Res. 54, 525–528.

RAJSKÝ, D., A. PATUS, K. BUKOVJAN (1994): Prvý nález *Fascioloides magna* Bassi, 1875 na Slovensku. Slov. Vet. Čas. 19, 29–30.

RAJSKÝ, D., J. ČORBA, M. VÁRADY, M. ŠPAKULOVÁ, R. CABADAJ (2002): Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red deer and roe deer. Helminthologia 39, 67–7.

RAJSKÝ, D., P. DUBINSKÝ, I. KRUPICER, R. SABO, J. SOKOL (2006): Výskyt propagačných štádií *Fascioloides magna* a iných helmintov vo fekáliách jelenej zveri z okresov hraničiacich s riekami Dunaj a Morava. Slov. Vet. Čas. 31, 177–180. (in Slovak)

REHBEIN, S., D. HAMEL, H. REINDL, M. VISSER, K. PFISTER (2012): *Fascioloides magna* and *Ashworthius sidemi*—two new parasites in wild ungulates in Germany. In: Program and abstracts of the XI European multicolloquium of parasitology (EMOP XI), Cluj-Napoca, Romania, 25–29 July 2012

SALOMON, S. (1932): *Fascioloides magna* bei deutschem Rotwild. Berl. Tier. Woch. 48, 627-628.

SCHASCHL, H., F. SUCHENTRUNK, S. HAMMER, S. J. GOODMAN (2005): Recombination and the origin of sequence diversity in the DRB MHC class II locus in chamois (*Rupicapra* spp.). Immunogenetics 57, 108-115.

SCHWAIGER, F. W., D. GOSTOMSKI, M. J. STEAR, J. L. DUNCAN, Q. A. MCKELLAR, J. T. EPPLEN, J. BUITKAMP (1995): An ovine Major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. Int. J. Parasitol. 25, 815-822.

SCHWARTZ, W. L., D. B. LAWHORN, E. MONTGOMERY (1993): *Fascioloides magna* in a feral pig. J. Swine Health Prod. 1, 27.

SEVERIN, K. (2009): Humoralni imunosni odgovor jelena običnog (*Cervus elaphus*) prirodno invadiranog velikim američkim metiljem. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

SEVERIN, K., F. MARTINKOVIĆ, Z. JANICKI, A. MARINCULIĆ, A. SLAVICA, D. ŽELE, G. VENGUŠT, P. DŽAJA, Z. VIDIĆ, D. KONJEVIĆ (2015): Indirect ELISA and Western blotting as tools to diagnose fascioloidosis in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). Vet. arhiv 85, 563-576.

SIGURDARDOTTIR, S., C. BORSCH, K. GUSTAFSSON, L. ANDERSSON (1991): Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. Anim. Genet. 22, 199-209.

SLAVICA, A., T. FLORIJANČIĆ, Z. JANICKI, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN, A. MARINCULIĆ, K. PINTUR (2006): Treatment of fascioloidosis (*Fascioloides magna*, Bassi 1875) in free ranging and captive red deer (*Cervus elaphus* L.) at eastern Croatia. Vet. Arhiv 76, 9–18.

ŚLUSARSKI, W. (1955): Studia nad europejskimi przedstawicielami przywry *Fasciola magna* (Bassi, 1875) Stiles, 1894. Acta Parasitol. Pol. 3, 1–59. (in Polish)

SOMMER, S. (2003): Effects of habitat fragmentation and changes of dispersal behaviour after a recent population decline on the genetic variability of non-coding and coding DNA of a monogamous Malagasy rodent. Mol. Ecol. 12, 2845-2851.

SOMMER, S. (2005): The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Front. Zool. 2, 16.

STEAR, M. J., A. BELCH, K. DONSKOW-SCHMELTER, L. A. FITTON, G. T. INNOCENT, C. ISHIKANE, A. MATEUS, L. MURPHY, K. RENNIE, A. SMITH, G. SAYERS (2007): Detection of genes with moderate effects on disease resistance using ovine MHC and resistance to nematodes as an example. Vet. Immunol. Immunopathol. 120, 3-9.

