

Primjena proteomike u istraživanju invazijskih bolesti divljih životinja



Application of proteomics in research of parasitic diseases of wildlife

Mandek, S., M. Bujanić, J. Kuleš, F. Martinković, M. Sindičić, D. Konjević*

Sažetak

Točna identifikacija parazitskih vrsta i dijagnostika invazijskih bolesti temelj je znanstvenog razvrstavanja, ali i liječenja pojedinih bolesti. Identifikacija temeljena na morfološkim značajkama parazita i nadalje je osnova dijagnostičkih metoda. Iako je ova metoda vrlo pouzdana, razvoj molekularnih metoda pruža nove mogućnosti za kombiniranje više metoda radi točnije dijagnostike i izbjegavanja mogućih poteškoća uvjetovanih razlikama u uzorkovanju te pripremi i pohrani parazita, uvjetima u kojima je lešina boravila do dopreme na analizu i sl. Osim u navedenim slučajevima, kombinacija metoda također se posebno preporučuje u slučaju visoke srodnosti parazita. Osim toga uvođenje proteomike otvara nove mogućnosti u istraživanju parazita divljih životinja s posebnim naglaskom na potencijalnu primjenu u liječenju, razvoju mjera kontrole i dizajnu cjepiva.

Ključne riječi: divlje životinje, paraziti, identifikacija vrsta, proteomika

Abstract

Accurate identification of parasitic species and disease diagnostics is a prerequisite for species systematics and treatment of potential diseases. Diagnosis based on analysis of morphological keys is still a fundamental method in parasitology. Despite its reliability, development of molecular methods offers new possibilities in combining these methods with the aim of more accurate diagnostics and avoidance of potential problems caused by variations in sampling and parasite preparation/fixation, the conditions in which carcasses were stored before analysis, etc. Apart from these cases, method combination is highly recommendable in closely related species. Additionally, introduction of proteomics in this field opens new areas in the research of wildlife parasitic diseases, with special emphasis on potential applications in treatment, development of disease control strategies, and vaccine design.

Key words: wildlife, parasites, species identification, proteomics

Siniša MANDEK, dr. med. vet., Ministarstvo poljoprivrede, dr. sc. Miljenko BUJANIĆ, stručni suradnik, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Josipa KULEŠ, poslijedoktorandica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Franjo MARTINKOVIĆ, docent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Magda SINDIČIĆ, izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, dr. sc. Dean KONJEVIĆ, izvanredni profesor, Dipl. ECZM, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. * Dopsni autor: konjevic@vef.hr

Uvod

Divlje se životinje dugi niz godina navode kao potencijalan izvor zaraznih i parazitskih bolesti za domaće životinje i ljude (McCallum i Dobson, 1995.; Daszak i sur., 2000.). Pritom je očito da se naglasak stavlja na očuvanje zdravlja ljudi i domaćih životinja, dok je utjecaj uzročnika bolesti na divlje životinje u pravilu u drugom planu (Thompson i sur., 2009.). Iako je činjenica da su paraziti redovit nalaz u divljih životinja i da u njih u najvećem broju slučajeva invazije prolaze bez kliničkih znakova, opisani su i slučajevi s visokim pomorom divljih životinja. Takvih je primjera više, a ovdje navodimo pojavu šuge u alpskih divokoza (*Rupicapra rupicapra*) jer je populacija divokoze razmjerno mala pa je ovakav utjecaj bolesti time i važniji. Ova je invazijska bolest u Italiji u prvom izbijanju invazije uzrokovala pomor čak 80 % populacije (Rossi i sur., 1995.). Na području susjedne Slovenije zapisi o pojavi šuge u divokoza postoje još od 1911. godine (Bidovec, 1993.). Iako se ova bolest povremeno pojavljivala od 1970-tih godina, valja istaknuti zabilježena uginuća čak 280 divokoza na području Kranjske gore u epizootiji koja je trajala od 1976. do 1978. godine (Felc, 1979.). Na području naše države nema zapisa o pojavi šuge u divokoza (Frković, 2009.), iako to možda govori više o naporima uložanima u praćenje bolesti divljih životinja negoli o samoj pojavi bolesti. Zanimljivo, Bidovec (1976.) tvrdi da su šugarci sastavni dio života i da kao takvi imaju ulogu u ekosustavu. To mišljenje prevladava u pogledu većine bolesti divljih životinja i u suštini je ispravno. Ipak, treba imati na umu da su današnji uvjeti života divljih životinja, uz urbanizaciju, globalizaciju i fragmentaciju, odnosno gubitak staništa, uvelike uvjetovani ljudskom aktivnošću, te je teško govoriti o izvornim ekosustavima, a samim time i o utjecaju bolesti na populacije divljih životinja u nekadašnjem kontekstu.

