

ANALIZA COX-1 GENA METILJA FASCIOLOIDES MAGNA S RAZLIČITIH PODRUČJA

Posavec, Eva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:744197>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Eva Posavec

**ANALIZA COX-1 GENA METILJA *FASCIOLOIDES MAGNA*
S RAZLIČITIH PODRUČJA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za lovstvo i divlje životinje te na Zavodu za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnica Zavoda za lovstvo i divlje životinje: izv. prof.. dr. sc. Magda Sindičić

Predstojnik Zavoda za veterinarsku ekonomiku i epidemiologiju: doc. dr. sc. Denis Cvitković

Mentori:

izv. prof.. dr. sc. Magda Sindičić

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

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Zdravko Janicki

2. izv. prof. dr. sc. Magda Sindičić

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

4. izv. prof. dr. sc. Tomislav Gomerčić (zamjena)

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. JELEN OBIČNI (<i>Cervus elaphus</i>)	2
2.2. VELIKI AMERIČKI METILJ (<i>Fascioloides magna</i>)	4
2.2.1. Morfološke značajke	4
2.2.2. Razvojni ciklus.....	6
2.2.3. Klinička slika i patološke promjene.....	8
2.2.4. Dolazak i širenje u Europi.....	10
2.3. COX-1 GEN	12
3. MATERIJALI I METODE	14
4. REZULTATI.....	17
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČCI.....	22
7. POPIS LITERATURE	23
8. SAŽETAK.....	28
9. SUMMARY	29
10. ŽIVOTOPIS	30

Zahvale:

Zahvaljujem svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Magdi Sindičić i izv. prof. dr. sc. Deanu Konjeviću, Dipl. ECZM na vodstvu, trudu i stručnim savjetima pri izradi ovog rada.

Također, zahvalila bih i dr. sc. Miljenku Bujaniću na nesebičnoj pomoći i pristupačnosti tijekom izrade rada te Silviji Blašković, dr. med. vet. na pomoći u laboratoriju.

Zahvaljujem se i dr. sc. Jovanu Mirčeti, dr. sc. Dejanu Bugarskom i doc. dr. sc. Andrew Davidu na dostavljenim uzorcima metilja.

*Rad je u cijelosti financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt IP 8963 "Interakcija nositelj - parazit: odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*".*

Na kraju, posebne zahvale idu mojoj obitelji na razumijevanju, strpljenju i podršci tijekom svih ovih godina studiranja te prijateljima koji su mi studentske dane učinili ljepšim i lakšim.

POPIS PRILOGA:

Slika 1. Jelen obični (*Cervus elaphus*)

Slika 2. *Fascioloides magna*

Slika 3. Razvojni ciklus metilja *F. magna*

Slika 4. Invadirana jetra jelena običnog

Slika 5. Europska žarišta invazije metiljem *F. magna*

Slika 6. Mitohondrijski genom metilja *F. magna*

Slika 7. Broj prikupljenih uzoraka jelena običnog na području Hrvatske, po županijama

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Prikupljeni uzorci jelena običnog (*Cervus elaphus*)

Tablica 2. Pripadnost pojedinog uzorka određenom haplotipu

Tablica 3. Haplotipovi utvrđeni u slijedovima *cox-1* gena jelena običnog iz Hrvatske, Srbije i

SAD-a

1. UVOD

Dolazak novih, nezavičajnih parazita u do tada neinvadirane populacije može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema. Upravo takav primjer nalazimo u unosu velikog američkog metilja (*Fascioloides magna*) u Europu. Ovaj metilj se danas smatra invazivnom vrstom u Europi, a pored toga ima i veliki potencijal invadiranja različitih nositelja, kao i širenja u nova geografska područja. Pored svega toga, invazije, posebice u fazi migracije mladih metilja po jetri nositelja, mogu uzrokovati i teška oštećenja tkiva, slabljenje životinje, a u nekih vrsta i uginuće. Praćenje promjena u odnosu parazit - nositelj mogu nam ukazivati na moguće prilagodbe, primarno nositelja, ali i upućivati na mogućnosti kontrole bolesti na određenom području. Pored toga, utvrđene promjene na molekularnom nivou mogu nam ukazivati na buduće trendove, a isto tako nam ukazati i na povezanost pojedinih geografskih područja i divljači koja na njima obitava. Prva istraživanja *cox-1* i *nad-1* gena metilja *Fascioloides magna* provedena su s ciljem utvrđivanja podrijetla metilja kao i za razumijevanje smjera kolonizacije staništa u Europi. Iako su do sada već provedena istraživanja ovih gena u Hrvatskoj, ona su provedena na uzorcima metilja prikupljenima na jednom lokalitetu, smještenom neposredno uz rijeku Dunav. Istodobno, metilji podrijetlom iz Srbije do sada nisu analizirani. Iz navedenoga razloga u ovome istraživanju analizirani su uzorci s većeg dijela današnjeg područja rasprostiranja metilja *F. magna* u Hrvatskoj, kao i uzorci metilja iz područja Vojvodine u Srbiji. U sklopu međunarodne suradnje prikupljeni su i uzorci iz SAD-a, područja uz New York (Ontario) za usporedbu.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. JELEN OBIČNI (*Cervus elaphus*)

Jelen obični naša je zavičajna divljač koju ubrajamo u koljeno svitkovca (Chordata), potkoljeno kralježnjaka (Vertebrata), razred sisavaca (Mammalia), podrazred plodvaša (Placentalia), red parnoprstaša (Artiodactyla), podred preživača (Ruminantia), porodicu jelena (*Cervidae*), potporodicu pravih jelena (*Cervinae*), rod jelena (*Cervus*) te vrstu jelen obični (*Cervus elaphus*) (JANICKI i sur., 2007.).

U Hrvatskoj jelen obični je najviše rasprostranjen u nizinskom staništu u šumama uzduž rijeke Dunava, Drave i Save, zatim u gorskim predjelima Gorskog kotara, Velike i Male Kapele, nešto manje na Velebitu i Ličkoj Plješevici, te u mediteranskom staništu u dijelu Hrvatskog primorja i u Istri (TROHAR, 2004.). Prema Zakonu o lovstvu ubraja se u krupnu divljač zaštićenu lovostajem (ANONIMUS, 2018a.).

Mužjak jelena običnog naziva se jelen, ženka košuta, a mlado oba spola od teljenja do kraja ožujka druge kalendarske godine tele ili jelenče. Kasnije se mladi mužjaci do čišćenja prvih rogova nazivaju jelenčići, a ženke do prvog teljenja košutice (JANICKI i sur, 2007.). Jeleni su životinje s razvijenima društvenim nagonom te žive u krdima. Pri tome razlikujemo dva tipa krda, prvo čine košuta s teladi i jedno do dvogodišnjim jelenima te njih vode košute. Drugi tip čine jeleni ostalih dobi, a vode ih mladi jeleni. Stari jeleni žive samostalno, izvan krda (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.).

Tjelesna masa mužjaka iznosi 125 do 250, iznimno 300 kg, a ženke od 70 do 150 kg. Tijekom proljeća i u jesen dlaka je rđasto - crvene boje, osim po trбуhu gdje je bjelkasta, a zimi bude gušća, dulja i tamno smeđa do smeđe-siva. Jedino mužjaci imaju vrat obrastao grivom i nose rogovlje. Ciklus rasta rogovlja sastoji se od 4 faze: rasta, okoštavanja, skidanja čupe te odbacivanja roga. Rogovlje otpada svake godine, a nakon odbacivanja odmah počne rasti novo. Osjetila sluha, njuha, vida i okusa su dobro razvijena. Oba spola imaju na vanjskoj strani skočnog zgloba mirisnu žlijezdu, a kod mužjaka se ona još nalazi i na korijenu repa, dok je kod ženke na čelu (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.; JANICKI i sur., 2007.).