STILES, C. W., A. HASSALL (1894): The anatomy of the large American fluke (*Fasciola magna*), and a comparison with other species of the genus *Fasciola*. J. Comp. Med. Vet. Arch. 15, 161–462.

STILES, C. W., A. HASSALL (1895): The anatomy of the large American liver fluke (*Fasciola magna*) and a comparison with other species of the genus *Fasciola*. J. Comp. Med. Vet. Arch. 16, 139–147, 213–222, 277–282.

SWALES, W. E. (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants, in Canada. Can. J. Res. 12, 177–215.

SWARBRICK, P. A., F. W. SCHWAIGER, J. T. EPPLEN, G. S. BUCHAN, J. F. GRIFFIN, A. M. CRAWFORD (1995): Cloning and sequencing of expressed DRB genes of the red deer (*Cervus elaphus*) MHC. Immunogeneiics 42, 1-9.

ŠIMUNOVIĆ, M. (2017): Utjecaj epizootioloških čimbenika na suzbijanje fascioloidoze jelena u Baranji. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, J. GRBAVAC, D. KONJEVIĆ (2018): Primjena inkrementnih linija u tvrdim zubnim tkivima u procjeni dobi srne obične (*Capreolus capreolus* L.). Hrv. Vet. Vjesn. 26, 40-44.

ŠPAKULOVÁ, M., D. RAJSKÝ, J. SOKOL, M. VODŇANSKÝ (2003): Cicavica obrovská (*Fascioloides magna*). Významný pečeňový parazit prežúvavcov. PaRPRESS, Bratislava (in Slovak)

TAKAHATA, N., M. NEI (1990): Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. Genetics 124, 967‑978.

TAMURA, K, G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI, S. KUMAR (2013): Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725‑2729.

THREADGOLD, L. T. (1976): *Fasciola hepatica*: ultrastructure and histochemistry of the glycocalyx of the tegument. Exp. Parasitol. 39, 119-134.

TIBCO Software Inc. (2018): Statistica (data analysis software system), version 13. http://tibco.com.

TIZARD, R. (2013): Veterinary immunology, ninth edition. Elsevier Inc., Saunders, USA, pp. 102-112.

TROHAR, J. (2004): Jelen. U: Lovstvo (Mustapić, Z., ur.). Hrvatski lovački savez, Zagreb, str. 43-60.

TRUDGETT, A., A. T. MCNAIR, E. M. HOEY, P. S. KEEGAN, J. P. DALTON, B. K. RIMA, A. MILLER, P. RAMASAMY (2000): The major tegumental antigen of *Fasciola hepatica* contains repeated elements. Parasitology 121, 185-191.

ULLRICH, K. (1930): Über das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vögel in Böhmen und Mähren. Prag. Arch. Tiermed. 10, 19–43.

URSPRUNG, J., A. JOACHIM, H. PROSL (2006): Epidemiology and control of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in a population of wild ungulates in the Danubian wetlands east of Vienna. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 119, 316–323. (in German)

URSPRUNG, J., H. PROSL (2011): Vorkommen und Bekämpfung des Amerikanischen Riesenleberegels (*Fascioloides magna*) in den österreichischen Donauauen östlich von Wien 2000–2010. Wien Tierarztl. Monat. 98, 275–284. (in German).

VAN DER WALT, J. M., L. H. NEL, A. R. HOELZEL (2001): Characterization of major histocompatibility complex DRB diversity in the endemic South African antelope *Damaliscus pygargus*: a comparison in two subspecies with different demographic histories. Mol. Ecol 10, 1679–1688.

VICKOVIĆ, I. (2007): Metiljavost jelena običnog (*Cervus elaphus elaphus*) uzrokovana velikim američkim metiljem jetre (*Fascioloides magna*) u hrvatskim staništima i učinak terapije na promjenu patomorfoloških obilježja. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

WAGENKNECHT, E. (1984): Altersbestimmung des erlegten Wildes. Verlag J. Neumann-Neudamm, Melsungen, Germany.