Kad govorimo o parazitima divljih životinja, svakako je nužno ponovno napomenuti dvije činjenice, prvu da su paraziti redovit nalaz u divljih životinja i drugu da je gospodarenje divljim životinjama u Republici Hrvatskoj uglavnom u tipu prirodnog uzgoja. Tomu valja dodati i nepostojanje sustavnog praćenja na razini države. Te su činjenice iznimno važne za praćenje bolesti u divljih životinja. Naime u ovakvim uvjetima prikupljanje uzoraka/lešina divljih životinja ovisi primarno o individualnom angažmanu ovlaštenika prava lova i lovcima te manjim dijelom o znanstvenim istraživanjima. To nam govori da će većina parazitskih invazija koje ne uzrokuju klinički vidljivu bolest ili pak gubitke na mladunčadi ili trofejnoj vrijednosti u pravilu proći nezapaženo. Bez sustavnog prikupljanja uzoraka i dijagnostike, gubimo vrijedne

spoznaje o prisutnosti i učestalosti pojedinih vrsta parazita, kao i o svim daljnjim znanstveno utemeljenim procjenama učinka na određene vrste divljih životinja ili pak moguću procjenu dotičnu vrstu, ili pak moguću procjenu rizika za zdravlje domaćih životinja i ljudi. Jedan od primjera kasne dijagnostike vrlo je vjerojatno i pojava velikog američkog metilja (*Fascioloides magna*) u Republici Hrvatskoj. Njega su po prvi put na području Šeprešhata u Baranji identificirali Marinculić i suradnici (2002.), na primjercima izdvojenima iz jetre jelena običnog tijekom 2000. godine. Uvažavajući činjenicu da *F. magna* kao alohtona vrsta dolaskom u novo područje u pravilu ne doseže punu veličinu od 10 cm, nego je znatno manji, lako je moguće da su prve invazije ostale nezabilježene, posebice ako je poznato da se iznutrice naše divljači u većini slučajeva neškodljivo uklanjaju putem jama za zakapanje ili kafilerije. U prilog ovakvim pojavama različitih veličina parazita u novom nositelju u odnosu na izvornog pregledno je prikazao Haley (1962.). Osim spomenutih problema tijekom prikupljanja uzoraka dodatnu otežavajuću okolnost u dijagnostici parazitskih bolesti divljih životinja čini i stupanj raspadanja u kojem se lešine dostavljaju na analizu, što je posljedica izloženosti vremenskim uvjetima i uglavnom kasnog pronalaska. U konačnici, kašnjenje u dijagnostici za sobom povlači i kašnjenje u eventualnim mjerama kontrole.

U ovom stručnom radu cilj nam je osvrnuti se na tradicionalne i novije metode parazitološke dijagnostike, s posebnim naglaskom na primjenu proteomičke u istraživanju invazijskih stanja divljih životinja.

Morfološka dijagnostika parazita

U parazitologiji je identificiranje vrsta moguće provesti na nekoliko načina. Pritom valja napomenuti da iako su temeljne metode identifikacije parazita i dijagnostike invazijskih bolesti u parazitologiji nastale prije mnogo vremena, njihova je primjena i danas iznimno važna. Tako je je dugi niz godina mikroskopska pretraga temeljena na analizi različitih morfoloških značajki bila jedina metoda dijagnostike parazita. Iako i danas ključna, ona je u pravilu vremenski zahtjevnija, a osim toga i njezina je pouzdanost pod utjecajem objektivnih čimbenika poput obučenosti osoblja, ali i očuvanosti uzorka zbog utjecaja okoliša, zdravstvenog statusa nositelja nositelja i sl. (Ndao, 2009., Perkins i sur., 2011.). Čak i u savršenim uvjetima dijagnostike varijacije u uzorkovanju i pripremi parazita te temperaturi okoliša i vlazi mogu dovesti do razlika u veličini, obliku i boji parazita, pa samim time i do nedoumica u tumačenju morfoloških značajki nužnih za identifikaciju vrste. U