Jelen obični ubraja se u preživače i hrani se uglavnom zelenim biljem s naglaskom na pašnoj ishrani, ali jede i tanje grančice, pupove, izbojke te plodove raznog voća i šumskog drveća. Hrani se u više navrata, obično kasno navečer, po noći, tijekom ranog jutra i popodne.

Zubalo sadrži 34 zuba, a ono se u potpunosti izgradi tek u trećoj godini života (CAR, 1967.; DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.). Parenje jelena naziva se rika, ono počinje krajem kolovoza ili početkom rujna i traje od 5 do 6 tjedana. Mjesta parenja nazivaju se rikališta i obično su to čistine unutar šume ili neke gorske livade. Košute nose mlado od 230 do 240 dana, a telad siše od 3 do 4 mjeseca i osamostali se s 9 do 12 mjeseci života. Životni vijek im je od 15 do 20 godina (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.; JANICKI i sur., 2007.).



Slika 1. Jelen obični (*Cervus elaphus*) (izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cervus_elaphus_-_Salbur%C3%BAa.jpg)

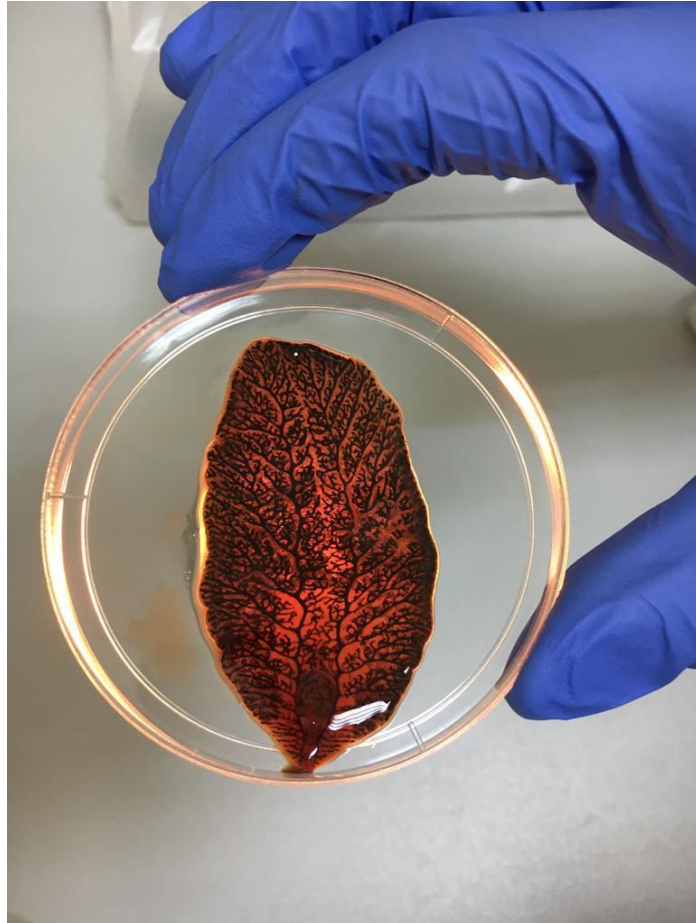
2.2. VELIKI AMERIČKI METILJ (*Fascioloides magna*)

2.2.1. Morfološke značajke

Veliki američki metilj (sin. veliki jetreni metilj ili jelenski metilj) (*Fascioloides magna*) jetreni je parazit mnogih divljih i domaćih preživača (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.; MA i sur., 2016.). Duljina odraslog metilja doseže od 4 do 10 cm, širina od 2 do 3,5 cm, a debljina se kreće od 2 do 4,5 mm te se ubraja u najveće svjetske metilje (ERHARDOVÁ, 1961.) Dorzoventralno je spljošten, ovalan ili oblika lista te neseegmentiran i bilateralno simetričan (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.).

Na površini tijela nalazi se kutikula sa sitnim bodljama koje nedostaju na prednjem dijelu tijela (ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). Prednji dio tijela je blago zašiljen s tupim završetkom, a stražnji je zaobljen. Ima dvije siske, usnu koja se nalazi na prednjem dijelu i služi za hranjenje te trbušnu koja je na stražnjem ventralnom dijelu tijela i služi za prihvaćanje (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.).

Mladi metilji su crvene boje koja je odraz sadržaja crijeva, dok su odrasli sivkasti zbog prosijavanja spolnih organa koji su ispunjeni jajašcima žute boje (ANONIMUS, 2018b). Imaju razvijen zatvoreni probavni sustav sastavljen od usnog otvora, ždrijela, jednjaka te slijepog crijeva (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Odrasli metilji sadrže i muške i ženske spolne organe, drugim riječima ovi metilji su hermafroditi i imaju zajednički otvor za oba spolna sustava. Muški spolni sustav sastoji se od dva razgranata testisa, sjemenovoda i kopulacijskog organa. Ženski spolni sustav sastavljen je od jajnika, jajovoda, proširenja u kojem se pohranjuju spermiji, ootipa te uterusa. Izmjena genskog materijala obično se odvija između dvije jedinice, no moguća je i samooplodnja (CHEN i MOTT, 1990.; JONES, 2005.; FLORIJAČIĆ, 2006.). Jajašca su fascioloidnog tipa, zlatnosmeđa i ovalna te imaju operkulum koji ih razlikuje od jajašca metilja *Fasciola hepatica*.(ANONIMUS, 2018b).



Slika 2. *Fascioloides magna* (foto E. Posavec)

2.2.2. Razvojni ciklus

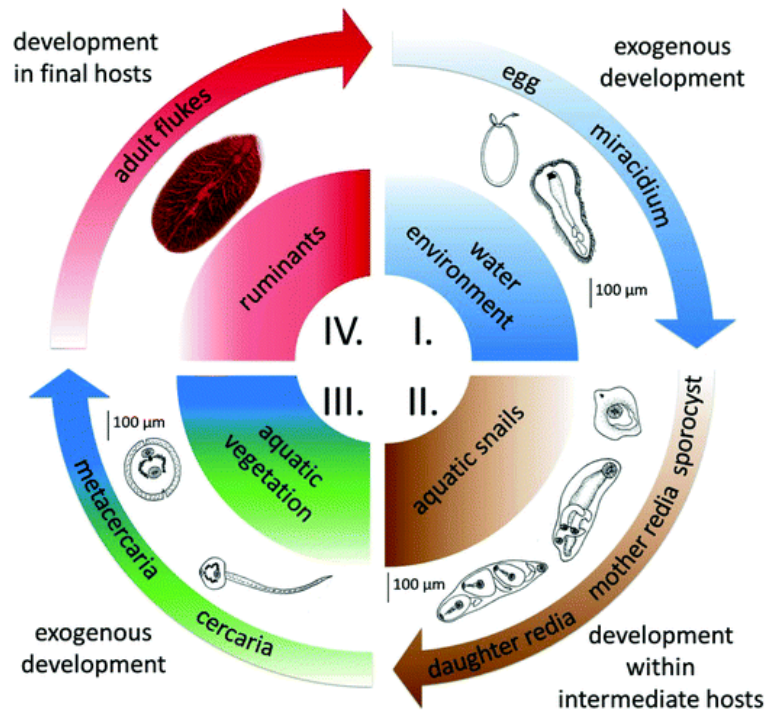
Veliki američki metilj ima složeni razvojni ciklus podijeljen u četiri faze. Odrasli metilj smješten je u pseudocisti unutar jetre tipičnog nositelja i dnevno izlučuje i do 4000 jajašca (SWALES, 1935.). Jajašca putem žučnih kanalića dolaze u tanko crijevo i izmetom budu izbačena u okolinu (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.).