WAGNER, J. L., R. C. BURNETT, R. STORB (1999): Organization of the canine major histocompatibility complex: Current perspectives. J. Hered. 90, 35-38.

WAKELIN, D., J. M. BLACKWELL (1993): Genetic variation in immunity to parasite infection. In: Immunology and molecular biology of parasitic infections (Warren, K. S., ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 3-22.

WARD, H. B. (1917): On the structure and classification of North American parasitic worms. J. Parasitol. 4, 1–12.

WINKELMAYER, R., H. PROSL (2001): Riesenleberegel—jetzt auch bei uns? Österreichisches Weidwerk 3, 42–44. (in German)

YUHKI, N., S. J. O'BRIEN (1997): Nature and origin of polymorphism in feline MHC class II DRA and DRB genes. J. Immunol. 158, 2822-2833.

ZAR, J. H. (1999): Biostatistical Analysis. 4th edition. Prentice Hall, New Jersey, 123 pp.

ZHANG, L., Q. WU, Y. HU, H. WU, F. WEI (2015): Major histocompatibility complex alleles associated with parasite susceptibility in wild giant pandas. Heredity 114, 85‑93.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Miljenko Bujanić	
Datum i mjesto rođenja	22. listopada 1988., Čakovec, Republika Hrvatska
Bračno stanje	Zaručen
Obrazovanje	
2015.-2018.	Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - Doktorski studij - doktorand na projektu "*Molekularna epidemiologija odabranih parazitiskih bolesti divljih životinja*"
2007.-2014.	Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu - Integrirani prediplomski i diplomski studij - Stručna sprema: DOKTOR VETERINARSKE MEDICINE
2003.-2007.	srednja škola Gimnazija Čakovec - Prirodoslovno matematički smjer
1995.-2003.	Osnovna škola Strahoninec
Radno iskustvo	
2015. - danas	Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu -Zavod za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju Doktorand na projektu "*Molekularna epidemiologija odabranih parazitiskih bolesti divljih životinja*"
2014.-2015.	Mesna industrija Vajda d.d. Čakovec Radno mjesto: tehnolog
Usavršavanje	
15.-17. studeni 2018.	*„Winter School of Research Commercialisation“*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
9.-20. srpanj 2018.	*Summer School for ECZM (WPH) Residents,* Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
31. srpanj – 11. kolovoz 2017.	Utrecht Summer School: „*Wildlife Population Health for Residents“*, Utrecht University, Netherlands

4.-13. travanj 2016.	University of Ljubljana, Veterinary Faculty - Institute of Pathology, Wild Animals, Fish and Bees - Institute for Poultry, Birds, Small Mammals and Reptiles

Veterinarski kongresi, seminari i radionice

10. listopad 2018.	*„Divokoza u Hrvatskoj: znanost u svrhu očuvanja vrste“*, radionica, Krasno
6. listopad 2018.	10. Slovenski lovski dan: *Šakal v Sloveniji in na Balkanu: stanje in upravljavski izzivi*, Koper, Slovenija - Pozvano predavanje: „*Prikaz parazitofaune čaglja u Hrvatskoj – otočna i kontinentalna populacija*“
23.-27. rujan 2018.	*„5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine -2018*“, Ohrid, Republic of Macedonia - Poster izlaganje: „*Gastrointestinal parasites of the red deer in Croatia – results of scat analysis and intestine examination*“ - Radionice: „*Basic Course of Dentistry – Periodontal Disease and Dental Prophylaxis“* *„Neurologic Examination – Let's Lokalize the Problem*“
11.-13. rujan 2018.	„*Biomarkers in Veterinary Medicine*“, radionica VetMedZg, Zagreb
7. lipanj 2018.	„*Uvod u društveno korisno učenje i priprema programa društveno korisnog učenja na VFZS*“, „Plavi projekt“, radionica, Zagreb
1.-2. prosinac 2017.	„*EAZA Academy recognized course: Infectious diseases, zoonoses and the One health concept in Zoo and wild animals*“, Palić, Serbia
20.-22. studeni 2017.	*„Wildlife medicine: Epidemiology*”, VetMedZg, Zagreb - sudjelovanje u organizaciji i pohađanje radionice
5.-7. listopad 2017.	*7th International Congress "Veterinary Science and Profession"*, Zagreb - Usmeno izlaganje: „*Artificial insemination of capercaillie (Tetrao urogallus* L.) - Poster izlaganje na Danu doktorata: „*Three different types of hosts for Fascioloides magna in wild animals*“