svom su istraživanju Cribb i Bray (2010.) prikazali razlike u pripremi metilja za analizu, što dovodi do problema u konzistentnosti pri tumačenju nalaza. Već smo naveli da kod pojedinih vrsta, a posebice kad je riječ o novoformiranim žarištima, može doći do variranja u veličini parazita. Potvrdu za to daje i istraživanje Bruce i suradnika (1961.) koji su ustanovili razlike u veličini parazita *Schistosoma mansoni* prilikom invazije 13 različitih vrsta sisavaca. Drugi problemi uključuju i reduciranje tjelesnih značajki, pri čemu pojedini paraziti postaju praktično samo rasplodni organi. Takvo pojednostavljenje građe i oblika može biti problem zbog nedostatnih pokazatelja nužnih za filogenetsku analizu (Evans i sur., 2010.; Perkins i sur., 2011.). Sve to postavlja izazov pred dijagnostičara ponajprije u smislu određivanja u kojoj mjeri odstupanja van postavljenih granica i dalje predstavljaju određenu vrstu (Perkins i sur., 2011.). I bez navedenih otegotnih okolnosti pojedine vrste unutar istog roda mogu imati gotovo identične morfološke značajke. Primjer za to jesu paraziti roda *Setaria*, gdje sličnost može dovesti do otežane identifikacije i potrebe za primjenom dodatnih analiza (Yatawara i sur., 2007.; Ferri i sur., 2009.; Laaksonen i sur., 2009.; Čurlík i sur., 2019.). To je uzrok naknadnih brojnih rasprava i različitih tumačenja. Unatoč tomu, morfološka dijagnostika i dalje ima brojne prednosti u parazitologiji, poput razlikovanja istodobne invazije s dvije ili više vrsta međusobno srodnih parazita (Kafle i sur., 2015.). Zaključno možemo istaknuti da je morfološka dijagnostika i dalje važan dio identifikacije parazita, a da je njezino upotunjavanje drugim tehnikama zasigurno smjer u kojem bi današnja dijagnostika trebala ići. Ako se primjenjuje isključivo morfološka dijagnostika, nužna je kvalitetna fotodokumentacija kako bi se u eventualnim naknadnim istraživanjima mogla provjeriti postavljena dijagnoza. S takvim problemom, tj. nemogućnošću usporedbe fotodokumentacije, susreli su se Čurlík i suradnici (2019.) u identifikaciji parazita *Setaria tundra* u srne obične tijekom usporedbe s prijašnjim nalazom u iste životinjske vrste s drugom, sličnom vrstom parazita, *Setaria labiata-papillosa* (Richter, 1959).

Druge metode

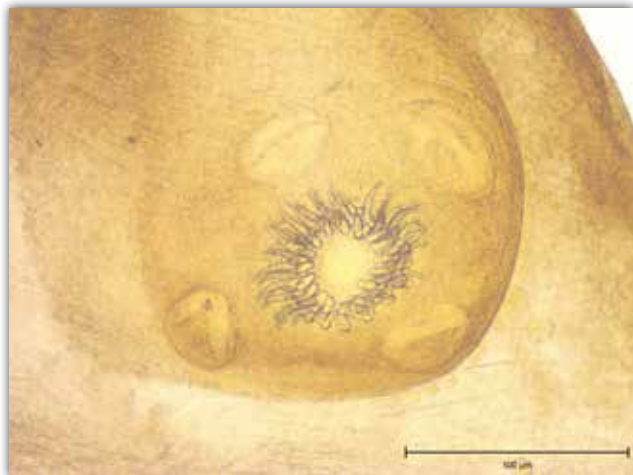
Serološke pretrage temelje se na dokazu protutijela ili dokazu antigena. One uključuju imunoenzimski test (ELISA) i njegove varijacije (FAST-ELISA i Dot-ELISA). U odnosu na mikroskopske pretrage, ove su pretrage pokazale zadovoljavajuću specifičnost i osjetljivost u slučajevima niske produkcije jajašaca ili kad uzorci ne dopuštaju kvalitetnu mikroskopsku analizu



Slika 1. Nalaz koprološke pretrage, jajašca metilja *F. magna*, morfološka dijagnostika.