U prvoj fazi ciklusa, koja se odvija u vodenoj sredini, dolazi do embrioniranja jajašca. Završetkom embrioniranja, koje traje oko 35 dana, nastaje stadij ličinke ili miracidij (SWALES, 1935.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Duljina ove faze ovisi o vlazi i temperaturi, pa tako što su temperature niže embrioniranje će biti dulje (PYBUS, 2001.). Po izlasku iz jajašca, trepetljikava i jako pokretna ličinka zvana miracidij aktivno traži posrednika, kojega pretežito nalazi u pužu barnjaku (*Lymnaea truncatula*), ali u novije vrijeme su potvrđeni i drugi posrednici poput primjerice puža *Radix peregra* (FALTYNKOVÁ i sur., 2006.). Ako miracidiji, tijekom maksimalno dva dana, ne nađu posrednika gube energiju i ugibaju (ERHARDOVÁ, 1961.; PYBUS, 2001.).

Druga faza odvija se unutar posrednika te nastaje novi razvojni stadij koji se naziva sporocista te se one nalaze posvuda u tijelu puža. Nakon toga se iz svake sporociste razvija jedna majka redija, a iz svake majke redije nastaje četiri do šest redija kćeri. Konačno, iz svake redije kćeri nastaje najčešće oko šest cercarija (ERHARDOVÁ, 1961.; ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.). Cercarije putuju u spolne ograde i hepatopankreas gdje završavaju razvoj i nakon toga napuštaju posrednika.

Dolaskom u vanjsku sredinu započinje treći stadij razvoja. Cercarije, kao slobodno živeći larvarni stadij, nakon napuštanja puža plivaju do vodenog bilja te se začahure i nastane stadij metacercarija. Metacercarije predstavljavaju invazivni stadij za nositelje kod kojih uzrokuju bolest koja se naziva fascioloidoza. One ostanu invazivne na vodenom bilju do dva i pol mjeseca i čekaju da ih pojedu preživači (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971.; SCHWARTZ i sur. 1993.).

Zadnji stadij razvoja odvija se u konačnom nositelju nakon što metacercarije uđu u probavni sustav hranom. Ličinke se tada aktiviraju, probuše stijenku crijeva, putuju preko peritonealne šupljine do jetre. Buše Glisonovu čahuru ulaze u tkivo jetre gdje polako rastu i razvijaju se u odrasle jedinice (PYBUS, 2001.).



Slika 3. Razvojni ciklus metilja *Fascioloides magna* (izvor: KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2016)).

2.2.3. Klinička slika i patološke promjene

Klinička slika i patološke promjene uzrokovane fascioloidozom ovise o tipu nositelja, kojih u Europi razlikujemo tri - tipični, aberantni i nositelj tipa slijepa ulica. Kod tipičnih nositelja, kao što su jelen obični (*Cervus elaphus*) i jelen lopatar (*Dama dama*), uglavnom nema značajnijih kliničkih znakova invazije, iako je jelen lopatar nešto osjetljiviji (SWALES, 1935. GRIFFITHS, 1962; FOREYT i TODD, 1976.). Uglavnom se javlja slabiji apetit, bezvoljnost, anemija, depresija i posljedično gubitak tjelesne mase, a ponekad može doći i do uginuća (FOREYT, 1992.; 1996.; BALBO i sur., 1987.). Od patoloških promjena dolazi do zadebljanja rubova jetre, fibroznih priraslica po serozi te je cijela jetra povećana zbog fibroznih inkapsuliranih pseudocista ispunjenih zrelih metiljima. Pseudociste različitih veličina ispunjene su smeđom mukoznom tekućinom, a po površinu jetre su naslage fibrina te difuzno raspoređen tamni pigment (PYBUS, 2001.; KARAMON i sur., 2015.). Taj pigment je zapravo željezo porfirin koji potječe iz crijeva metilja kao nusprodukt razgradnje krvi te je karakterističan samo za metilje vrste *Fascioloides magna* (CAMPBELL, 1960.; BLAŽEK I GLIKA, 1970.; CHROUST, 1987.). Do stvaranja pseudocista dolazi kao odgovor nositelja na metilja koji je završio migraciju. Rastom pseudocisti, odnosno nakupljanjem sve više tamno zelene tekućine, zbog pritiska povećane pseudociste dolazi do atrofije okolnog jetrenog tkiva (SWALES, 1935.; PYBUS, 2001.). Komunikacija između pseudocista i vanjskog okoliša ide tako da jajašca metilja zajedno s raspadnim produktima metabolizma izlaze iz pseudociste i ulaze u žučovod, iz njega dalje u cijevno te konačno izmetom u okoliš (CONBOY i STROMBERG, 1991.).

U slučaju aberantnih nositelja, u koje se na našem području ubraja muflon (*Ovis musimon*) i srna obična (*Capreolus capreolus*) te potencijalno divokoza (*Rupicapra rupicapra*), najčešće izostaje stvaranje pseudocista te mladi metilj migracijom po jetri uzrokuje snažna oštećenja i uginuće nositelja (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.). U novijim istraživanjima utvrđena je mogućnost preživljenja invazije kod srneće divljači, što ukazuje na potencijalne promjene u odnosu nositelj-parazit i međusobne prilagodbe (KONJEVIĆ i sur., 2021.).

Kod nositelja tipa slijepa ulica, to jest divljih (*Sus scrofa*) i domaćih svinja, goveda i konja, nastaje debela fibrozna stijenka pseudociste te je zbog toga metilj u njoj u potpunosti izoliran (PYBUS, 2001.). Od morfoloških znakova invazije dolazi do tamne pigmentacije u različitim organima (ŠPAKULOVÁ i sur., 2003.). Klinički znakovi u pravilu izostaju jer dolazi

do uginuća metilja unutar debele pseudociste te nema izlučivanja jajašaca u okoliš. U nositeljima tipa slijepa ulica i aberantnim nositeljima ciklus razvoja završava te nije dokazano izlučivanje jajašca u okolinu (BUJANIĆ, 2019.).



Slika 4. Invadirana jetra jelena običnog (foto: D. Konjević, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet)