20.-22. travanj 2017.	"*Second Croatian Rural Parliament - By cooperating to full development*", Međimurje, Sveti Martin na Muri - Poster izlaganje: "*The possibility of interpolation of farmed breeding of red deer, cattle and sweet potato on the family farm"*
25.-26. studeni 2016.	*EAZA Academy- conference and training: "Anaesthesia and monitoring of wild and zoo animals, Anaesthesia vs. medical training*", Palić, Serbia
26.-29. listopad 2016.	"*6th Croatian Veterinary Congress with International Participation*", Opatija - Usmeno izlaganje: "*Environmental factors and their influence on the occurrence of fascioloidosis at "Podunavlje-Podravlje" hunting ground*" - Usmeno izlaganje: "*Monitoring of the capercaillie (Tetrao urogallus) breeding season – preliminary results"*
13.-15- lipanj 2016.	*Wildlife medicine: Parasitic diseases",* VetMedZg, Zagreb - sudjelovanje u organizaciji i pohađanje radionice
17.-20. svibanj 2016.	*3rd INTERNATIONAL "VETISTANBUL GROUP CONGRESS 2016*", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina - Poster presentation: "*Variability of major histocompatibility complex class II DRB1 locus in wild boar (Sus scrofa L.) from Croatia – preliminary observations*"
12.-13. svibanj 2016.	"*Intellectual property management in support of innovation*", radionica VetMedZg, Zagreb
14. travanj 2016.	"*NATURE AND WILDLIFE*", scientific and professional conference with international participation, Karlovac - Usmeno izlaganje: "*Results of parasitological analysis of roe deer (Capreolus capreolus L.*) *gastrointestinal system*"
9.-11. prosinac 2015.	"*Post-genomic era of molecular biology - Proteomics era I*", radionica VetMedZg, Zagreb
27. listopad 2015.	"*Technologies and Solutions in Genomics, Proteomic Research and Cell Biology*", stručni seminar, Rijeka
1.-2. listopad 2015.	„*Veterinary science and profession*", 6th International Congress, Zagreb - Usmeno izlaganje: "*Rezultati parazitoloških analiza izmeta divljih svinja skupljenih u parku prirode Medvednica*"

6. svibanj 2015.	„*Technologies and techniques in Life Science Research*“, stručni seminar, Zagreb
3.-4. travanj 2013.	„*Improving nitrogen efficiency on diary farms*“, International Conference, Zagreb

Radovi objavljeni u CC časopisima

SINDIČIĆ, M., M. BUJANIĆ, I. ŠTIMAC, F. MARTINKOVIĆ, N. TUŠKAN, M. ŠPEHAR, D. KONJEVIĆ (2018): First identification of *Echinococcus multilocularis* in golden jackals in Croatia. Acta parasitologica. 63, 654-656.

ARBANASIĆ, H., D. KONJEVIĆ, L. VRANKOVIĆ, M. BUJANIĆ, S. STIPOLJEV, M. BALAŽIN, N. ŠPREM, D. ŠKORIĆ, A. GALOV (2018): Evolution of MHC class II SLA-DRB1 locus in the Croatian wild boar (*Sus scrofa*) implies duplication and weak signals of positive selection. Animal Genetics, DOI.ORG/10.1111/age.12734

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, V. ERMAN, A. GUDAN KURILJ, T. ŽIVIČNJAK, K. SEVERIN, S. TOMIĆ, F. MARTINKOVIĆ (2017): New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). Helminthologia. 54, 77-80.

SINDIČIĆ, M., F. MARTINKOVIĆ, T. STRIŠKOVIĆ, M. ŠPEHAR, I. ŠTIMAC, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*. Journal of helminthology. 91, 637-641.