(Hillyer i sur., 1995.). Na primjeru fascioloidoze Severin i suradnici (2015.) primjenom ROC krivulje utvrdili su da je ELISA metoda sa sekretornim i ekskretornim antigenom metilja *Fascioloides magna* pokazala višu preciznost i bolje razlikovanje pozitivnih od negativnih populacija jelena običnog (*Cervus elaphus*) u odnosu na koprološku pretragu i biokemijske pretrage krvnog seruma. Druge metode još uključuju LIPS (luciferaza imunoprecipitacija) i brze testove za otkrivanje antigena. Problem u primjeni seroloških metoda u dijagnostici parazitskih invazija jest unakrižna reaktivnost (Severin, 2009.; de Sousa i sur., 2016.), kao i invazije tijekom kojih ne dolazi do dostatne produkcije protutijela ili dolazi do kasne serokonverzije (Moro i Schantz, 2009.). Prema nekim autorima ozbiljniji nedostaci seroloških metoda u parazitologiji uključuju nedostatnu osjetljivost i činjenicu da za velik dio parazitskih invazija još uvijek nema registriranih testova (Wong i sur., 2014.).

Primjena molekularnih metoda u parazitologiji u znatnom je porastu u novije vrijeme. Trenutačno ove metode uključuju analizu definiranih markera (dijelova DNA) pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i njezinih inačica (RAPD, AFLP, RFLP, LAMP i RT-PCR). Razvojem molekularnih metoda došlo je i do porasta njihove osjetljivosti i specifičnosti te je postalo moguće identificirati i parazite koji su međusobno vrlo slični. Osim toga molekularne se metode dobrim dijelom provode rutinski (Kumar i sur., 2021.). Ovakav razvoj događaja utjecao je i na razvoj sistematike i epidemiologije parazita, razumijevanja odnosa nositelja i parazita, razumijevanje razvoja imunosti, kao i razvoja cjepiva (Kumar i sur., 2021.). Primjenom molekularnih metoda moguće je pratiti i srodnost pojedinih linija parazita unutar iste vrste. Tako u literaturi ima



Slika 2. Prikaz protoskoleksa larvalnog stadija trakavice *Taenia crassiceps* (*Cysticercus longicollis*), morfološka dijagnostika (izvor: Konjević i sur., 2016.).

više radova koji se koriste analizom mitohondrijske DNA (gen *cox-1*, gen *nad-1*) metilja *F. magna* za razlikovanje pojedinih haplotipova (ovisnih o žarištima), ali i za razlikovanje od velikog metilja *Fasciola hepatica* (Králová-Hromadová i sur., 2008.; Bazsalovicsová i sur., 2013.; Husch, 2016.; Husch i sur., 2017.). Konačno, izrađena je i potpuna analiza mitohondrijskoga genoma metilja *F. magna* kao i usporedba 12 gena s 20 vrsta drugih, metilja iz 11 porodica (Ma i sur., 2016.).