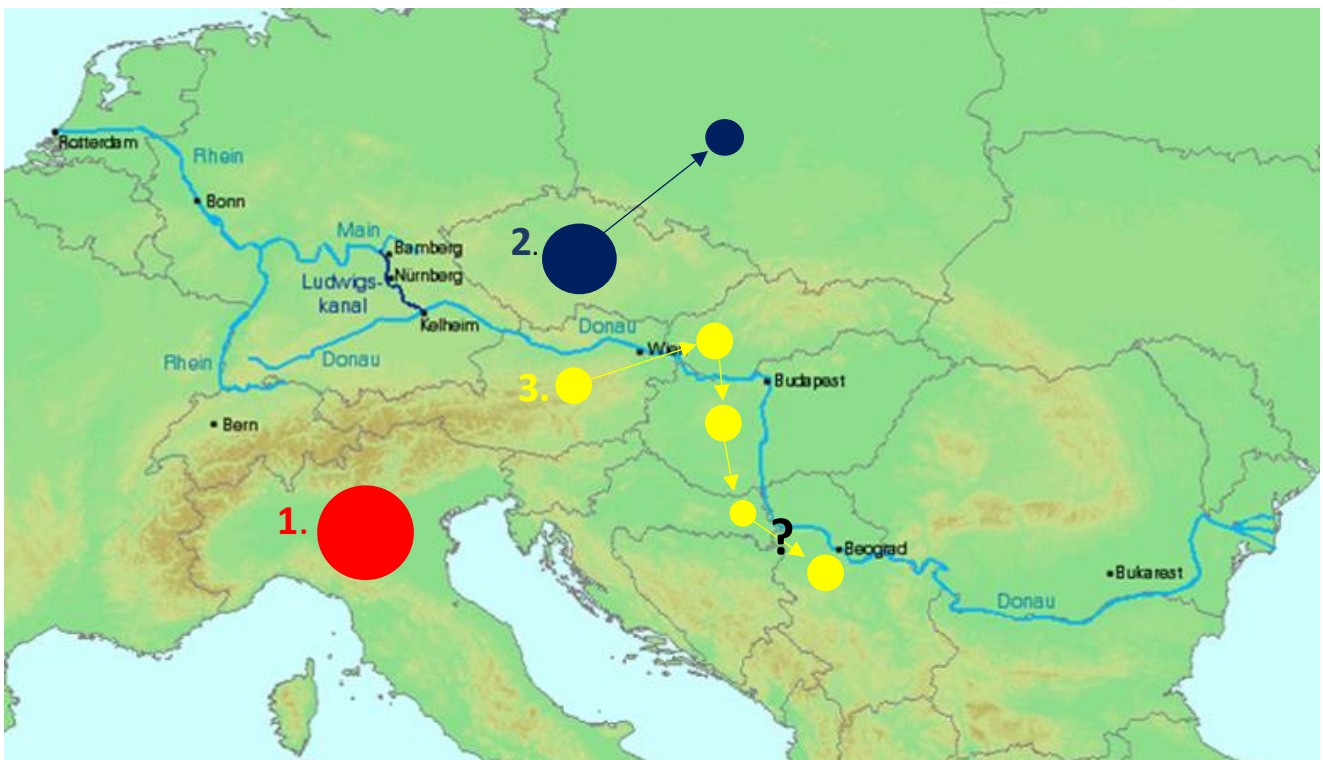
2.2.4. Dolazak i širenje u Europi

Veliki američki metilj izvorno potječe iz Sjeverne Amerike. Postoji pet enzootskih regija u SAD-u i južnoj Kanadi u kojima se pojavljuje. Tu spadaju sjeverna obala Pacifika, udolina na masivu Rocky Mountain, područje Velikih Jezera, sjeverni Quebec i Labrador te obala Gulif, donji tok rijeke Mississippi i južna obala Atlantika. Na širenje ovim područjima utjecala je prirodna migracija jelena te njihovo premještanje iz invadiranih u neinvadirana područja pod utjecajem čovjeka. Glavnu ulogu u održavanju fascioloidoze u prirodnom okolišu i njenom širenju po SAD-u i Kanadi imaju konačni nositelji ovog metilja. U njih se ubrajaju bjelorepi jelen (*Odocoileus virginianus*), wapiti jelen (*Cervus canadensis*) i karibu (*Rangifer tarandus*) (PYBUS, 2001.).

Unos velikog američkog metilja u Europu dogodio se krajem 19. stoljeća kao posljedica nekontroliranog unosa sjevernoameričkih vrsta jelena iz Amerike u europske parkove, zoološke vrtove i rezervate (SLUSARSKI, 1955.; BOJOVIĆ i HALLS, 1984.). Unesen je više puta te su stvorena tri europska žarišta invazije. Prvo žarište je nastalo na području Kraljevskog parka La Mandria u sjevernoj Italiji, drugo na dijelu Republike Češke i jugozapadne Poljske te posljednje žarište obuhvaća područje toka rijeke Dunav (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.). U Italiju je metilj *Fascioloides magna* unesen 1865. godine (BASSI, 1875.) te je tim unosom to područje postalo prvo stabilno žarište fascioloidoze u Europi (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.). Godine 1910. fascioloidoza je utvrđena u Češkoj te je ona postala drugo žarište Europe (ULLRICH, 1930.). Zatim je utvrđena i uz sjevernu češko-poljsku granicu te je genetski utvrđena povezanost između metilja na području Češke i metilja na području Poljske (KAŠNY i sur., 2012., KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2015.). Drugim riječima ova istraživanja su pokazala povezanost ova dva područja i put širenja fascioloidoze. Prvi slučaj u području rijeke Dunav zabilježen je u Austriji 1982. godine (PFEIFFER, 1983.), a tek početkom 21. stoljeća se fascioloidoza intenzivnije počela širiti tim područjem te je zabilježena Slovačkoj (RAJSKÝ i sur., 1994.), Mađarskoj (MAJOROS i SZTOJKOV, 1994.) te Hrvatskoj i Srbiji, a sporadični slučajevi zabilježeni su i u Njemačkoj (SALAMON, 1932.).

U Hrvatskoj je veliki američki metilj prvi put utvrđen u jelena običnog iz područja Šeprešhat u istočnoj Baranji 2000. godine nakon sanitarnog odstrjela zbog lošeg gojnog stanja (MARINCULIĆ i sur., 2002.). Nakon potvrde fascioloidoze u Hrvatskoj krenuo je stalni nadzor te je započeto liječenje jelenske divljači u Baranji, koje je nažalost u velikoj većini ostalo ograničeno na jelenske populacije kojima gospodare Hrvatske šume d.o.o. (JANICKI i sur.,

2005.). Kasnije je utvrđeno širenje fascioloidoze od istočne prema središnjoj Hrvatskoj (BUJANIĆ, 2019). KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) te BAZSALOVICSOVÁ i sur. (2013.) su analizirali *cox-1* i *nad-1* gene metilja iz Baranje te su potvrdili povezanost metilja izdvojenih na području Hrvatske s onima iz Dunavskog žarišta. Prvi opis metilja *F. magna* u Srbiji objavili su MARINKOVIĆ i NEŠIĆ (2008.), no do danas nema objavljenih podataka o genetskoj strukturi metilja iz Srbije.

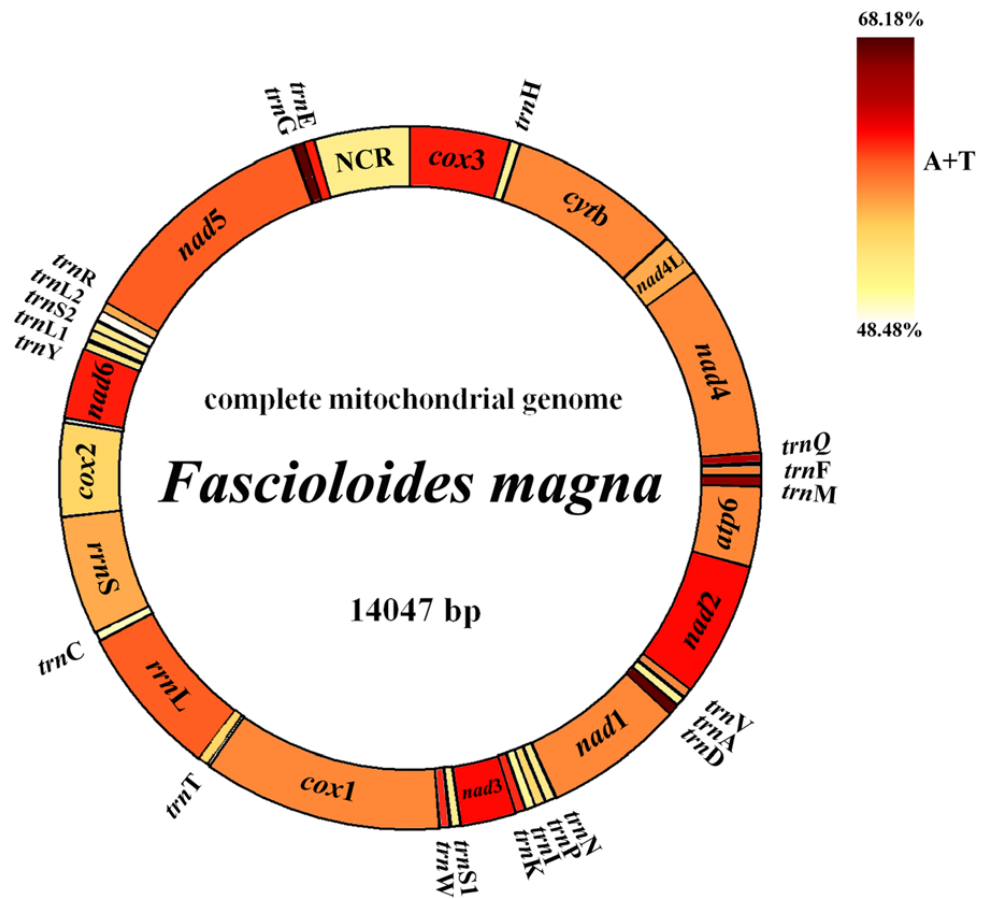


Slika 5. Europska žarišta invazije metiljem *F. magna*: crveno - talijansko žarište, plavo - češko žarište i širenje prema Poljskoj, žuto - žarište dunavskog sliva