Radovi objavljeni u drugim časopisima

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, J. GRBAVAC, D. KONJEVIĆ (2018): Primjena inkrementnih linija u tvrdim zubnim tkivima u procjeni dobi srne obične (*Capreolus capreolus* L.). Hrv. Vet. Vjesnik, 26, 40-44.

HUMSKI, A., D. CVITKOVIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ, G. BAČIĆ, N. RUDAN, M. PAVLAK (2018): Influence of different dairy farming systems on milk quality and production. Veterinarska stanica. 49, 169-177.

TRUPEC, T., M. BUJANIĆ, I. BOŠKOVIĆ, T. FLORIJANČIĆ, S. OZIMEC, M. VODANOVIĆ, D. ŽELJEŽIĆ, J. GRBAVAC, Z. PECIREP, D. KONJEVIĆ (2018): Zubna patologija čaglja (*Canis aureus* L.). Hrvatski veterinarski vjesnik 26, 36-41.

BUJANIĆ, M., S. LUČINGER, I. ŠTIMAC, F. MARTINKOVIĆ, V. ERMAN, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, T. ŽIVIČNJAK, K. KRAPINEC, D. KONJEVIĆ (2017): Nalaz jajašaca oblića Metastrongylus sp. u izmetu divljih svinja (*Sus scrofa* L.). Hrvatski veterinarski vjesnik. 25, 40-45.

BUJANIĆ, M., S. LUČINGER, I. ŠTIMAC, F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, N. ŠPREM, T. ŽIVIČNJAK, D. KONJEVIĆ (2017): Preliminarni rezultati parazitološke pretrage izmeta čagljeva s poluotoka Pelješac. Veterinarska stanica, 48, 101-108.

MARTINKOVIĆ, F., M. SINDIČIĆ, S. LUČINGER, I. ŠTIMAC, M. BUJANIĆ, T. ŽIVIČNJAK, D. STOJČEVIĆ JAN, N. ŠPREM, R. POPOVIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): Endoparasites of wildcats in Croatia. Veterinarski arhiv 87, 713-729.

BUJANIĆ, M., M. VILIĆ, Ž. GOTTSTEIN, J. PEJAKOVIĆ HLEDE, I. ŽURA ŽAJA, M. LOJKIĆ (2016): Učinak gama zračenja na pokretljivost i preživljavanje spermija pijetlova teške pasmine. Veterinarska stanica 47, 441-446.

KARAĐOLE, M., F. ADAMIĆ, M. BUJANIĆ, K. MATANOVIĆ, D. KONJEVIĆ (2016): Prisutnost bakterije *Erysipelothrix rhusiopathiae* u populaciji divljih svinja s dva lokaliteta – preliminarni rezultati. Veterinar 54, 2-8.

KONJEVIĆ, D., T. ŽIVIČNJAK, F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ, D. CVITKOVIĆ, M. BUJANIĆ, M. PAVLAK (2015): Primjena molekularne epidemiologije u proučavanju parazitskih bolesti divljih životinja. Veterinarska stanica 46, 381-388.

BUJANIĆ, M., D. KONJEVIĆ (2015): MHC geni klase II – raznolikost i primjena u istraživanju divljih životinja. Hrvatski veterinarski vjesnik 23, 42-48.

Radovi / sažeci u zbornicima skupova

BUJANIĆ, M., F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ, I. ŠTIMAC, A. SLAVICA, I. BOŠKOVIĆ, T. FLORIJANČIĆ, N. ŠPREM, D. KONJEVIĆ (2018): Prikaz parazitofaune čaglja u Hrvatskoj - otočna i kontinentalna populacija. Zbornik izvlečkov 10. slovenski lovski dani. Pokorny, Boštjan ; Kmetec, Urša (ur.). Koper: Lovska zveza Slovenije, 17-18.

BUJANIĆ M., Z. JANICKI, F. MARTINKOVIĆ, S. LUČINGER, N. PAILLOUX, D. KONJEVIĆ (2018): Gastrointestinal Parasites of the Red Deer in Croatia - Results of Scat Analysis and Intestine Examination. Book of Abstracts *5th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine - 2018*, Ohrid, p. 165.