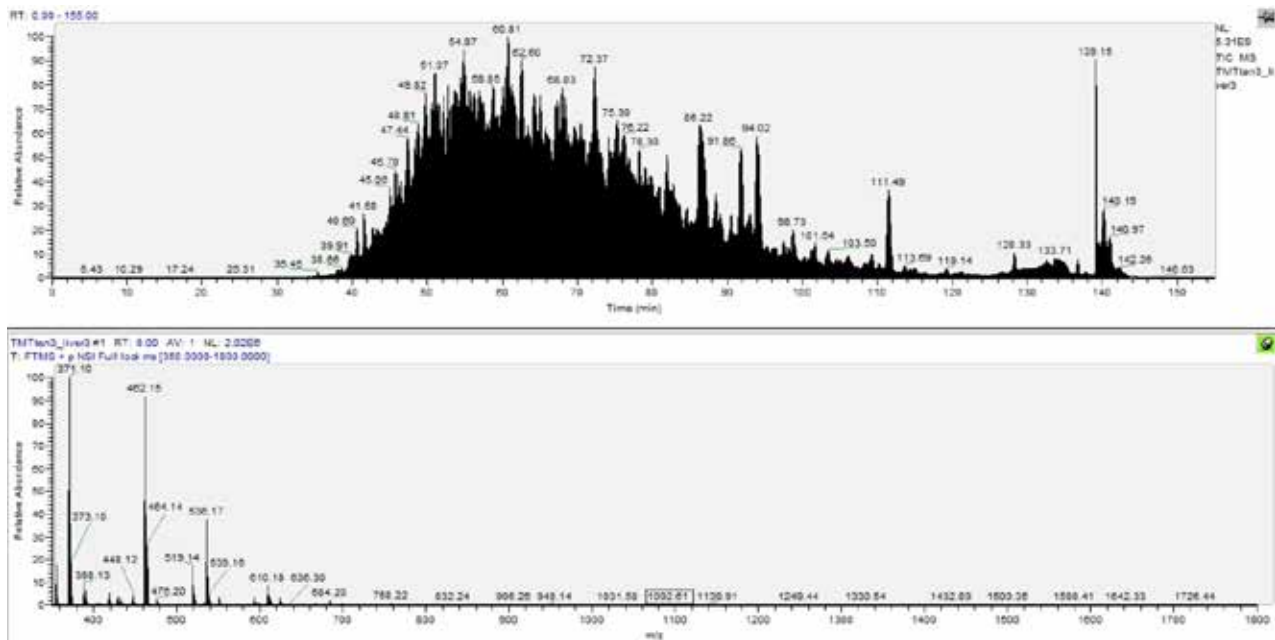
Važno je napomenuti da u primjeni navedenih metoda treba voditi brigu o potencijalnim onečišćenjima tijekom pripreme uzoraka što može dovesti do pogrešnih rezultata. Prepreka su i uvjeti skladištenja koji mogu degradirati uzorke i onemogućiti izolaciju odgovarajućih molekularnih markera.

Primjena proteomike u istraživanju invazijskih bolesti divljih životinja

Proteomika je sveobuhvatna analiza ekspresije gena i cijelog seta proteina koji se nalazi u staničnoj liniji, tkivu ili organizmu. Iako je proteomika u većini slučajeva percipirana kao nova metoda, njezini počeci sežu zapravo u 70.-te godine dvadesetog stoljeća, kad su znanstvenici počeli primjenjivati dvodimenzionalnu elektroforezu u gelu kako bi kreirali baze podataka o proteinima (O'Farrell, 1975.). Proteomika se dalje razvila zahvaljujući postojanju baza podataka sekvencija DNA i proteina, napretku u području masene spektrometrije i razvoju računalnih algoritama za pretraživanje baza podataka (Graves i Haystead, 2002). Općenito gledano, značaj proteomike očituje se u razumijevanju biološke funkcije pojedinih segmenata u organizmu, pitanja na koje

analiza genoma ne može pružiti zadovoljavajuće odgovore. U svakom slučaju proteomika je moćan alat za analizu funkcije gena na razini proteina (Pandey i Mann, 2000.). S obzirom na to da su proteini, gledano funkcionalno, korak iza gena, primjena proteomike podrazumijeva pregršt prilika za postavljanje novih otkrića i pretpostavki. Upravo ova značajka, kao i činjenica da proteini imaju veliku ulogu kao katalizatori, strukturni elementi i glasnici, pokazuje da bi proteomika mogla dati iznimno važne odgovore u kliničkom segmentu veterine i općenito biomedicine (Ndao, 2009.). Pritom je zapravo njezin najveći potencijal u pronalaženju novih biomarkera koji bi kasnije bili upotrebljivi u dijagnostici, ne samo kroz proteomiku nego i kroz druge, dostupnije i jeftinije metode. Jedan od primjera učinkovitosti proteomike u identifikaciji parazita prikazali su Bredtmann i suradnici (2019.) kad su utvrdili visoku točnost MALDI-TOF MS metode u razlikovanju odraslih stadija vrlo srodnih vrsta *Cylicostephanus longibursatus* i *Cylicostephanus minutus*. Navedeni primjer vezan je uz domaće životinje, ali je svakako zanimljiv, posebice ako znamo da su ovakva istraživanja još uvijek razmjerno rijetka u divljih životinja.