2.3. COX-1 GEN

Mitochondriji su stanične organele koje imaju vlastiti genski materijal nazvan mitohondrijski genom i mogu se umnažati neovisno o jezgrinom genomu (CRIMI i RIGOLIO, 2008.). Mitohondrijski genom formiran je u mitohondrijsku DNK (mtDNK) koja je kružnog oblika, dvolančana te se nasljeđuje isključivo od majke (BIRKY, 2001.). Mitohondrijski markeri pokazali su se veoma korisnima u otkrivanju genske strukture populacije mnogih parazita (NADLER i sur., 1995.). Sljedovi mtDNK životinja razvijaju se brže od nuklearnih gena i zbog te karakteristike prikladniji su za otkrivanje međusobnih odnosa među blisko povezanim organizmima (BOORE, 1999.). Zbog stalnih mutacija, odsutnosti rekombinacije i hibridizacije te gotovo konstantnog sadržaja gena i varijacija u genskim kodovima mtDNK je iznimno pogodna za istraživanje populacijske genetike (HU i sur., 2004.). Cjelokupni mitohondrijski genom metilja *Fascioloides magna* sastoji se od 37 gena, a najviše proučeni geni su citokrom c oksidaza (cox-1) te nikotiamid dehidrogenaza (nad-1) (BOORE, 1999.; KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2016.; MA i sur., 2016.).

Još 2008. godine su Králová-Hromadová i sur. (2008.) na cjelovitim sekvencama cox-1 i nad-1 otkrili točno određene mutacije što je omogućilo korištenje kraćih varijabilnih regija odnosno cox-1, 384 bp te nad-1, 405 bp. Te regije pokazale su visoku razinu divergencije i korišteni su kao markeri u daljnjim populacijskim istraživanjima metilja *F. magna*. Korišteni su za otkrivanje podrijetla europskih populacija velikog američkog metilja, tijekom kolonizacije i migracijskih puteva. Proučavao se genetski materijal iz svih europskih žarišta te su se uspoređivali s uzorcima iz Sjeverne Amerike. Rezultati su pokazali da talijansko žarište ima zasebnu filogenetsku lozu, dok žarišta u Češkoj i Dunavskom slivu imaju zajedničku lozu. Što bi značilo da metilji iz Italije nemaju genetske veze s ostalim metiljima u europskim žarištima te da je *F. magna* najmanje dva puta unesen u Europu (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2011.).



Slika 6. Mitohondrijski genom metilja *Fascioloides magna* (izvor: MA i sur., (2016.)).

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na 147 uzoraka velikog američkog metilja prikupljenih u Hrvatskoj, Srbiji i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (Tablica 1.) u sklopu provedbe projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 „Interakcija nositelj-parazit: odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem *Fascioloides magna*”. Uzorci su potjecali od životinja odstrijeljenih tijekom redovitih lovnih zahvata. Uzorci parazita iz inozemstva su dopremljeni na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u sklopu suradnje s Naučnim Institutom za veterinarstvo u Novom Sadu te osobnih kontakata s znanstvenicima u SAD-u. Uzorci metilja iz Srbije potječu iz lovišta kojima gospodari Javno preduzeće "Vojvodinašume", dok su uzorci iz SAD-a podrijetlom iz područja uz grad New York (Ontario). Jetre prikupljene u Hrvatskoj pregledane su na način da su se radili podužni rezovi po jetrima debljine oko dva cm te se svaki isječak obostrano pregledao. Tom prilikom prikupljeni su prisutni metilji. Prikupljeni uzorci parazita pohranjeni su na – 20 °C do izolacije.

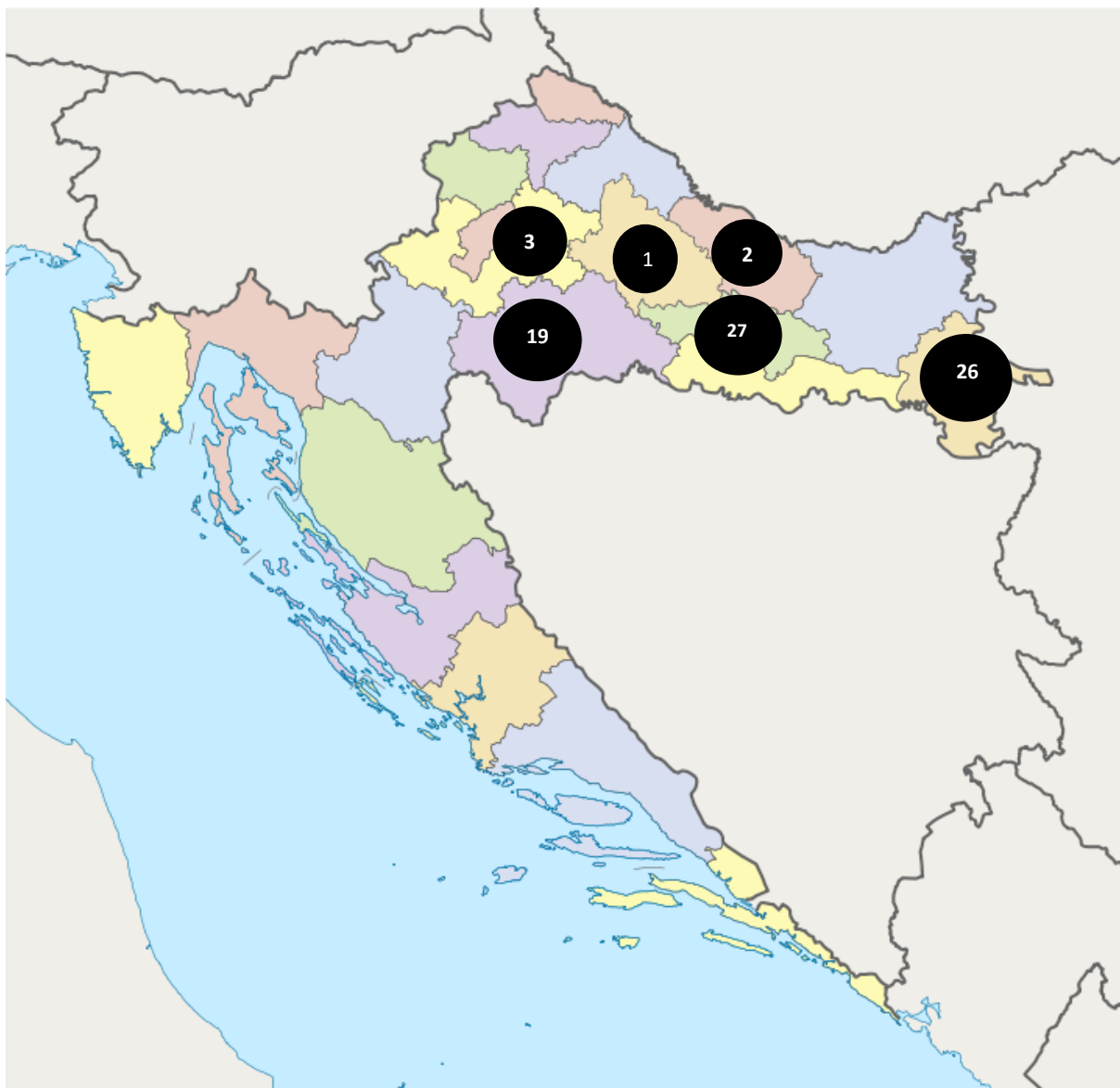
Za izolaciju DNK je korišten komercijalni kit Wizard® (Genomic DNA Purification Kit, Promega) prema protokolu proizvođača.