KONJEVIĆ D., M. BUJANIĆ, N. ŠKVORC, K. KRAPINEC, A. GUDAN KURILJ (2018): Ovarian Carcinoma in a Roe Deer (*Capreolus Capreolus* L.). Book of Abstracts *5th International Scientific Meeting Days of Veterinary Medicine - 2018*, Ohrid, p. 98.

ŠIFTAR, O., L. PINCAN, M. ŠUBREK, A. ZUPČIĆ, M. PRIŠLIN, L. VRANKOVIĆ, I. DELAŠ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ, Z. STOJEVIĆ, J. ALADROVIĆ (2018): Masnokiselinski sastav potkožnog i abdominalnog masnog tkiva sivog puha (*Glis glis*). Book of Abstracts of 6th International Congress of Nutritionists. Babić Cikoš, Dora (ur.). Zagreb, str. 171.

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, A. BECK, T. ŽUGLIĆ, Z. JANICKI (2018): New data on roe deer as aberrant host of *Fascioloides magna*. Proceedings of scientific contributions and abstracts. Prokeš, Marian (ur.). Košice, p. 42.

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, M. ORŠANIĆ, Z. JANICKI (2018): Mogućnosti suzbijanja fascioloidoze jelena u otvorenom lovištu. *Vaterinarski dani 2018*. Harapin, Ivica (ur.). Opatija : Hrvatska veterinarska komora ; Veterinarski fakultet u Zagrebu, 315-323.

SVETLIČIĆ, I., H. ARBANASIĆ, D. KONJEVIĆ, L. VRANKOVIĆ, M. BUJANIĆ, S. STIPOLJEV, M. BALAŽIN, N. ŠPREM, A. GALOV (2018): Variability and duplication of MHC class II DRB1 locus in the Croatian wild boar (*Sus scrofa*). Abstracts of 3rd Annual Meeting in Conservation genetics. Beč, p. 78.

BUJANIĆ, M., Ž. GOTTSTEIN, M. LUKAČ, I. KRIŽ, M. LOJKIĆ, D. HORVATEK TOMIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): Artificial insemination of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.). Book of Abstracts *7th International Congress "Veterinary science and profession"*. Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, p. 75.

SABOL, Ž., M. SINDIČIĆ, M. BUJANIĆ, F. MARTINKOVIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): First identification of the nematodes *Setaria tundra* in roe deer in Croatia by molecular method. Book of abstracts *7th International Congress "Veterinary Science and profession*". Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, p. 119.

VELČIĆ, E., L. VRANKOVIĆ, D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, I. DELAŠ, Z. STOJEVIĆ, J. ALADROVIĆ (2017): Fatty acid composition of different tissues of Indian small mongoose (*Herpestes auropunctatus*) in Croatia. Book of Abstracts *7th International Congress "Veterinary science and profession*". Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, p. 116.

SINDIČIĆ, M., F. MARTINKOVIĆ, M. BUJANIĆ, N. TUŠKAN, M. ŠPEHAR, D. KONJEVIĆ (2017): Morphological and molecular identification of golden jackal intestinal parasite. Book of abstracts *7th International Congress "Veterinary science and profession*". Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, p. 77.

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, LJ. BARBIĆ, D. UGARKOVIĆ, M. LUKAČ, B. ARTUKOVIĆ (2017): Fibropapillomatosis in a male mouflon (*Ovis musimon*) - a case report. Book of Abstracts *7th International Congress "Veterinary Science and Profession"*. Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Veterinarski fakultet Sveučilište u Zagrebu, p. 74.

BUJANIĆ, M., D. KONJEVIĆ (2017): Three different types of hosts for *Fascioloides magna* in wild animals. Book of abstracts *7th International Congress "Veterinary Science and profession*". Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, p. 168.