Jedan od primjera primjene proteomike u proučavanju invazijskih bolesti divljih životinja s više važnih znanstvenih doprinosa jest istraživanje odnosa nositelja i parazita u slučaju invazije divovske žabe (*Rhinella marina*) oblicem *Ortleppascaris* sp. (Silva i sur., 2014.). Pritom je, među ostalim, otkriven i As37, imunoreaktivni antigen s potencijalom u izradi cjepiva protiv ove bolesti. Također su utvrđeni proteini lon-3 i PP2C, koji s obzirom na visoku evolucijsku očuvanost upućuju na potencijal u strukturnim istraživanjima razvoja i diferencijacije spola oblića. Swan i suradnici (2019.) na primjeru metilja *Fasciola hepatica* otkrili su čitav spektar glikoproteina koji imaju ključnu ulogu u odnosu nositelja i parazita, pa se čak govori o potencijalnoj ulozi u dizajniranju cjepiva. Cantacessi i suradnici (2012.) analizirali su transkriptom i ekskretorni i sekretorni proteom spolno zrelih metilja *Fascioloides magna*. Utvrdili su 835 proteina, od kojih je njih 80 prepoznato kao ekskretorni i sekretorni produkti ovoga metilja. Među najzastupljenijima bili su antioksidacijski proteini, peptidaze i proteini uključeni u metabolizam ugljikohidrata. Autori ovog istraživanja smatraju da je dobivena baza podataka temelj budućih istraživanja molekula koje imaju ulogu u odnosu nositelja i parazita, a koje potencijalno mogu poslužiti i za kreiranje novih strategija liječenja fascioloidoze. Usporedna analiza proteoma seruma i jetre divljih svinja invadiranih metiljem *F. magna* pokazala je promjene proteoma nositelja na lokal-



Slika 3. Istraživanje fasciolidoze, MS/MS spektar s pripadajućim pikovima uzoraka jetre divlje svinje dobiven u programskom alatu Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka)

noj i općoj razini, identificirajući proteine povezane s imunskim odgovorom nositelja, oksidacijskim stresom i metaboličkim promjenama (Kuleš i sur., 2021.). Dobiveni rezultati temelj su za daljnje istraživanje učinkovitije kontrole i novih metoda liječenja fasciolidoze.

Zaključak

Iz svega navedenoga je razvidan izniman napredak u razvoju i primjeni novijih metoda u dijagnostici parazita, ali je također i neupitan daljnji doprinos morfološke identifikacije kao temeljne metode. Posebno treba naglasiti sve očitiju primjenu proteomike u ovom području, kao i postojanje dodatnih vrijednosti koje ona pruža. Za pretpostaviti je da će i proteomika, kao uostalom i molekularne metode, s vremenom postati jeftinija, a time i dostupnija za češću upotrebu u parazitološkoj dijagnostici.

Zahvala

Rad je u potpunosti financiran sredstvima projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 8963 *Interakcija nositelj-parazit; odnos tri različita tipa nositelja prema invaziji metiljem Fascioloides magna*.

Literatura

- 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.
- BIDOVEC, A. (1976): The dynamics of the chamois mange in the area of the North-Western Karawanken. *Internationales Gamswild Treffen, Bled*, pp. 86-90.
- BIDOVEC, A. (1993): Garje pri gamsu (*Rupicapra rupicapra* L.). *Prispevki Prvi slovenski veterinarski kongres Portorož*, 18. - 20. 9. 1993. Portorož. Slovenska veterinarska zveza, pp. 473-480.
- BREDTMANN, C. M., J. KRÜCKEN, J. MURUGAIYAN, A. BALARD, H. HOFER, T. A. KUZMINA, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA (2019): Concurrent proteomic fingerprinting and molecular analysis of cyathostomins. *Proteomics* 19, 1800290.
- BRUCE, J. I., L. M. LLEWELLYN, E. H. SADUN (1961): Susceptibility of wild mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 47, 752-756.
- CANTACESSI, C., J. MULVENNA, N. D. YOUNG, M. KAŠNÝ, P. HORAK, A. AZIZ, A. HOFMANN, A. LOUKAS, R. B. GASSER (2012): A Deep Exploration of