Za umnažanje odsječaka DNK korištene su početnice FM-cox1-F (5' GGTCATGGGGTTATAATGA 3') i FM-cox1-R (5' ACAGCATAGTAATAGCCGC 3') (KRALOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2008.), a za pripremu PCR smjese korišten je GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega). PCR reakcija provedena u smjesi količine 25 µL koja je sadržavala 5 µl DNK, 2 µl otopine početnica, 12,5 µl GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega i 5,5 µl H₂O. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) koristeći sljedeći protokol: početna denaturacija 95°C tijekom 2 min, zatim 35 ciklusa od 1 min na 94°C, 1 min za vezivanje početnica i 1 min na 72°C, završno produljivanje lanca odvijalo se 5 minuta na 72°C.

Prisutnost PCR proizvoda provjerena je elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu, a PCR proizvodi su sekvencirani u servisu Macrogen Europe u Amsterdamu, Nizozemska. Rezultati sekvencioniranja su pregledani i uređeni programom CLC Sequence Viewer 8.0, te je zatim korišten alat Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) u potrazi za identičnim slijedovima pohranjenim u GenBanku, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tablica 1. Prikupljeni uzorci jelena običnog (*Cervus elaphus*)

DRŽAVA	ŽUPANIJA/REGIJA	BROJ PRIKUPLJENIH UZORAKA
SRBIJA	Vojvodina	59
SAD	Područje uz jezero Ontario	10
HRVATSKA	Bjelovarsko – bilogorska	1
	Požeško – slavonska	27
	Sisačko – moslavačka	19
	Virovitičko – podravska	2
	Vukovarsko – srijemska	26
	Zagrebačka županija	3
	UKUPNO	



Slika 7. Broj prikupljenih uzoraka jelena običnog na području Hrvatske, po županijama

4. REZULTATI

Analiza je provedena na 123 sekvence *cox-1* gena jelena običnog (24 sekvence su isključene iz analiza zbog loše kvalitete) iz Hrvatske (58), Srbije (55) i SAD-a (10). Analizirani slijed dužine 355 parova baza se poklapa s lokusima 7 086 – 7 440 kompletne sekvence mitohondrijske DNA *Fascioloides magna* (GenBank KU060148). Na slijedu je identificirano 18 polimorfnih mjesta koja su rezultirala s 12 haplotipova (Tablice 2 i 3).

Tablica 2. Pripadnost pojedinog uzorka određenom haplotipu.

Haplotip	Uzorci
H1	CE-PS-1A CE-PS-1B CE-PS-1C CE-PS-2B CE-PS-2E CE-PS-3A CE-PS-3B CE-PS-3C CE-PS-3D CE-PS-3F CE-PS-3G CE-PS-3I CE-PS-4A CE-PS-4B CE-PS-5A CE-PS-5B CE-PS-5C CE-PS-5D CE-PS-6A CE-PS-6B CE-PS-6C CE-S-1 CE-S-10 CE-S-11 CE-S-12B CE-S-13 CE-S-14 CE-S-15 CE-S-16 CE-S-17 CE-S-18 CE-S-18B CE-S-2 CE-S-20A CE-S-20B CE-S-22 CE-S-22B CE-S-24B CE-S-25 CE-S-26 CE-S-27 CE-S-29B CE-S-29B CE-S-3 CE-S-30A CE-S-30B CE-S-31A CE-S-31B CE-S-32A CE-S-32B CE-S-33A CE-S-33B CE-S-34A CE-S-34B CE-S-35A CE-S-36B CE-S-4 CE-S-6 CE-S-7 CE-S-8 CE-S-9 CE-SM-1A CE-SM-1B CE-SM-1C CE-SM-1D CE-SM-1E CE-SM-1F CE-SM-2 CE-SM-3 CE-SM-4B CE-SM-4C CE-SM-4D CE-SM-4E CE-SM-5A CE-SM-5B CE-SM-5C CE-SM-6 CE-SM-7A CE-SM-7B CE-VP-1A CE-VP-1B CE-VS-1A CE-VS-1C CE-VS-1D CE-VS-1E CE-VS-1F CE-VS-1H CE-VS-2 CE-VS-3B CE-VS-3C CE-Z-1A CE-Z-1B CE-Z-1C
H2	CE-PS-2C CE-S-5
H3	CE-PS-2D CE-S-12A CE-S-19 CE-S-21 CE-S-22C CE-S-23A CE-S-28 CE-S-28A CE-S-29 CE-S-29A CE-S-29A CE-S-29C CE-S-29D CE-S-35B CE-S-36A
H4	CE-PS-3E
H5	CE-U-1A
H6	CE-U-1B CE-U-1E CE-U-2B
H7	CE-U-1C CE-U-3B
H8	CE-U-1D CE-U-4

H9	CE-U-2A
H10	CE-U-3A
H11	CE-VS-1B
H12	CE-VS-3A

Tablica 3. Haplotipovi utvrđeni u slijedovima cox-1 gena jelena običnog iz Hrvatske, Srbije i SAD-a

Haplotip	Br. uzoraka	Učestalost haplotipa	Lokacije	Podudaranja sa sekvencama iz GenBanka
H1	93	0,76	Hrvatska, Srbija	EF534996 KU060148 GU599864 KY793001 KX279954 KP635008
H2	2	0,02	Hrvatska, Srbija	
H3	15	0,12	Hrvatska, Srbija	GU599868
H4	1	0,008	Hrvatska	
H5	1	0,008	SAD	GU599875 MT158313
H6	3	0,02	SAD	
H7	2	0,02	SAD	
H8	2	0,02	SAD	
H9	1	0,008	SAD	
H10	1	0,008	SAD	
H11	1	0,008	Hrvatska	
H12	1	0,008	Hrvatska	

Najučestaliji haplotip – H1 utvrđen je u ukupno 93 uzorka, iz Hrvatske (Požeško – slavonska, Sisačko – moslavačka, Virovitičko – podravska, Vukovarsko – srijemska i Zagrebačka županija) te Srbije. Također haplotipovi H2 i H3 zajednički su uzorcima iz Hrvatske i Srbije. Haplotipovi utvrđeni u uzorcima iz SAD-a (H5, H6, H7, H8, H9 i H10) nisu utvrđeni u Hrvatskoj i Srbiji. Haplotipovi 11 i 12 utvrđeni su svaki u po jednom uzorku iz Vukovarsko – srijemske županije, dok je haplotip H4 utvrđen u jednom uzorku iz Požeško – slavonske županije.

Sljedovi dobiveni u ovom istraživanju uspoređeni su sa sljedovima *cox-1* gena *F. magna* pohranjenim u bazi GenBank i utvrđena su poklapanja. Haplotip H1, najučestaliji u ovom istraživanju, prethodno je utvrđen u nekoliko istraživanja (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2008.; RADVANSKY i sur., 2011.; KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2015.; JUHASOVÁ i sur., 2016.; MA i sur. 2016.; BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2017.) te je označen kao CO1-Ha3. Drugi najučestaliji haplotip H3 poklapa se sa slijedovim *F. magna* iz Češke (GU599868, RADVANSKY i sur., 2011.) (u literaturi označen kao haplotip CO1-Ha4), dok se haplotip H5, uzorka iz SAD-a, poklapa sa sekvencama iz istraživanja KRALOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) te PARKER i DAVID (2021.).

5. RASPRAVA

Analizom citokrom c oksidaze (cox-1) te nikotinamid dehidrogenaze (nad-1) uzoraka velikog američkog metilja iz Europe i SAD-a utvrđene su dvije filogenetske linije što potvrđuje da je parazit uvezen u Europu u više navrata. Najprije u Italiju, a zatim odvojeno u Češku, koja zajedno s ostalim zemljama Dunavskog sliva (Austrija, Mađarska, Slovačka, Hrvatska) čini jedinstveni genski bazen velikog američkog metilja (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2011.). Širenje iz Italije u druge dijelove Europe je isključeno te je istraživanje mikrosatelitskih lokusa potvrdilo da se veliki američki metilj iz Češke proširio u Slovačku, te zatim u Mađarsku, a iz Mađarske u Hrvatsku (JUHASOVÁ i sur., 2016.).

Prethodna istraživanja genske strukture velikog američkog metilja iz Hrvatske identificirala su dva haplotipa cox-1 gena (Ha3 i Ha4) te je potvrđena pripadnost dunavskom žarištu invazije (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2011.; BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2013.). U oba istraživanja su korišteni uzorci podrijetlom s iste lokacije (Tikveš), no primijenjene su različite metode analize. Dok su KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) sekvencirali PCR proizvode 29 uzoraka, BAZSALOVICSOVÁ i sur. (2013.) koristili su metodologiju „*high-resolution melting*“ (HRM) (RADVANSKY i sur., 2011.) na 200 uzoraka metilja podrijetlom od 19 jelena. Ovo istraživanje obuhvatilo je uzorke s puno većeg geografskog područja u Hrvatskoj što je rezultiralo opisom četiri nova haplotipa u Hrvatskoj koji do sada nisu bili zabilježeni u literaturi. Veliki broj novo-otkrivenih haplotipova vjerojatno je posljedica činjenice da su u ovom istraživanju korišteni uzorci iz šest različitih županija Hrvatske, dok su KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) te BAZSALOVICSOVÁ i sur. (2013.) koristili uzorke iz istog lovišta koje graniči s Dunavom.

Osim prvog istraživanja genske raznolikosti i puteva unosa velikog američkog metilja iz Sjeverne Amerike u Europu koje je uključivalo uzorke iz nekoliko europskih država (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2011.), te navedenog istraživanja cox-1 gena uzoraka iz Hrvatske (BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2013.), do sada su istraženi mitohondrijski geni velikog američkog metilja iz Poljske (KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur., 2015.), Njemačke (BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2017.) te Austrije (HUSCH i sur., 2017.). Stoga ovo istraživanje uzoraka iz Srbije predstavlja prve podatke o genskoj strukturi velikog američkog metilja iz ove zemlje. U Srbiji je potvrđena prisutnost najučestalijeg europskog haplotipa CO1 – Ha3, no također i do sada neidentificiranog haplotipa zajedničkog Hrvatskoj i Srbiji.

KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) su otkrili da je metilj u Italiju unesen sa sjeverozapada Sjeverne Amerike (Alberta u Kanadi i Oregon u SAD-u), dok je podrijetlo parazita unesenih u Češku vezano uz jugoistočna obalu SAD-a. U ovo istraživanje je uključeno i 10 uzoraka iz SAD-a, među kojima je utvrđeno šest haplotipova, od kojih je samo jedan prethodno opisan u istraživanju KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ i sur. (2011.) te PARKER i DAVID (2021.).

S obzirom da je veliki američki metilj nezavičajni parazit s velikim potencijalom za širenje na nova područja i nanošenje značajnih šteta lovnom gospodarstvu te općenito upravljanju divljim životinjama i potencijalno bioraznolikosti, sva saznanja o evoluciji i načinima širenja ovoga parazita značajan su doprinos za planiranje metodologije suzbijanja i prevencije invazije, kao i za razumijevanje odnosa nositelj – parazit. Ovo istraživanje značajno je doprinijelo poznavanju genske strukture velikog američkog metilj unesenog u Hrvatsku i Srbiju, no za dobivanje cjelokupne slike istraživanje svakako treba proširiti na druge markere poput mitohondrijskog nad-1 gena i mikrostatelitskih lokusa. Također, zanimljivo bi bilo usporediti gensku strukturu metilja prikupljenih iz različitih vrsta domaćina, budući da su dosadašnja istraživanja bazirana na uzorcima iz jelena običnog.

6. ZAKLJUČCI

1. Istraživanjem su utvrđena četiri nova haplotipa *cox-1* gena velikog američkog metilja u Hrvatskoj, te je potvrđena prisutnost dva prethodno poznata haplotipa dunavskog žarišta.
2. Dobiveni su prvi podatci o genskoj strukturi velikog američkog metilja u Srbiji.
3. Nisu utvrđena poklapanja među sljedovima *cox-1* gena analiziranih uzoraka iz područja Ontario u SAD-u s onima iz Srbije i Hrvatske.
4. Opisano je pet novih haplotipova iz SAD-a, koji do sada nisu objavljeni u literaturi.

7. POPIS LITERATURE

- ANONIMUS (2018a): Zakon o lovstvu. Narodne novine br. 99/187.
- ANONIMUS (2018b): Program kontrole fascioloidoze u populaciji jelena običnog i srne obične na područjima visokog rizika u 2018. godini. Ministarstvo poljoprivrede, Hrvatska.
- 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.
- BAZSALOVICSOVÁ, E., I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, J. RADVÁNSZKY, R. BECK (2013): The origin of the giant liver fluke, *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) from Croatia determined by high-resolution melting screening of mitochondrial cox1 haplotypes. Parasitol. Res. 112, 2661–2666.
- BAZSALOVICSOVÁ, E., L. JUHASOVÁ, I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, S. REHBEIN (2017): Mitochondrial genotyping of *Fascioloides magna* from Bavaria, Germany. Acta Parasitol. 62, 870-874.
- BIRKY, C. W. JR (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and models. Ann. Rev. Genet. 35, 125–148.
- 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.
- BOORE, J. L. (1999) Animal mitochondrial genomes. Nucleic Acid. Res. 27, 1767–1780.
- BUJANIĆ, M. (2019): Raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti jelena običnog (*Cervus elaphus* L.) u odnosu na invaziju metiljem *Fascioloides magna*. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet. Zagreb, Hrvatska.
- CAMPBELL, W. C. (1960): Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. J. Parasitol. 46, 769–775.
- CAR, Z. (1967): Razvrstavanje i prarodoslovlje divljači. U: Lovački priručnik (Dragišić, P., ur.). Lovačka knjiga, Zagreb, str. 114-116.
- CHEN, M. G., K. E. MOTT (1990): Progress in assessment of morbidity due to *Fasciola hepatica* infection: a review 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.
- CRIMI, M., R. RIGOLIO (2008): The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. Int. J. Nanomed. 3, 51–57.
- DARABUŠ, S., I. Z. JAKELIĆ (2002): Osnove lovstva. Hrvatski lovački savez, Zagreb, str. 68-76.
- 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, Prague, 155 pp.
- FALTÝNKOVÁ, A., E. HORÁCKOVÁ, L. HIRTOVÁ, A. NOVOBILSKÝ, D. MODRÝ, T. SCHOLZ (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. Acta Parasitol. 51, 87-90.
- FLORIJAČIĆ, T. (2006): Epizootiološka istraživanja fascioloidoze običnog jelena (*Cervus elaphus*) u istočnoj Hrvatskoj. Doktorski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- 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 (1976): The development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. J. Parasitol. 62, 26–32.
- GRIFFITHS, H. J. (1962): Fascioloidiasis of cattle, sheep and deer in Northern Minnesota. JAVMA 140, 342–347.
- HU, M., N. B. CHILTON, R. B. GASSER (2004) The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio - economic importance: recent progress and implications for population genetics and systematics. Adv. Parasitol. 56, 133–212.
- HUSCH, C., H. SATTMANN, C. HÖRWEIG, J. URSPRUNG, J. WALOCHNIK (2017): Genetic homogeneity of *Fascioloides magna* in Austria. Vet. Parasitol. 243, 75-78.

- 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. 2), 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.
- JUHASOVÁ, L., E. BAZSALOVICSOVÁ, I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, J. KARAMON (2016): A genetic structure of novel population of *Fascioloides magna* from Poland, Podkarpackie Province, indicates an expanding second European natural focus of fascioloidosis. Acta Parasitol. 61, 790-795.
- 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. SIEGLOVÁ, T. SIEGEL, R. LEONTOVYČ, K. BERÁNKOVÁ, J. PANKRÁC, M. KOŠTÁKOVÁ, 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.
- KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, A. BECK, R. BECK, F. MARTINKOVIĆ, Z. JANICKI (2021): First record of chronic *Fascioloides magna* infection in roe deer (*Capreolus capreolus*). Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl. 15, 173-176.
- KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., E. BAZSALOVICSOVÁ, A. DEMIASZKIEWICZ (2015): Molecular characterization of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) from southwestern Poland based on mitochondrial markers. Acta Parasitol. 60, 544–547.
- KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., E. BAZSALOVICSOVÁ, J. ŠTEFKA, M. ŠPAKULOVÁ, S. VÁVROVÁ, T. SZEMES (2011): Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. Int. J. Parasitol. 41, 373–378.
- KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., L. JUHASOVÁ, E. BAZSALOVICSOVÁ (2016): The Giant Liver Fluke, *Fascioloides magna*: Past, Present and Future Research. Springer, pp. 1-50.
- KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I., M. ŠPAKULOVÁ, E. HORÁČKOVÁ, L. TURČEKOVÁ, A. NOVOBILSKÝ, R. BECK, B. KOUDELA, A. MARINCULIĆ, D. RAJSKÝ, M.

- PYBUS (2008): Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 94, 58–67.
- MA, J., J. HE, G. LIU, R. LEONTOVYČ, M. KAŠNÝ I X. ZHU (2016): Complete mitochondrial genome of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Digenea: Fasciolidae) and its comparison with selected trematodes. *Parasites & Vectors* 9: 429.
- MAJOROS, G., V. SZTOJKOV (1994): Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: *Fasciolata*) in Hungary. *Parasitol. Hung.* 27, 27–38.
- 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. NEŠIĆ (2008) Changes of the liver of fallow deer (*Dama dama*) caused by American giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection. In: Proceedings of the 20th Conference of Veterinarians of the Republic of Serbia (with international participation) (Mijacević, Z., ed). Beograd, Serbia, pp 298–309.
- NADLER, S. A., R. L. LINDQUIST, T. J. NEAR (1995) Genetic structure of Midwestern *Ascaris suum* populations: a comparison of isoenzyme and RAPD markers. *J. Parasitol.* 81, 385-394.
- PARKER, A., A. A. DAVID (2021): Genetic characterization of the giant liver fluke, *Fascioloides magna* (Platyhelminthes: Fasciolidae) from the Adirondack region of northern New York.
- PFEIFFER, H. (1983): *Fascioloides magna*: Erster Fund in Österreich. *Wien. Tierarztl. Monat.* 70, 168–170.
- 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, USA.
- RADVANSKY, J., E. BAZSALOVICSOVÁ, I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, G. MINARIK, L. KADASI (2011): Development of high-resolution melting (HRM) analysis for population studies of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), the giant liver fluke of ruminants. *Parasitol. Res.* 108, 201-209.
- RAJSKÝ, D., A. PATUS, K. BUKOVJAN (1994): Prvý nález *Fascioloides magna* Bassi, 1875 na Slovensku. *Slov. Vet. Čas.* 19, 29–30.
- SALOMON, S. (1932): *Fascioloides magna* bei deutschem Rotwild. *Berl. Tier. Woch.* 48, 627–628.

- SCHWARTZ, W. L., D. B. LAWHORN, E. MONTGOMERY (1993): *Fascioloides magna* in a feral pig. J. Swine Health Prod. 1, 27.
- ŚLUSARSKI, W. (1955): Studia nad europejskimi przedstawicielami przywry *Fasciola magna* (Bassi, 1875) Stiles, 1894. Acta Parasitol. 3, 1–59.
- 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.
- ŠPAKULOVÁ, M., D. RAJSKÝ, J. SOKOL, M. VODŇANSKÝ (2003): Cicavica obrovská (*Fascioloides magna*). Významný pečeňový parazit prežúvavcov. PaRPRESS, Bratislava (in Slovak).
- TROHAR, J. (2004): Jelen. U: Lovstvo (Mustapić, Z., ur.). Hrvatski lovački savez, Zagreb, str. 43-60.
- 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.

8. SAŽETAK

Fascioloides magna nezavičajni je parazit na europskim prostorima, a izvorno parazitira u sjevernoameričkih vrsta jelena. Dolaskom u Europu ovaj metilj formira nove zajednice nositelj - parazit te su do sada utvrđena tri žarišta velikog američkog metilja u Europi: talijansko, češko i žarište dunavskog sliva. Analizom *cox-1* gena nastojalo se prikupiti podatke o raznolikosti metilja u Hrvatskoj i Srbiji, te međusobni evolucijski odnosi kao i odnos s metiljima iz područja uz New York (Ontario) u SAD-u. Nakon izolacije DNK prikupljenih uzoraka, PCR-a te sekvenciranja dobivene su 123 sekvence *cox-1* gena, 58 iz Hrvatske, 55 iz Srbije te 10 iz SAD-a koja su potom analizirane. U Hrvatskoj je potvrđena prisutnost dva otprije poznata haplotipa dunavskog žarišta, te su otkrivena četiri nova haplotipa. Nalaz novih haplotipova vjerojatno je rezultat činjenice da su uzorci u Hrvatskoj uzeti s većeg geografskog područja, iz šest županija, što nije bio slučaj u prethodnim istraživanjima. Dobiveni su prvi podatci o genetskoj strukturi u Srbiji. Najučestaliji haplotip bio isti kao i u Hrvatskoj (Ha3), te je utvrđena i prisutnost do sada neidentificiranog haplotipa koji je zajednički i Hrvatskoj i Srbiji. Haplotipovi dobiveni iz uzoraka iz SAD-a nisu utvrđeni u Hrvatskoj i Srbiji, a od 6 identificiranih haplotipova samo je jedan prethodno opisan u literaturi.

KLJUČNE RIJEČI: *Fascioloides magna*, *cox-1* gen, haplotipovi, jelen obični

9. SUMMARY

Eva Posavec

ANALYSIS OF THE COX-1 GENE OF THE FLUKE *FASCIOLOIDES MAGNA* FROM DIFFERENT AREAS

Fascioloides magna is a non-native parasite in Europe which is originally a parasite of deer species in North America. After arriving to Europe, this fluke formed new host-parasite associations, and established three permanent natural foci: in Italy, Czech Republic and Danube floodplain forests. The goal of this research was to analyse cox-1 gene and to collect data on fluke diversity in Croatia and Serbia, as well as their evolutionary relations and relations with flukes collected in area of New York (Ontario), USA. After DNA isolation, PCR and sequencing we have determined 123 sequences of cox-1 genes, 58 sequences from Croatia, 55 from Serbia and 10 from the USA. In Croatia, the presence of two previously known haplotypes of the Danube foci was confirmed and four new haplotypes were discovered. The finding of new haplotypes is probably the result of the fact that samples in Croatia were collected from a larger geographical area than in previous studies, from six counties. Also, we have obtained the first data on the genetic structure of the giant liver fluke in Serbia. The most common haplotype was the same as in Croatia (Ha3), and the presence of so far unidentified haplotype was found, which is common in both, Croatia and Serbia. Haplotypes obtained from USA samples were not identified in Croatia and Serbia, and of the 6 identified haplotypes only one was previously described in the literature.

KEY WORDS: *Fascioloides magna*, cox-1 gene, haplotypes, red deer

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. srpnja 1996. u Bjelovaru. Osnovnu školu pohađala sam u OŠ Rovišće od 2003. do 2011. nakon čega sam upisala Gimnaziju Bjelovar - opći smjer. Odmah nakon završetka srednje škole, 2015. upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Uz studij dvije godine sam volontirala na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, a odnedavno sam i član Lovačke sekcije "dr. Otto Rohr" Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. U rujnu ove godine imala sam izložen plakat na devetom međunarodnom kongresu „Veterinarska znanost i struka“.