ANČIĆ, S., N. M. AUGUŠTIN, L. VRANKOVIĆ, I. DELAŠ, J. KUSAK, D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, S. RELJIĆ, Đ. HUBER, Z. STOJEVIĆ, J ALADROVIĆ (2017): Comparison of fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue of grey wolf and Indian small mongoose in Croatia. Book of Abstracts *7th International Congress "Veterinary science and profession"*. Brkljača Bottegaro, Nika ; Zdolec, Nevijo ; Vrbanac, Zoran (ur.). Zagreb : Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, p. 120.

ARBANASIĆ, H., A. GALOV, L. VRANKOVIĆ, S. STIPOLJEV, N. ŠPREM, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): Comparison of the PCR methods for assessing variability of Major Histocompatibility Complex class II DRB1 locus in wild boar (*Sus scrofa* L.) from Croatia. Proceedings: *3rd International Conference on avian, herpetological and exotic mammal medicine,* Milano, p. 820.

ARBANASIĆ, H., A. GALOV, Ž. PAVLINEC, L. VRANKOVIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2017): Preliminary study on variability of MHC class II DRB1 locus in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from Croatia. Book of Abstracts – *52nd Croatian and 12th International Symposium on Agriculture*, Dubrovnik. Faculty of Agriculture in Osijek, Osijek, p. 173.

KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, M. SINDIČIĆ, M. ŠIMUNOVIĆ, Z. JANICKI, A. SLAVICA, K. SEVERIN, D. DEGMEČIĆ, K. KRAPINEC, (2016): Environmental factors and their influence on the occurrence of fascioloidosis at the ‘’PODUNAVLJE-PODRAVLJE hunting ground. Zbornik radova / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora i Veterinarski fakultet u Zagrebu, 311-317.

BUJANIĆ, M., M. BAGARIĆ, I. KRIŽ, D. KONJEVIĆ (2016): Monitoring of the capercaillie (*Tetrao urogallus*) breeding season-preliminary results. Zbornik radova / Harapin, Ivica (ur.). Zagreb: Hrvatska veterinarska komora i Veterinarski fakultet u Zagrebu, 347-354.

SINDIČIĆ, M., M. ŠPEHAR, T. STRIŠKOVIĆ, I. ŠTIMAC, M. BUJANIĆ, F. MARTINKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, D. KONJEVIĆ (2016): Molecular identification of *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* in red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. Contributions to the 12th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA) / Schumann, Anke ; Wibbelt, Gudrum ; Greenwood, Alex D. ; Hofer, Heribert (ur.). Berlin, Germany: Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Reserch, p. 194.

STARČEVIĆ, K., K. SEVERIN, M. BUJANIĆ, F. MARTINKOVIĆ, D. KONJEVIĆ, M. MAURIĆ, I. STOLIĆ, T. MAŠEK, (2016): GC-MS based metabolomic study of *Fascioloides magna* and Red deer (*Cervus elaphus*) tissues important for parasite feeding. 5th International Hunting and Game Management Symposium / Kusza, Szilvia ; Javor, Andras (ur.). Deberecen: University of Debrecen, Hungarian Chamber of Agriculture, p. 42.

ARBANASIĆ, H., A. GALOV, L. VRANKOVIĆ, S. STIPOLJEV, N. ŠPREM, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2016): Variability of major histocompatibility complex class II DRB1 locus in wild boar (*Sus scrofa* L.) from Croatia – preliminary observations. Book of abstracts *3rd International Vetistanbul group Congress 2016*. Veterinary Faculty in Sarajevo, Sarajevo, Bosna and Herzegovina, p. 213.

BUJANIĆ, M., F. MARTINKOVIĆ, T. ŽIVIČNJAK, S. LUČINGER, M. SINDIČIĆ, K. SEVERIN, K. KRAPINEC, D. KONJEVIĆ (2016): Results of parasitological analysis of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) gastrointestinal system. Book of Abstracts *NATURE AND WILDLIFE – The challenge of wildlife management in 21st century*. Karlovac University of Applied Sciences, Karlovac, 12-13.