- the Transcriptome and “Excretory/Secretory” Proteome of Adult *Fascioloides magna*. MCP 11, 1340-1353.
- CRIBB, T. H., R. S. BRAY (2010): Gut wash, body soak, blender and heat-fixation: approaches to the effective collection, fixation and preservation of trematodes of fishes. Syst. Parasitol. 76, 1-7.
 - ČURLÍK, J., D. KONJEVIĆ, M. BUJANIĆ, Ž. SABOL, F. MARTINKOVIĆ, M. SINDIČIĆ (2019): The first description of *Setaria tundra* (Issaitshikoff & Rajewskaya, 1928) in roe deer from Croatia. Helminthologia 56, 252-255.
 - DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT (2000): Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. Science 287, 443-449.
 - DE SOUSA, J. E. N., E. F. G. DE CARVALHO, M. A. LEVENHAGEN, L. S. DE FARIA, M. DO R. F. GONÇALVES-PIRES, J. M. COSTA-CRUZ (2016): Serological cross-reactivity between *Strongyloides venezuelensis* and *Syphacia muris* in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Parasitol. Int. 65, 137-145.
 - EVANS, N. M., M. T. HOLDER, M. S. BARBEITOS, B. OKAMURA, P. CARTWRIGHT (2010): The phylogenetic position of Myxozoa” exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. Mol. Biol. Evol. 27, 2733-2746
 - FELC, V. (1979): Bodo garje res pobrale na tisoče naših gamsov. Delo 18. 1. 1979., 17.
 - FERRI, E., M. BARBUTO, O. BAIN, A. GALIMBERTI, S. UNI, R. GUERRERO, H. FERTÉ, C. BANDI, C. MARTIN, M. CASIRAGHI (2009): Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). Front. Zool. 6: 1.
 - FRKOVIĆ, A. (2009): Divokoza u Gorskom kotaru s posebnim osvrtom na Nacionalni park Risnjak. Biblioteka Risnjak, knjiga 2, Javna ustanova Nacionalni park Risnjak, Crni Lug.
 - GRAVES, P. R., T. A. J. HAYSTEAD (2002): Molecular biologist’s guide to proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 39-63.
 - HALEY, A. J. (1962): Role of host relationships in the systematics of helminth parasites. J. Parasitol. 48, 671-678
 - HILLYER, G. M., M. SOLER DE GALANES, J. RODRIGUEZ-PEREZ, J. BJORLAND, M. S. DE LAGRAVA, S. R. GUZMAN, R. T. BRYAN (1992): Use of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fascioliasis in the Bolivian Altiplano. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 603-609.
 - HUSCH, C. (2016): Diversity of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in Austria based on their genes and antigens. MSc Thesis. University of Vienna, Vienna, Austria.
 - HUSCH, C., H. SATTMANN, C. HÖRWEG, J. URSPRUNG, J. WALOCHNIK (2017): Genetic homogeneity of *Fascioloides magna* in Austria. Vet. Parasitol. 243, 75-78.
 - KAFLE, P., M. LEJEUNE, G. G. VEROCAI, E. P. HÖBERG, S. J. KUTZ (2015): Morphological and morphometric differentiation of dorsal-spined first stage larvae of lungworms (Nematoda: Protostrongylidae) infecting muskoxen (*Ovibos moschatus*) in the central Canadian Arctic. Int. J. Parasitol. Parasites. Wildl. 4, 283-290.
 - KONJEVIĆ, D., T. ŽIVIČNJAK, A. GUDAN KURILJ, M. SINDIČIĆ, F. MARTINKOVIĆ, D. STOJČEVIĆ JAN (2016): When things go wrong: *Cysticercus longicollis* in an adult wild red fox (*Vulpes vulpes*). Parasitol. Res. 115, 1345-1348.
 - 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.
 - KULEŠ, J., L. LOVRIĆ, A. GELEMANOVIĆ, B. BEER LJUBIĆ, I. RUBIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ (2021): Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. J. Proteomics 247, 104332.
 - KUMAR, S., S. GUPTA, A. MOHMAD, A. FULAR, B. C. PARTHASARATHI, A. KUMAR CHAUBEY (2021): Molecular tools-advances, opportunities and prospects for the control of parasites of veterinary importance. Int. J. Trop. Insect Sci. 41, 33-42.
 - LAAKSONEN, S., M. SOLISMAA, T. ORRO, J. KUUSELA, S. SAARI, R. KORTET, S. NIKANDER, A. OKSANEN, A. SUKURA (2009): *Setaria tundra* microfilariae in reindeer and other cervids in Finland. Parasitol. Res. 104, 257-265.
 - 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.

- 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.
- MCCALLUM, H., A. DOBSON (1995): Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol. Evol.* 10, 190-194.
- MORO, P., P. M. SCHANTZ (2009): Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 125-133.
- NDAO, M. (2009): Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases Volume 2009*, Article ID 278246, 15 pp.
- O'FARRELL, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- PANDEY, A., M. MANN (2000): Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846.
- PERKINS, S. L., E. S. MARTINSEN, B. G. FALK (2011): Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology* 138 (spec. issue 13), 1664-1667.
- RICHTER, S. (1959): Parasitic fauna of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in P. R. Croatia. *Vet. arhiv*, 29, 34-45.
- ROSSI, L., P. G. MENEGUZZI, P. DE MARTIN, M. RODOLFI (1995): The epizootiology of sarcoptic mange in chamois, *Rupicapra rupicapra*, from the Italian Eastern Alps. *Parassitologia* 37, 233-240.
- SEVERIN, K. (2009): Humoralni imunski odgovor jelena običnog (*Cervus elaphus*) prirodno invadiranog velikim američkim metiljem. Disertacija. Veterinarski fakultet, Zagreb.
- SEVERIN, K., F. MARTINKOVIĆ, D. KONJEVIĆ, A. MARINCULIĆ, Z. JANICKI, T. MAŠEK, P. DŽAJA (2015): Evaluation of different diagnostic techniques for the diagnosis of fascioloidosis in red deer. In: *Proceedings off the 6th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine* (Pendovski, L., ed.). Struga, Macedonia, p. 59.
- SILVA J. P., A. PENHA, F. JEANNIE, N. SANTOS (2014): Proteomic profile of *Ortleppascaris* sp.: A helminth parasite of *Rhinella marina* in the Amazonian region. *Int. J. Parasitol. Parasit. Wildl.* 3, 67-74.
- SWAN, J., D. SAKTHIVEL, T. C. CAMERON, P. FAOU, R. DOWNS, H. RAJAPAKSHA, D. PIEDRAFITA, T. BEDDOE (2019): Proteomic identification of galectin-11 and -14 ligands from *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 49, 921-932.
- THOMPSON, R. C. A., S. J. KUTZ, A. SMITH (2009): Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6, 678-693.
- WONG, S. S. Y., K. S. C. FUNG, S. CHAU, R. W. S. POON, S. C. Y. WONG, K.-Y. YUEN (2014): Molecular diagnosis in clinical parasitology: when and why? *Exp. Biol. Med.* 239, 1443-1460.
- YATAWARA, L., S. WICKRAMASINGHE, M. NAGATAKI, R. P. V. J. RAJAPAKSE, T. AGATSUMA (2007): Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Setaria digitata* of Sri Lanka based on CO1 and 12S rDNA genes. *Vet. Parasitol.*, 148, 161-165.

BESPLATNI OGLASI

Kupujem aparate za inhalacijsku anesteziju i monitoring pacijenta.
Email: ambulantalandia@gmail.com, Mob.: 091 664 4321.

Prodajem povoljno pokretni stol za obaranje goveda (korekcija papaka i drugi zahvati) marke Rosensteiner. Sve informacije na mob. 091 543 2103.