BUJANIĆ, M., S. LUČINGER, T. ŽIVIČNJAK, F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ, K. KRAPINEC, D. RAČIĆ, M. PAVLAK, D. KONJEVIĆ (2015): The results of parasitological analysis of wild boar faeces collected at Nature Park Medvednica – preliminary results. Book of Abstracts the 6th International Congress "Veterinary Science and Profession" (Horvatek Tomić, D., Severin, K., Slavica, A., eds). Zagreb, The Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, p. 57

BALAŽIN, M., H. ARBANASIĆ, A. GALOV, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2015): Variability of major histocompatibility complex class II DRB1 gene in wild boar (*Sus scrofa*) from Medvednica. Book of Abstracts the 6th International Congress "Veterinary Science and Profession" (Horvatek Tomić, D., Severin, K., Slavica, A., eds). Zagreb, The Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, p. 97.

10. PRILOG

Tablica 15. Početnice i barkodovi.

PRIMER LABEL	BARCODE NAME	A ADAPTER	BARKODA	LINKER	MHC	PRIMER FOR PCR
CE-MHC-LA31-BAR51	IonXpress_51	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGAGCCTATTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGAGCCTATTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR52	IonXpress_52	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CCGCATGGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCGCATGGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR1	IonXpress_1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTAAGGTAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR2	IonXpress_2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAAGGAGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR3	IonXpress_3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGGATTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR4	IonXpress_4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACCAAGATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR5	IonXpress_5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGAAGGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR6	IonXpress_6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTGCAAGTTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR7	IonXpress_7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCGTGATTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR8	IonXpress_8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCCGATAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCGATAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR9	IonXpress_9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGAGCGGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR10	IonXpress_10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTGACCGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR11	IonXpress_11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCCTCGAATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCTCGAATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR12	IonXpress_12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAGGTGGTTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR13	IonXpress_13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTAACGGAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR14	IonXpress_14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGAGTGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR15	IonXpress_15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTAGAGGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR16	IonXpress_16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTGGATGAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR17	IonXpress_17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTATTCGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTATTCGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR18	IonXpress_18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGGCAATTGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGGCAATTGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR19	IonXpress_19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTAGTCGGAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTAGTCGGACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR20	IonXpress_20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CAGATCCATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGATCCATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR21	IonXpress_21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGCAATTAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGGCAATTACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR22	IonXpress_22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCGAGACGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGAGACGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR23	IonXpress_23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGCCACGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCCACGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR24	IonXpress_24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACCTCATTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCTCATTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR25	IonXpress_25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CCTGAGATAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCCTGAGATACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT

CE-MHC-LA31-BAR26	IonXpress_26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTACAACCTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTACAACCTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR27	IonXpress_27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AACCATCCGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAACCATCCGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR28	IonXpress_28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ATCCGGAATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCCGGAATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR29	IonXpress_29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGACCACTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGACCACTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR30	IonXpress_30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGAGGTTATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGGTTATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR31	IonXpress_31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCCAAGCTGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCCAAGCTGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR32	IonXpress_32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTTACACAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTTACACACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR33	IonXpress_33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCTCATTGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCTCATTGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR34	IonXpress_34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCGCATCGTTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGCATCGTTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR35	IonXpress_35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAAGCCATTGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGCCATTGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR36	IonXpress_36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGGAATCGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGGAATCGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR37	IonXpress_37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTTGAGAATGTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGAGAATGTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR38	IonXpress_38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGAGGACGGAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGGACGGACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR39	IonXpress_39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAACAATCGGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAACAATCGGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR40	IonXpress_40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTGACATAATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACATAATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR41	IonXpress_41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTCCACTTCGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCCACTTCGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR42	IonXpress_42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AGCACGAATC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACGAATCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR43	IonXpress_43	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CTTGACACCGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTTGACACCGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR44	IonXpress_44	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TTGGAGGCCAGC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGGCCAGCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR45	IonXpress_45	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TGGAGCTTCCTC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGGAGCTTCCTCGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT
CE-MHC-LA31-BAR46	IonXpress_46	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCAGTCCGAAC	GAT	GATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCAGTCCGAACGATGATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCCT