Raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda Leptospira

Mojčec Perko, Vesna

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:828838

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Vesna Mojčec Perko

RAZNOLIKOST GENA GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI SKUPINE II U KONJA PRIRODNO INFICIRANIH PATOGENIM BAKTERIJAMA IZ RODA *LEPTOSPIRA*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2014.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Vesna Mojčec Perko

GENETIC DIVERSITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II IN HORSES NATURALLY INFECTED WITH PATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *LEPTOSPIRA*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2014.

„Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nenada Turka i doc. dr. sc. Ane Galov u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Molekularno kloniranje provedeno je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.“

Zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Nenadu Turku na stručnoj, znanstvenoj i financijskoj pomoći pri izradi ovog doktorskog rada, te na bezuvjetnoj podršci tijekom doktorskog studija.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ani Galov na pomoći i savjetima kod pisanja doktorskog rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Vilimu Starešini na financijskoj realizaciji mog doktorskog studija.

Prof. dr. sc. Zoranu Milasu hvala na podršci i uvijek vrijednim savjetima.

Zahvaljujem dr. sc. Haidi Arbanasić na stručnoj pomoći prilikom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem Viki Ivčević, mag. oecol. et prot. nat. na tehničkoj pomoći pri izradi doktorskog rada.

Hvala svim dragim kolegama, a ujedno i mojim prijateljima sa Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, na velikoj podršci i prijateljskim savjetima u trenucima kad mi je to bilo najpotrebnije.

Kolegicama, dr. sc. Josipi Habuš i doc. dr. sc. Zrinki Štritof Majetić, hvala na prijateljskim i stručnim savjetima, te bezgraničnoj podršci tijekom doktorskog studija.

Suprugu Branimiru, roditeljima i sestri veliko hvala što su uvijek uz mene, podržavaju me i vjeruju u mene.

Vesni i Darii zahvaljujem na uvijek prisutnoj prijateljskoj podršci.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

RAZNOLIKOST GENA GLAVNOGA SUSTAVA TKIVNE PODUDARNOSTI SKUPINE II U KONJA PRIRODNO INFICIRANIH PATOGENIM BAKTERIJAMA IZ RODA *LEPTOSPIRA*

VESNA MOJČEC PERKO
Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Leptospiroza je akutna septikemijska zarazna bolest brojnih vrsta domaćih i divljih životinja, ali i čovjeka, uzrokovana patogenim bakterijama iz roda *Leptospira*. U konja na području Republike Hrvatske utvrđena je visoka seroprevalencija leptospiroze. Izrazito važnu ulogu u prepoznavanju patogenih mikroorganizama i pokretanju imunosnog odgovora domaćina ima glavni sustav tkivne podudarnosti skupine II (MHC II). U ovom istraživanju analiziran je glavni nositelj genske raznolikosti MHC II regije - egzon 2, DRA i DRB lokusa u 200 konja, 100 inficiranih leptospirama i 100 neinficiranih. Pronađeno je pet DRA i 14 DRB alela, od čega je šest DRB alela utvrđeno po prvi puta. Svaki alel daje jedinstveni aminokiselinski slijed. Utvrđen je 41 DRA/DRB haplotip. Visoka raznolikost alela i postojanje trans-specijskog polimorfizma pokazatelji su djelovanja ravnotežne selekcije na lokusima. Statističkim analizama su utvrđene naznake pravila grupiranja jedinki prema haplotipu i serovaru leptospira na koji jedinka pokazuje serološki odgovor, no zbog malog broja jedinki koje pripadaju pojedinoj kategoriji nije moguće pouzdano utvrditi općenita pravila koja bi vrijedila za cjelokupnu populaciju konja.

(182 stranice, 28 slika, 12 tablica, 260 literaturnih navoda, jezik izvornika – hrvatski)

Ključne riječi: *Equus caballus* / leptospiroza / MHC / DRA / DRB

Mentori: *Dr. sc. Nenad Turk, redoviti profesor*
Dr. sc. Ana Galov, docent

Ocjenjivači: *Dr. sc. Jasna Hrenović, izvanredni profesor*
Dr. sc. Haidi Arbanasić, stručni savjetnik
Dr. sc. Zoran Milas, redoviti profesor

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Doctoral Thesis

GENETIC DIVERSITY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II IN HORSES NATURALLY INFECTED WITH PATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *LEPTOSPIRA*

VESNA MOJČEC PERKO
Department of microbiology and infectious diseases with clinic
Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Leptospirosis is a zoonotic disease of worldwide distribution caused by pathogenic bacteria of the genus *Leptospira*. High seroprevalence of leptospirosis was determined in horse population of Croatia. The major histocompatibility complex class II (MHC II) has a crucial role for patogen presentation to cells of the immune system and initiation of the immune response. The main carrier of genetic variability of MHC II region is exon 2. The genetic diversity and evolutionary history of the exon 2 DRA and DRB loci were analysed in 200 horses, 100 leptospira infected and 100 uninfected. Five DRA and 14 DRB alleles were detected, while six DRB alleles were new. Each allele results in a single amino acid sequence. 41 haplotypes were found. Highly diverged allele sequences and occurrence of trans-species polymorphism provide evidence for action of balancing selection on both loci. The statistical analyzes showed some indications of the rules of grouping individuals according to haplotype and leptospira serovar in which an individual shows serologic response, but due to the small number of individuals in a particular category is not possible to apply certain rules to the entire population of horses.

(182 pages, 28 figures, 12 tables, 260 references, original in Croatian)

Keywords: *Equus caballus* / leptospirosis / MHC / DRA / DRB

Supervisors: *Nenad Turk, PhD, Full Professor*
Ana Galov, PhD, Assistant Professor

Reviewers: *Jasna Hrenović, PhD, Associate Professor*
Haidi Arbanasić, PhD, Expert Associate
Zoran Milas, PhD, Full Professor

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 5
2.1 Konj (*Equus caballus,* Linnaeus, 1758.) 5
2.1.1 Opće osobine konja 5
2.1.2 Sistematika 7
2.1.3 Evolucija konja 8
2.2 Leptospiroza 13
2.2.1 Povijest leptospiroze 13
2.2.2 Etiologija leptospiroze 14
2.2.2.1 Taksonomija leptospira 15
2.2.3 Morfologija leptospira 17
2.2.4 Biokemijska i uzgojna svojstva leptospira 20
2.2.5 Struktura genoma leptospira 21
2.2.6 Epizootiologija i epidemiologija leptospiroze 21
2.2.7 Patogeneza leptospiroze 24
2.2.8 Leptospiroza u konja 26
2.2.8.1 Klinička slika leptospiroze u konja 27
2.2.8.1.1 Akutni oblici leptospiroze u konja 27
2.2.8.1.2 Kronični oblici leptospiroze u konja 28
2.2.9 Leptospiroza u ostalih domaćih životinja 28
2.2.9.1 Leptospiroza u goveda 28
2.2.9.2 Leptospiroza u svinja 29
2.2.9.3 Leptospiroza u koza i ovaca 29
2.2.9.4 Leptospiroza u pasa 29
2.2.9.5 Leptospiroza u mačaka 30
2.2.10 Leptospiroza u ljudi 30
2.2.11 Dijagnostika leptospiroze 31
2.2.11.1 Metode izravnog dokazivanja leptospira u krvi, tjelesnim tekućinama i histopatološkim preparatima 31
2.2.11.2 Molekularne metode dokazivanja prisutnosti leptospira 32
2.2.11.3 Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala 32

2.2.11.4 Serološke metode dijagnostike leptospiroze 33
2.2.11.4.1 Metoda mikroskopske aglutinacije (MAT) 33
2.2.12 Proteomika u istraživanjima leptospiroze 34
2.2.13 Liječenje i prevencija leptospiroze 35
2.2.13.1 Liječenje leptospiroze 35
2.2.13.2 Prevencija leptospiroze 35
2.3 Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC sustav) 36
2.3.1 Otkriće MHC gena 37
2.3.2 Struktura MHC molekula 38
2.3.2.1 MHC molekule skupine I 38
2.3.2.2 MHC molekule skupine II 39
2.3.3 Funkcija MHC molekula skupine I i II u imunosnom sustavu 41
2.3.4 Geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti 42
2.3.5 Evolucija gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti 43
2.3.6 Polimorfnost MHC genske regije 43
2.3.7 Testovi selekcije 46
2.3.7.1 Testovi selekcije u sadašnjoj populaciji 46
2.3.7.2 Testovi selekcije kroz povijest populacije 47
2.3.7.3 Testovi selekcije kroz evoluciju vrste 48
2.3.8 Povezanost polimorfizma MHC gena s prijemljivosti i otpornosti jedinke na infekciju patogenim mikroorganizmima i infestaciju različitim vrstama parazita 49
2.3.9 MHC genski sustav porodice Equidae 53
2.3.10 Dosadašnja istraživanja polimorfizma ELA genske regije skupine II 54
3. MATERIJAL I METODE 57
3.1 Uzorci seruma ili krvi konja 57
3.2 Metoda mikroskopske aglutinacije (MAT) 57
3.3 Izdvajanje DNA iz krvi ili seruma 60
3.4 Genotipizacija DRA i DRB lokusa 62
3.4.1 PCR reakcija za umnažanje ciljnog dijela DRA lokusa 63
3.4.2 PCR reakcija za umnažanje ciljnog dijela DRB lokusa 64
3.4.3 „Poluugniježdena“ PCR reakcija za umnažanje dijela DRB1 lokusa kod pojedinih uzorka 66
3.4.4 Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu 68
3.4.5 Pročišćavanje PCR proizvoda 70

3.4.6 Sekvenciranje i analiza DNA sljedova ... 71
3.4.7 Identifikacija alela programom SeqScape ... 72
3.4.8 Kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora ... 73
3.4.9 Sekvenciranje proizvoda kloniranja ... 77
3.5 Genske analize ... 78
3.5.1 Utvrđivanje dvolokusnih haplotipova ... 78
3.5.2 Program MEGA 6.06 ... 78
3.5.2.1 Odabir modela supstitucije ... 78
3.5.2.2 Evolucijske udaljenosti ... 79
3.6 Dokazivanje djelovanja pozitivne selekcije na DRA i DRB lokusima ... 79
3.6.1 dN/dS test ... 79
3.7 Filogenijska analiza ... 80
3.8 Program PAML ... 81
3.9 Statističke analize ... 82
4. REZULTATI ... 83
4.1 Osobitosti DRA i DRB lokusa u istraživanoj populaciji konja ... 83
4.1.1 DRA lokus ... 83
4.1.2 DRB lokus ... 86
4.1.3 DRA/DRB haplotipovi ... 93
4.2 Evolucijske udaljenosti među alelima DRA i DRB lokusa ... 95
4.3 Selekcija na DRA i DRB lokusima ... 96
4.3.1 dN/dS test ... 96
4.3.2 PAML analiza ... 97
4.4 Filogenijska analiza ... 100
4.4.1 Filogenijsko stablo DRA alela ... 100
4.4.2 Filogenijsko stablo DRB alela ... 102
4.5 Statističke analize podataka ... 104
4.5.1 Analize grupiranja jedinki ... 104
4.5.1.1 *Fuzzy clustering* grupiranje jedinki prema serološkom odgovoru jedinki na leptospirozu ... 105
4.5.1.2 *Fuzzy clustering* analiza grupiranja jedinki prema DRA/DRB haplotipovima ... 106
4.5.1.3 *Fuzzy clustering* analiza grupiranja jedinki prema serovaru leptospira i DRA/DRB haplotipu ... 107

4.5.2 Višestruka analiza povezanosti 107
5. RASPRAVA 112
6. ZAKLJUČCI 122
7. LITERATURA 122
8. PRILOZI 147
9. ŽIVOTOPIS 177

1. UVOD

Leptospiroza je akutna septikemijska zarazna bolest mnogih domaćih i divljih životinja, ali i čovjeka koju uzrokuje heterogena skupina bakterija iz roda *Leptospira* (Zaharija i sur., 1982.). Održivost leptospira u prirodi usko je povezana s mišolikim glodavcima kao rezervoarima bolesti i pojedinim domaćim životinjama (evolucijskim domaćinima), te klimatskim i edafskim čimbenicima koji utječu na njihovo preživljavanje izvan domaćina. Nakon infekcije rezervoara i evolucijskih domaćina, leptospire naseljavaju proksimalne bubrežne kanaliće, te takve životinje vrlo dugo, pa čak i doživotno, ostaju kliconoše i urinom izlučuju leptospire u okoliš (Faine i sur., 1999.). Infektivni urin i onečišćeni okoliš predstavljaju izvore infekcije za ostale životinje i ljude (slučajni domaćini) u koje leptospire ulaze preko sluznica ili oštećene kože. Kliničko očitovanje leptospiroze vrlo je raznoliko, a ovisi prvenstveno o prijemljivosti vrste i virulenciji infektivnog soja. Bolest može proći inaparentno, ali može uzrokovati i vrlo teške kliničke oblike sa zatajenjem bubrega i posljedičnim letalnim ishodom.

U konja je prvi slučaj prirodne infekcije bakterijom *Leptospira* spp. zabilježen 1947. godine u Rusiji (Ljubašenko i Novikova, 1947.), dok se u Hrvatskoj prvi klinički nalaz leptospiroze u konja opisuje svega nekoliko godina kasnije, 1951. godine (Zaharija, 1953.). Od tada su provedena mnoga istraživanja koja su se bavila leptospirozom konja. Smatra se tako da je u tijeku evolucijska prilagodba konja na serovar Bratislava (Ellis, 1999.), no zabilježene su i česte infekcije konja serovarima Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae i Canicola (Faine i sur., 1999.). Slične rezultate nalazimo i pri istraživanjima provedenim u Republici Hrvatskoj koji ukazuju na visoku seroprevalenciju leptospiroze u populaciji konja (Cvetnić i sur., 2004.) s najvećom učestalosti vjerojatnih infektivnih serovara serološke skupine Australis, Pomona i Grippotyphosa (Habuš i sur., 2008., Turk i sur., 2013.). Bolest u konja vrlo često prolazi inaparentno, a klinička leptospiroza u konja najčešće se povezuje s pobačajima (Ellis i O'Brien, 1988.) i mjesečnom sljepoćom (Woolanke i sur., 1998.) koji zapravo predstavljaju kronično očitovanje leptospiroze. U kroničnoj fazi povremeno izlučuju uzročnika urinom i nekoliko mjeseci nakon infekcije. Zbog toga konji predstavljaju izvor infekcije za okolinu, odnosno za ljude i domaće životinje koje se nalaze u njihovoj blizini (Faine i sur., 1999.). Izrazito važnu ulogu u prepoznavanju patogenih mikroorganizama i pokretanju imunosnog odgovora domaćina ima glavni sustav tkivne podudarnosti skupine II (MHC II). Dio MHC sustava kodira stanične površinske glikoproteine, odnosno receptore koji vežu antigene i prikazuju ih pomoćničkim T-limfocitima. Domenska građa receptora određena je organizacijom egzona 2 koji kodira vezni žlijeb receptora. U vezni žlijeb sjeda peptidni fragment antigena. Varijacije u građi veznog žlijeba uzrokuju i varijacije u afinitetu

prema pojedinim antigenskim peptidima, ovisno o njihovoj građi. Posljedica je toga postojanje veće ili manje sklonosti pojedinog receptora prema antigenu. Na genskoj razini, glavni nositelj polimorfizma je egzon 2. Različitost među alelima koncentrirana je u tom dijelu gena pa se zbog toga u istraživanjima gena MHC skupine II kao pokazatelj funkcionalnog polimorfizma redovito analizira egzon 2. Na njegovoj se raznolikosti temelji i varijabilnost funkcionalnog dijela receptora (Hughes i Yeager, 1998., Kindt i sur., 2007.). Sposobnost receptora da veže različite antigenske peptide raste s razinom raznolikosti unutar te genske regije MHC. Građa receptora tako izravno utječe na pokretanje i učinkovitost imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odnosno njegovu prijemljivost ili otpornost na infekcije (Kindt i sur., 2007.). Polimorfizam egzona 2 ima utjecaj na usporednu evoluciju domaćina i patogenog mikroorganizma (Bernatchez i Landry, 2003.). Provedena su brojna istraživanja raznolikosti MHC genskih regija kod ljudi i životinja kako bi se utvrdila veza između određenih MHC alela i bolesti. Najčešće su to bolesti uzrokovane različitim patogenim virusima, bakterijama i parazitima (Deter i sur., 2008., Fernandez-de-Mera i sur., 2009., Schwensow i sur., 2010., Cutrera i sur., 2011.). U istraživanju raznolikosti genske regije HLA i leptospiroze u ljudi dokazana je povezanost prisutnosti HLA-DQ6 alela s pozitivnim serološkim nalazom na leptospirozu (Lingappa i sur., 2004.).

Kroz mnoga dosadašnja istraživanja utvrđena je visoka razina polimorfizma egzona 2 DRA i DRB lokusa MHC skupine II u konja (Albright-Fraser i sur., 1996., Brown i sur., 2004., Arbanasić i sur., 2009., Janova i sur., 2009., Andersson i sur., 2012.). Funkcionalno značajan polimorfizam DRA lokusa nađen je samo u porodici *Equidae* (Albright-Fraser i sur., 1996.; Brown i sur, 2004., Janova i sur., 2009., Arbanasic i sur., 2009., Arbanasic i sur., 2013.).

Opseg rada

Obzirom na relativno visoku seroprevalenciju leptospiroze u konja u R. Hrvatskoj i na važnu ulogu gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II u pokretanju imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odlučila sam istražiti raznolikost MHC II gena u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda *Leptospira* u odnosu na raznolikost istih gena u konja koji nisu inficirani. Za istraživanje sam odabrala 200 seruma ili krvi konja koji su dio arhive Laboratorija za leptospire Veterinarskog Fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Na temelju rezultata testa mikroskopske aglutinacije, odabrala sam pozitivnu skupinu konja koja je uključivala jedinke kod kojih je utvrđen titar protutijela na leptospirozu 1600 i veći, te negativnu skupinu koja je uključivala jedinke s utvrđenim titrom protutijela

< 50. U provedenim genskim analizama istraživala sam polimorfizam egzona 2 DRA i DRB genskih lokusa MHC skupine II odabranih jedinki. Analizirala sam broj i vrstu alela svakog lokusa, te stupanj raznolikosti među alelima pronađenim u istraživanoj populaciji konja. Testiranjem aminokiselinskih sljedova pronađenih alela, dokazala sam djelovanje pozitivne selekcije na oba lokusa. Filogenijskim analizama istraživala sam odnose među alelima pojedinog lokusa. Statističkim metodama analizirala sam povezanost DRA/DRB haplotipa i serovara leptospira na koji jedinka pokazuje serološki odgovor.

Metode

Glavni nositelj polimorfizma MHC gena skupine II je egzon 2. Na njegovoj se raznolikosti temelji varijabilnost funkcionalnog dijela receptora (Hughes i Yeager, 1998., Kindt i sur., 2007.). Sposobnost receptora da veže različite antigenske peptide raste s razinom raznolikosti unutar te MHC II genske regije. Razina polimorfizma prisutna na lokusima te genske regije u izravnoj je vezi s pokretanjem imunosnog odgovora na različite patogene mikroorganizme (Kindt i sur. 2007). U istraživanju raznolikosti egzona 2 DRA i DRB lokusa rabila sam sljedeće laboratorijske molekularne metode: lančana reakcija polimerazom, elektroforeza u agaroznom gelu, sekvenciranje i kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora. Za filogenijske analize sam koristila sljedeće računalne programe: SeqScape 2.5 (Applied Biosystems), MEGA 6.06 (Tamura i sur., 2013.), Arlequin 3.11. (Excoffier i sur., 2005.), BioEdit (Hall, 1999.) i PAML (Yang, 2007.). Za statističke analize koristila sam *fuzzy c-usrednjenu rojnu analizu* (FCMCA, *eng*. fuzzy c-means cluster analysis) i višestruku analizu povezanosti (MCA, *eng.* Multiple correspondence analysis) u okviru R programskog sučelja (R Development Core Team, 2014.).

Cilj

Cilj ovog rada bio je istražiti polimorfizam gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda *Leptospira* i usporediti ga s polimorfizmom istih gena u konja koji nisu inficirani. Polimorfizam alela genskih lokusa MHC skupine II pružit će uvid u imunosnu kompetentnost jedinki, te će se na osnovu njega pojedini aleli moći povezati s većom ili manjom, genski uvjetovanom prijemljivošću, odnosno otpornošću konja na infekciju patogenim bakterijama iz roda *Leptospira*.

Svrha

Po prvi puta u istraživanju molekularne epizootiologije leptospiroze u konja istraživana je raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II. Rezultati istraživanja doprinijeti će poznavanju genske strukture MHC skupine II u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda *Leptospira* u odnosu na one koji nisu inficirani. Također, na osnovu utvrđene raznolikosti, odnosno prisutnosti određenih alela koji uvjetuju razinu prijemljivosti konja na infekciju, ovaj rad će uvelike doprinijeti razjašnjavanju do sada potpuno neistraženog dijela patogeneze leptospiroze u konja.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1 Konj (*Equus caballus,* Linnaeus, 1758.)

2.1.1 Opće osobine konja

Konji su porodica sisavaca iz reda neparnoprstaša. Toj porodici pripada samo jedan živući rod, rod *Equus*. Uz porodicu Equidae, redu neparnoprstaša pripadaju još i porodice Tapiridae (tapiri) i Rhinocerotidae (nosorozi). Red neparnoprstaša, kako mu i samo ime govori, odlikuje se neparnim brojem prstiju. U konja je to jedan jedini prst, treći prst (Kent i Carr, 2000.). Zadnji zglob trećeg prsta u konja završava kopitom. Ostali prsti na kosturu postoje još samo kao rudimenti.

Prvi konji bili su veličine manjeg psa. Imali su stopalo sa četiri prsta na prednjim nogama, i tri na stražnjim. Značajna osobina konja je redukcija broja prstiju. Sve danas živuće vrste imaju samo jedan prst koji koriste (Monodactylie). To je treći prst. Svi ostali prsti su se povukli i na kosturu postoje još samo kao rudimenti. Kopita "obuvaju" zadnji zglob trećeg prsta.

Konji su krupne životinje s relativno velikom glavom i dugim ekstremitetima. Dužina od glave do repa je između 200 i 300 cm. Dužina repa je od 30 do 60 cm. Visina u grebenu im je od 100 do 160 cm. Dlačni pokrivač im je gust i najčešće kratak. Većina vrsta ima na vratu, tjemenu i repu duge dlake (grivu). Boja dlake u većine vrsta s gornje strane je siva ili smeđa, a s donje bjelkasto-siva.

Glava konja je snažna i izdužena. Imaju dugu i usku nosnu kost. Oči su smještene daleko straga, bočno na glavi, što im omogućuje vidno polje od gotovo punog kruga (350°). Konji ne razlikuju baš najbolje boje. Jako dobro vide bijelu, žutu i plavu boju, dok ne razlikuju smeđu od zelene i sive boje. Čeljusni zglob je smješten visoko. Donja čeljust je povećana. Uške su duge i vrlo pokretljive. Okretanjem uški prema naprijed, konj pokazuje pažnju i znatiželju, no ako ih okrene prema natrag i priljubi uz glavu, to je upozorenje čime pokazuje agresivnost ili strah. U svakoj polovici čeljusti ima tri sjekutića. Očnjak u pravilu imaju samo mužjaci, ženke ga ili nemaju, ili je vrlo malen. Iza njih imaju prazninu, koja se naziva krezubi rub ili dijastema. U svakoj polovici čeljusti imaju najčešće tri pretkutnjaka i tri kutnjaka. Pretkutnjaci i kutnjaci su vrlo slično građeni, te su i prilagođeni tvrdoj hrani.

Konji su biljojedi. Hrane se uglavnom travom, lišćem i drugim dijelovima biljaka (slika 1). Mogu preživjeti bez vode duže vrijeme. Razgradnja hrane kod konja odvija se tek u crijevima, što znači da se i najveći dio probave odvija u crijevima. Želudac im je jednostavno građen. Ima sam jednu komoru. Fermentacija se odvija u slijepom crijevu i u do 4 metra dugom debelom crijevu.

Danas divlji oblici još živućih vrsta porodice konja žive u istočnim i južnim dijelovima Afrike i u središnjoj Aziji.

Čovjek je domaće konje i magarce proširio cijelim svijetom. U nekim zemljama danas u prirodi žive i potomci populacija divljih vrsta konja (Australija, SAD).

Prema svrsi uzgoja, konji se dijele na tri osnovna tipa: hladnokrvne, toplokrvne i punokrvne konje. U nekih hladnokrvnih pasmina tjelesna masa može doseći i 800 kg (slika 1). Koriste su uglavnom za rad u polju, rudnicima ili u šumama. Toplokrvni konji su konji za jahanje, dresuru i preponsko skakanje. Lakše su građe i pokretljiviji su od hladnokrvnjaka. Punokrvni konji su puno osjetljiviji na bolesti. Dosežu brzinu i do 70 km/h. Polukrvni konji su križanci toplokrvnih i punokrvnih konja. Nazivi hladnokrvni, toplokrvni i punokrvni označavaju njihov temperament.



Slika 1. Hladnokrvni konji na ispaši
(izvor: http://www.theequinest.com/images/hladnokrvnjak.jpg).

2.1.2 Sistematika

Carstvo: Animalia (Životinje)
Koljeno: Chordata (Kralješnjaci)
Razred: Mammalia, Linnaeus, 1758. (Sisavci)
Red: Perissodactyla, Owen, 1848. (Neparnoprstaši)
Porodica: Equidae, Gray, 1821. (Konji)

Rod: *Equus,* Linnaeus, 1758.

Vrste: *E. africanus* (ili *E. asinus),* Heuglin i Fitzinger, 1866. - divlji magarac
E. asinus, Gray, 1824. - afrički divlji magarac ili obični magarac
E. burchellii, Gray, 1824. - Burchellova zebra
E. caballus, Linnaeus, 1758. - domaći konj
E. ferus, Linnaeus, 1758. - divlji konj
E. grevyi, Oustalet, 1882. - Grevijeva zebra
E. hemionus, Pallas, 1775. - azijski polumagarac
E. kiang, Kinloch, 1869. - kiang
E. onager, Pallas, 1775. - onager
E. quagga, Boddaert, 1785. - stepska zebra
E. zebra, Linnaeus, 1758. - brdska zebra

Još je uvijek sporan točan broj vrsta porodice konja. Najčešće se spominju sljedeće vrste:

- divlji konj *(Equus ferus)* - u prirodi izumro u šezdesetim godinama prošlog stoljeća (divlji konj Przewalskoga (*Equus ferus przewalski).* Iz zooloških vrtova diljem svijeta su puštene u prirodu jedinke te vrste. Procjenjuje se da danas slobodno živi u prirodi oko 2 000 jedinki. Divlji konj je izvorni oblik domaćeg konja.
- domaći konj *(Equus caballus)* je pripitomljena vrsta divljeg konja i zajedno s magarcima i zebrama spada u porodicu konja (Equidae).
- afrički divlji magarac (*Equus asinus*) ili divlji (pravi) magarac. U prirodi je jako ugrožen. Vrlo malo jedinki živi u Eritreji, Etiopiji i Somaliji. Afrički magarac je izvorni oblik domaćeg magarca.

- azijski polumagarac (*Equus hemionus*) - vrsta koja ima više podvrsta (onager, kulan i dr.). Za razliku od afričkih, azijski magarac nikada nije pripitomljen.
- kiang (*Equus kiang*) - vrsta koju su ranije smatrali podvrstom azijskog polumagarca, ali on je krupniji i sličniji konju od njega. Živi na tibetanskoj visoravni i područjima uz nju.
- Grevijeva zebra (*Equus grevyi*) - vrsta prepoznatljiva po vrlo uskim prugama. Spada u ugrožene vrste.
- brdska zebra (*Equus zebra*) - ima dvije podvrste koje obitavaju u Namibiji i Južnoj Africi. Najmanja vrsta zebri.
- stepska zebra (*Equus guagga*) - živi južno od Sudana do Južne Afrike. Prepoznatljiva je po prugastom trbuhu i „zasjenčanim" prugama između tamnih pruga.
- Kuaga - zebra izumrla krajem 19. stoljeća. Imala je pruge samo na glavi i vratu. Smatra se da je bila podvrsta stepske zebre, no ponekad je se navodi kao samostalnu vrstu.

Postoje i razni križanci između pojedinih vrsta.

2.1.3 Evolucija konja

Evolucija konja započela je prije oko 55 milijuna godina, u eocenu. Otada je konj prošao kroz čitav niz faza evolucije (*Eohippus, Mesohippus, Miohippus, Mercyhippus* i *Pliohippusda*), da bi konačno došao do oblika u kojem ga danas poznajemo. Tijekom evolucije reda Perissodactyla održale su se porodice Equidae, Rhinocerotidae i Tapiridae, dok su ostale članice izumrle. Smatra se da je do odvajanja porodice Equidae od porodica Rhinocerotidae i Tapiridae došlo već u ranom eocenu. Porodice Rhinocerotidae i Tapiridae odvojile nešto kasnije, u kasnom eocenu. Preci današnjeg konja živjeli su već prije 55 milijuna godina. Bili su to sisavci veličine lisice, koji su svojedobno prebivali na području današnje Europe (*Hyratchterium*), odnosno Sjeverne Amerike (*Eohippus*). Težili su oko 50 kilograma. Dobro su se prilagodili toploj tropskoj klimi s obilnim padalinama i bujnom vegetacijom. Pretežno su boravili u šumama, hraneći se lišćem i plodovima šumskih biljaka. Već se kod njih nazire kržljanje prvog i petog prsta prednjih i stražnjih nogu. Naredni evolucijski oblik konj bio je *Mesohippus* koji je živio prije 40 do 30 milijuna godina. Bio je veličine današnje ovce. Imao je razvijena tri i zakržljali četvrti prst. Promjena prehrambenih navika, vidljiva kroz pojavu molariziranih pretkutnjaka, dogodila se kao odgovor na

vegetacijske promjene njegovog okruženja (Ivanković, 2004.). Od Mesohippusa do današnjeg roda *Equus* izmjenilo se više evolucijskih oblika. Konj, obličja kojeg mi poznajemo, nastao je otprilike prije 10 milijuna godina. Današnji konji teže i do 800 kg. Ta izrazita promjena oblika i veličine, rezultat je klimatskih i geografskih, te hranidbenih mijena tijekom milijuna godina. Domestikacija (udomaćivanje) konja uslijedila je u mlađem, te u srednjem kamenom dobu, odnosno od 10000 do 2000 godina prije Krista. Domaći konj, današnjeg obličja, pojavio se u Europi između 3000. i 2000. godine prije Krista. Danas u svijetu ima više od 75 milijuna domaćih konja, podijeljenih u 100 različitih pasmina.

2.1.4. Pasmine konja u Republici Hrvatskoj

Autohtone i zaštićene pasmine domaćih životinja naslijeđe su Republike Hrvatske, a njihova se vrijednost očituje na ekonomskoj, prirodnoj i kulturološkoj razini. U autohtone i zaštićene pasmine konja R. Hrvatske ubrajaju se konji hladnokrvne pasminske skupine (hrvatski hladnokrvnjak, hrvatski posavski konj i međimurski konj) i lipicanci. Neke su pasmine konja nažalost gotovo izumrle (krčki poni). Iako su autohtone pasmine u ukupnoj populaciji konja u R. Hrvatskoj zastupljene s dominantnim udjelom od 70%, na osnovu veličine njihovih populacija svrstava ih se u skupinu ugroženih pasmina. Toplokrvna pasminska skupina zastupljena je sa 17%, dok ostatak populacije konja čine lipicanci (9%) i poniji (3%) (Godišnje izvješće HSC, 2003.). Brojno stanje autohtonih i zaštićenih pasmina u Republici Hrvatskoj prikazani su u tablici 1 (Radović i sur., 2009.). Proteklih desetljeća zapaženi su značajni pomaci u znanstvenom istraživanju naših autohtonih pasmina konja, njihovom standardiziranju i usmjeravanju kroz uzgojne programe. Sustavom financijske potpore, država uzgajivačima izvornih pasmina konja pomaže u zaustavljanju trenda pada brojnosti ovih populacija. Medijskom promocijom autohtonih pasmina, postignuta je visoka osjetljivost javnosti prema očuvanju genomskih resursa u konja, kao dijela ukupne hrvatske baštine. Godine 2011. izdana je *Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske*. Dokument je to koji prikazuje trenutno stanje izvornih pasmina i njihovih prirodnih staništa, te analizira njihove uloge i utjecaj u očuvanju ukupne biološke raznolikosti Republike Hrvatske. Predstavljene su 33 hrvatske priznate autohtone i zaštićene pasmine domaćih životinja, među kojima su i pasmine konja - međimurski konj, hrvatski posavac, hrvatski hladnokrvnjak i lipicanac (Ozimec i sur., 2011.).

Tablica 1. Autohtone i zaštićene pasmine konja u Republici Hrvatskoj, veličina populacije i kategorizacija obzirom na ugroženost (Radović i sur., 2009.).

Pasmina	Broj uzgojno valjanih jedinki				Kategorizacija statusa pasmine obzirom na ugroženost
	Ukupno	Pod kontrolom			
		Muško	Žensko	Ždrijebe	
međimurski konj	37	7	21	9	kritično ugrožena
hrvatski posavac	4350	116	1838	2396	potencijalno ugrožena
lipicanac	1224	177	396	651	nije ugrožena
hrvatski hladnokrvnjak	5334	203	2778	2353	potencijalno ugrožena

Najzastupljenije pasmine konja u R. Hrvatskoj:

- hrvatski posavac (slika 2) - pasmina koja je nastala u područjima slivnog toka rijeke Save po čemu je i dobila naziv. Danas se najviše uzgaja u Sisačko - moslavačkoj i Zagrebačkoj županiji (okolica Velike Gorice). Sinonimni nazivi su posavski konj, posavski bušak i posavec. Živi u prirodi na otvorenom. Otporan je na vremenske neprilike i skromnih je zahtjeva. Ima čvrsto i zbijeno tijelo. Blage je ćudi i poslušan. Pasmina je ugrožena. Prema istraživanju iz 2000. godine, ima još samo nešto više od 1000 živućih jedinki. Prije pojave moderne mehanizacije imao je značajnu ulogu u poljoprivredi. Danas se uzgaja uglavnom u rekreativne i turističke svrhe.



Slika 2. Hrvatski posavac



Slika 3. Međimurski konj

(izvor: http://hr.wikipedia.org/wiki/Hrvatski_posavac, http://hr.wikipedia.org/wiki/Medjimurski_konj).

- međimurski konj (slika 3) - pasmina hladnokrvnog tipa, nastala na području današnje Međimurske županije. U Međimurju ima svega nekoliko desetaka primjeraka (oko 40) i spada u čistokrvne pasmine ugrožene od izumiranja. U nešto većem broju održao se u susjednoj Mađarskoj. Krupnog je rasta i čvrste građe tijela, visine grebena 155-165 cm. Glava mu je razmjerno mala. Ima male i šiljate uši, te kratki i mišićavi vrat, široka prsa i leđa, te kratke, snažne noge. Pastusi dosežu težinu i do 900 kilograma. Izdržljiva je i pasmina otporna na bolesti. Prije se koristio kao radni konj za vuču i rad u poljoprivredi, danas sve više služi za proizvodnju mesa.

- hrvatski hladnokrvnjak (slika 4) - najbrojnija hrvatska autohtona pasmina konja. Pasmina je nastala križanjem toplokrvnih pasmina s uvezenim hladnokrvnim pasminama. Ima čvrsto tijelo, jake kosti i veliku glavu. Otporan je na bolesti, dobre je plodnosti i skromnih prehrambenih navika. Spada u radne pasmine. Najviše se uzgaja u središnjoj Hrvatskoj, te u okolici Siska.





Slika 4. Hrvatski hladnokrvnjak Slika 5. Hrvatski toplokrvnjak
(izvor: http://hr.wikipedia.org/wiki/Hrvatski_hladnokrvnjak,
http://www.ergela- djakovo.hr/en/konji-ergele).

- hrvatski toplokrvnjak (slika 5) - hrvatska pasmina konja koja se uglavnom koristi za sport. Izrazito je prilagodljiva pasmina. Otporna je na bolesti i skromnih prehrambenih navika. Mužjak i ženka se fenotipski razlikuju (spolni dimorfizam). Snažne je tjelesne građe i harmoničnog izgleda. Postoje dva uzgojna tipa:

  1. uzgojni tip toplokrvnjaka koji se koristi za preponsko jahanje i dresuru

  2. uzgojni tip toplokrvnjaka koji se koristi za terensko jahanje, vuču zaprega i daljinsko jahanje

- hrvatski kasač (slika 6) - početci uzgoja hrvatskih kasača vežu se uz kvalitetna grla iz ergele u Turnišću i Ljutomeru. Američki kasač bila je osnovna pasmina za oblikovanje hrvatskog kasača. Zbog nedostatka vlastite dostatne genetske osnove iz drugih zemalja se uvoze kvalitetni rasplodni pastusi. Visina grebena te pasmine je od 155 do 160 cm. Glava im je konveksnog profila, umjerene veličine sa živahnim očima. Vrat je dug, a greben umjereno izražen. Grudni koš je širok i dubok radi dostatnosti kapaciteta pluća. Podržavaju siguran, izdašan i čist hod. Najčešće pasminske boje su dorata, alata i vrana.



Slika 6. Hrvatski kasač



Slika 7. Krčki poni

(izvor: http://nuberius.bloger.index.hr, http://bjelovar-cro.blogspot.com/2012/05/).

- krčki poni (slika 7) - hrvatska gotovo izumrla autohtona pasmina konja koja potječe s otoka Krka. Tijelo im je maleno i čvrsto. U prošlosti su se koristili za jahanje i vuču.

- lipicanac (slika 8) - svjetski poznata pasmina konja, nastala 1580. god. na slovenskom kraškom području tadašnje Habsburške Monarhije. Ergelu je u Lipici utemeljio austrijski nadvojvoda Karlo. U Hrvatskoj se lipicanci počinju uzgajati 1806. godine u Đakovu. U 19. stoljeću nastaje zasebna linija pastuha *Tulipan.* Lipicanci su se najviše uzgajali u u Slavoniji, jer su zadovoljavali tadašnje potrebe za jačim i većim konjima, dobroćudne su naravi i neizbirljivi za hranu. Zanimljiva je činjenica da se ždrijebe lipicanca rađa sasvim crno, a kako raste tako bijeli, mada postoji mogućnost da i ostane crno.



Slika 8. Pasmina lipicanac

(izvor: http://www.agricola.kapelica.com.hr/).

2.2 Leptospiroza

2.2.1 Povijest leptospiroze

Bolest koja je danas poznata kao leptospiroza spominje se puno prije no što je opisan njen uzročnik i postavljena racionalna osnova za razvoj medicinskih i znanstvenih spoznaja o toj bolesti. Simptomi koji odgovaraju današnjem opisu leptospiroze opisivani su još u drevnoj Kini kao bolest berača riže. U Japanu je tradicionalno ime za leptospirozu bilo *Nanukayami*, u prijevodu sedmodnevna jesenska groznica (Faine i sur., 1999.). Febrilna bolest praćena žuticom u uzgajivača stoke spominjana je u zapisima mnogih dijelova svijeta od Indije, do Kine i Europe. Najčešće su se za leptospirozu rabili nazivi koji su bili u izravnoj vezi sa zanimanjem ljudi koji su obolijevali od te bolesti. Tako u različitim dijelovima svijeta kroz povijest nailazimo na nazive "bolest sjekača šećerne trske", „bolest čuvara svinja". Isto tako koristili su se nazivi koji su bili povezani s godišnjim dobom u kojem se bolest pojavljivala, pa nailazimo na naziv „epidemija žetvene groznice" (Zaharija i sur., 1982., Faine i sur., 1999.). Prvi puta je leptospirozu kao bolest u ljudi opisao njemački liječnik Adolf Weil 1886. godine (Weil, 1886.), po kome danas teški ikterični oblik leptospiroze u ljudi nosi naziv Weilova bolest. Od tada su mnogi bakteriolozi diljem svijeta pokušavali otkriti uzročnika te bolesti. U drugoj polovini 19. stoljeća potvrđeno je da su spiralne bakterije uzročnici mnogih do tada poznatih bolesti, npr. *Treponema pallidum*, uzročnik spolno prenosive bolesti sifilisa. Da je uzročnik Weilove bolesti također spiralna bakterija, pretpostavljao je Stimson koristeći tehnike bojenja po Levaditiju, u preparatu tkiva bubrega pacijenta koji je umro od Weilove bolesti (Stimson, 1907.). Uočeni mikroorganizam Stimson je opisao kao spiralnu bakteriju sa zavinutim krajevima koji sliče interpunkcijskom znaku "?", te je predložio da se bakterija nazove „?*Spirochaeta interrogans*„. Etiologija leptospiroze utvrđena je 1915. godine neovisno u Japanu i Njemačkoj. U Japanu su Inada i Ido dokazali prisutnost spiralne bakterije - uzročnika bolesti u krvi japanskih vojnika oboljelih od žutice. Uzročnika bolesti nazvali su *Spirocheta icterohaemorrhagiae* (Inada i sur., 1915., Inada i Ido, 1915.). U isto su vrijeme u Njemačkoj dvije grupe liječnika, Uhlenhuth i Fromme, te Hubener i Reiter dokazali uzročnika u krvi zamorčića pokusno inficiranih krvlju vojnika oboljelih od Weilove bolesti (Uhlenhuth i Fromme, 1915., Hubener i Reiter, 1915.). U daljnjim istraživanjima leptospiroze Inada i suradnici su izdvojili i uzgojili uzročnika u kulturi, opisali njegova morfološka obilježja i patologiju, te otkrili načine infekcije i širenje uzročnika u različite organe i tkiva inficiranog

organizma. Također su razjasnili načine izlučivanja uzročnika iz organizma, načine širenja infekcije, te su zapisali detaljne podatke o kliničkoj slici, dijagnozi, liječenju i profilaksi leptospiroze (Inada i Ido, 1915.). Ubrzo nakon tih otkrića ista grupa znanstvenika opisala je ulogu štakora kao kliconoša leptospiroze (Ido i sur., 1917.) i time otvorila put razjašnjavanju epidemiologije ove bolesti. Izdvajanjem bakterije *Spirocheta icterohaemorrhagiae* iz štakora potvrđeno je da bolest ima zoonotsko značenje (Ido i Wani, 1916., Inada i sur., 1916., Ido i sur., 1917.). Otkrićem leptospiroze u različitih vrsta domaćih i divljih životinja počela se pridavati velika pažnja zoonotskoj prirodi bolesti i njenom širenju. Leptospirozu u pasa je prvi ustanovio Lukeš u Brnu 1923. godine, dokazavši leptospire u histološkim preparatima bubrega psa, bojenjem prema Levaditiju (Lukeš, 1924.). Daljnim istraživanjima leptospiroza je dokazana i u drugih domaćih životinja, u ovce (Nikoljski i sur., 1935.), mačke (Wirth, 1937.), svinje (Klarenbeek i Winsser, 1938.) i koze (Van Der Hoeden, 1953.). U Hrvatskoj je leptospiroza po prvi put opisana u psa 1926. godine (Babić, 1927.), dok je u ljudi prvi slučaj te bolesti opisan 1935. godine (Antunović- Mikačić, 1935.).

U konja je prvi slučaj leptospiroze zabilježen 1947. godine u Rusiji (Ljubašenko i Novikova, 1947.), dok je u Hrvatskoj prvi klinički nalaz leptospiroze u konja utvrđen svega nekoliko godina poslije, 1951. godine (Zaharija, 1953.).

2.2.2 Etiologija leptospiroze

Uzročnici leptospiroze su spiralne bakterije iz roda *Leptospira* (Noguchi, 1918.). Ime im potječe od grčke riječi *leptos* u prijevodu tanak, te latinske riječi *spira* što znači spiralno, uvijeno. Rod *Leptospira* pripada redu Spirochaetales, te porodici Leptospiraceae (Pillot i Ryter, 1965.). Utvrđena je velika morfološka i genomska raznolikost leptospira, a smatra se da je to posljedica njihove prilagodbe na različite domaćine i okoliš, odnosno geografske i klimatske uvjete.

2.2.2.1 Taksonomija leptospira

U taksonomiji leptospira rabe se dva klasifikacijska sustava: serološki i molekularni.

Serološki sustav klasificiranja leptospira temelji se na utvrđivanju antigenih različitosti među pojedinim sojevima leptospira. Osnovna taksonomska jedinica je serovar. Metodom unakrižne aglutinacije - apsorpcije (*eng*. cross agglutination adsorption, CAAT) utvrđuju se međusobne razlike lipopolisaharida vanjske ovojnice leptospira (Dikken i Kmety, 1978.). Dosadašnje serološko klasifikaciranje uključuje 300 serovara leptospira (Feresu i sur., 1993., Pérolat i sur., 1998., Brenner i sur., 1999., Mgode i sur., 2006.). Serovari su svrstani u 29 seroloških skupina (tablica 2). Određivanje serovara vrlo je bitno za razumijevanje epidemiologije i epizootiologije leptospiroze. Značajno je napomenuti da se molekularni i serološki sustav klasificiranja međusobno ne podudaraju u potpunosti, te da osnovni taksoni, serovar i genomska vrsta, u pojedinim slučajevima nisu u istom međuodnosu. S obzirom na prednosti odnosno nedostatke klasificiranja leptospira kako serološkim, tako i molekularnim metodama, obje vrste klasificiranja prihvaćene su 2011. godine od Pododbora za taksonomiju bakterija iz porodice Leptospiraceae (Subcommittee on the Taxonomy of Leptospira). U znanstvenim istraživanjima novih izolata potrebno je navesti rezultate tipizacije izolata serološkim i molekularnim metodama.

Tablica 2. Serološke skupine leptospira unutar pojedinih genomskih vrsta leptospira (izvor: Pérolat i sur., 1998., Brenner i sur., 1999.).

Genomska vrsta leptospira	Serološka skupina leptospira
Leptospira interrogans	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
Leptospira noguchii	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
Leptospira santarosai	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
Leptospira meyeri	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini, Javanica
Leptospira wolbachii	Codice
Leptospira biflexa	Semaranga, Andamana
Leptospira fainei	Hurstbridge
Leptospira borgpetersenii	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
Leptospira kirschneri	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
Leptospira weilii	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
Leptospira inadai	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
Leptospira alexanderi	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini

Molekularni sustav klasificiranja leptospira utvrđuje stupanj genomske sličnosti među pojedinim sojevima leptospira. Genska raznolikost roda *Leptospira* uviđena je već u najranijim istraživanjima genoma leptospira (Haapala i sur., 1969.). Genomskim klasificiranjem leptospira određeni su odnosi među vrstama osnovani na sličnostima, odnosno razlikama u genomu (tablica 3). Ti se odnosi utvrđuju raznim molekularnim metodama kao što su DNA hibridizacija (Nielsen i sur., 1989.), ribotipiziranje (Pérolat i sur., 1990.), utvrđivanje raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP) (Hookey, 1993.), lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (Mérien i sur., 2005., Fearnley i sur., 2007.), te sekvenciranje i filogenijske analize gena (Paster i sur., 1991., Slack i sur., 2006., Cerqueira i sur., 2009.).

Genomskim klasificiranjem leptospira do sada je utvrđeno postojanje 9 patogenih, 5 intermedijernih vrsta (čija patogenost nije potpuno razjašnjena) i 6 saprofitskih (apatogenih) genomskih vrsta (Yasuda i sur., 1987., Gravekamp i sur., 1993., Levett i sur., 2006., Matthias i sur., 2008., Slack i sur., 2009., Ko i sur., 2009.) (tablica 3).

Tablica 3. Genomsko klasificiranje vrsta leptospira (izvor: Ko i sur., 2009.).

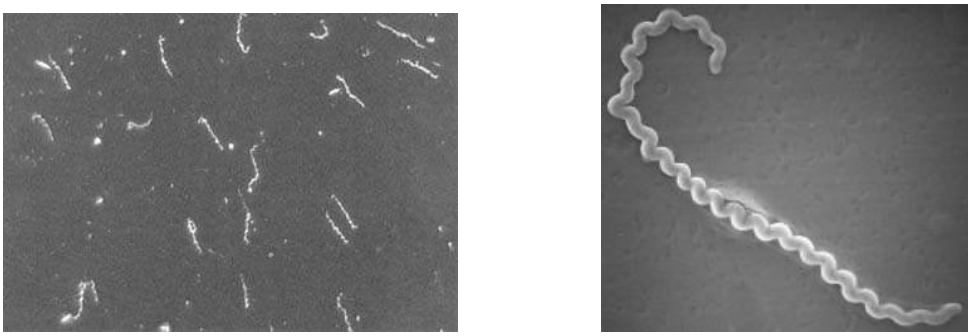
Patogene vrste leptospira	**Intermedijarne vrste leptospira**	**Apatogene vrste leptospira**
Leptospira interrogans	*Leptospira inadai*	*Leptospira biflexa*
Leptospira kirschneri	*Leptospira fainei*	*Leptospira meyeri*
Leptospira noguchii	*Leptospira broomii*	*Leptospira wolbachii*
Leptospira alexanderi	*Leptospira licerasiae*	*Leptospira genomospecies 3*
Leptospira weili	*Leptospira wolffii*	*Leptospira genomospecies 4*
Leptospira genomospecies 1		*Leptospira genomospecies 5*
Leptospira borgpetersenii		
Leptospira santarosai		
Leptospira kmetyi		

2.2.3 Morfologija leptospira

Leptospire su tanki, fleksibilni, zavojiti mikroorganizmi promjera 0,1 - 0,15 µm i dužine 6 - 20 µm. Vrlo su nježne građe, te imaju najviše spiralnih zavoja od svih ostalih spiralnih bakterija. Zavoji su orijentirani udesno, a dužina im je 0,5 µm (Faine i sur., 1999.). Neobojane su vidljive samo mikroskopom s tamnim vidnim poljem (slika 9a) ili fazno - kontrastnim mikroskopom. Vrlo se slabo boje negativno prema Gramu (Woese, 1987.). Mogu se bojiti i prema Giemsi, te bojenjima koja se temelje na impregnaciji srebrom (prema Levaditiju, Wathin- Starryju i Dieterleu) i tada su vidljive svjetlosnim mikroskopom (Faine i sur., 1999.).

Elektronska mikroskopija otkrila je tri glavne strukturne sastavnice stanice leptospira (slika 9b) (Hovind- Hougen, 1986.):

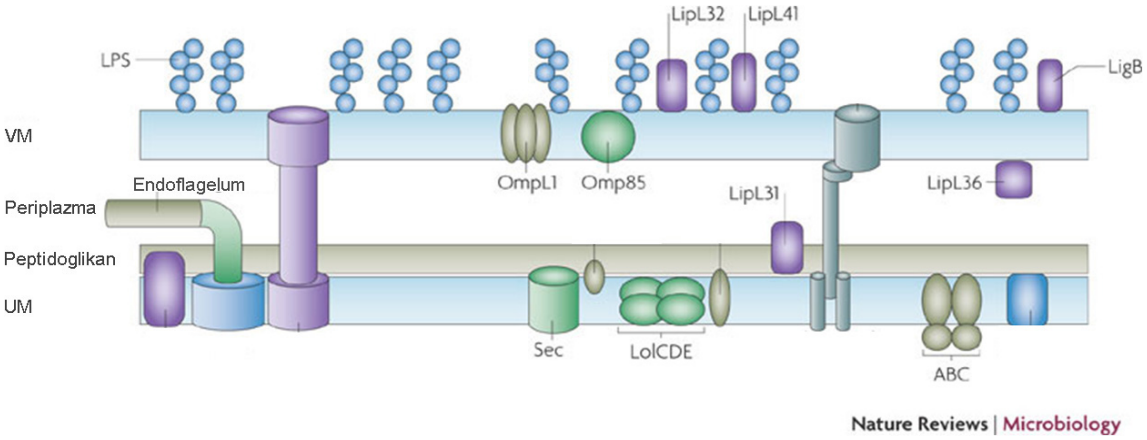
1. vanjsku ovojnicu
2. dvije periplazmatske flagele ili aksijalna filamenta
3. protoplazmatski cilindar



a b

Slika 9. Leptospira pod mikroskopom u tamnom vidnom polju (a) i elektronskom mikroskopu (b) (izvor http://images.sciencedaily.com).

Vanjska ovojnica sastoji se od površinske membrane i vanjske membrane (slika 10). Ispod vanjske ovojnice nalazi se peptidoglikanska membrana koja daje stanici čvrstoću, te citoplazmatska membrana koja obavija staničnu citoplazmu. Lipopolisaharidi vanjske ovojnice (LPS) čine glavne antigenske epitope leptospira. Oni su strukturalno i imunosno vrlo slični lipopolisaharidima ostalih Gram negativnih bakterija, ali znatno su niže toksičnosti (Faine i sur., 1999., Albert i sur., 2009.).



Slika 10. Građa membrane leptospire (VM – vanjska membrana; UM- unutrašnja membrana; LPS- lipopolisaharidi; LipL32, LipL41, LipL41, LipL36, Lig B, ABC, Sec, OmpL1, Omp85, LolCDE, ABC - membranski proteini (Albert i sur., 2009.).

Aksijalni filamenti leptospira su strukturalno slični flagelama ostalih bakterija koje se negativno boje prema Gramu. One omogućuju pokretljivost leptospire. Aksijalni filamenti počinju subterminalno na oba kraja bakterije sa slobodnim krajevima koji su usmjereni prema sredini stanice, a s unutrašnjom stranom citoplazmatske membrane povezani su svojim subterminalnim krajem. Povremenim kontrakcijama uzrokuju rotaciju spirale što uzrokuje pokretanje. Zabilježene su tri različite vrste kretnji: rotacija oko centralne osi, progresivno i cirkularno kretanje (Charon i Goldstein, 2002.). Aksijalni filamenti imaju polarne insercije u periplazmatskom prostoru, odnosno prostoru između vanjske membrane i peptidoglikanske membrane. Tu se spajaju s protoplazmatskim cilindrom. Protoplazmatski cilindar se spiralno ovija oko flagela. Unutar njega se nalazi citoplazma u kojoj se nalazi: genomski materijal, ribosomi, mezosomi i neidentificirane inkluzije vidljive elektonskim mikroskopom (Albert i sur., 2009.).

Morfološka građa pojedinog soja mijenja se ovisno o broju pasaža *in vitro* i uzgojnoj podlozi. Prvotna morfologija izolata se nakon uzgoja *in vitro* može povratiti pasažom na hrčku (Ellis i sur., 1983.b).

2.2.4 Biokemijska i uzgojna svojstva leptospira

Leptospire su spororastuće, vrlo pokretne spiralne bakterije. Obligatni su aerobi. Optimalna temperatura potrebna za rast i razmnožavanje je 28º C do 30º C, a optimalan pH se kreće u rasponu 7,2 do 7,6. Za rast leptospira neophodni su ugljik, dušik, vitamini B1 i B12, te minerali: kalcij, magnezij i željezo. Kao osnovni izvor dušika leptospire rabe amonijeve soli. Masne kiseline dugih lanaca glavni su im izvor ugljika, budući da nemaju sposobnost metabolizirati ugljikohidrate i aminokiseline (Baseman i Cox, 1969.) Od organskih tvari potrebni su im vitamini B1 i B12. Patogene leptospire sintetiziraju samo purinske baze, dok saprofitske sintetiziraju vlastite purine i pirimidine (Faine i sur. 1999.).

Leptospire se uzgajaju u tekućim ili polutekućim hranidbenim podlogama. Najčešće se rabe tekuća hranidbena podloga prema Korthofu, ili prema Ellinghausenu (EMJH), te polutekuća hranidbena podloga prema Fletcheru (Ellinghausen i McCullough, 1965., Johnson i Harris, 1967., Faine i sur., 1999.). Vrlo često se u hranidbene podloge dodaje kunićji serum ili goveđi serumski albumini, koji služe za detoksikaciju i poboljšani rast leptospira.

Leptospire su jako pokretne spiralne bakterije. Postoje dvije vrste kretanja, translacijsko i netranslacijsko (Levett, 2001.). Način pokretanja leptospira ovisi o vrsti hranidbene podloge u kojoj rastu. U tekućoj hranidbenoj podlozi pokretljivost omogućuje spiralna građa bakterije s kukicama na oba kraja. U polukrutoj podlozi pokreću se na osnovi svoje fleksibilnosti.

Saprofitske vrste imaju sposobnost rasta i na nižim temperaturama, zbog čega je uzgojem izolata pri temperaturi od 13º C moguće razlikovati patogene od nepatogenih leptospira.

Postupak izdvajanja leptospira iz kliničkog materijala vrlo je zahtijevan. Kao dodatni izvor piruvata, a u svrhu bolje uspješnosti izdvajanja leptospira iz kliničkog materijala, hranidbenoj podlozi se dodaje kunićji serum. Da bi se umanjila mogućnost kontaminacije drugim bakterijama iz kliničkog materijala, hranidbenoj podlozi se dodaju antimikrobne tvari, od kojih su najpoznatije 5 - fluorouracil, rifampicin, gentamicin ili neki drugi antibiotici na koje su leptospire neosjetljive. Budući da leptospire rastu relativno sporo, nakon nasađivanja materijala potrebno je redovito mikroskopski provjeravati nasađenu hranidbenu podlogu, jer je rast izolata moguće zapaziti čak i tek nakon 16 tjedana od nasađivanja iz kliničkog materijala.

2.2.5 Struktura genoma leptospira

Sekvenciranjem genoma dviju patogenih genomskih vrsta *Leptospira interrogans* (Ren i sur., 2003.) i *Leptospira borgpetersenii* (Bulach i sur., 2006.), te saprofitske vrste *Leptospira biflexa,* potvrđeno je da su leptospire filogenijski vrlo slične ostalim spirohetama, jedina je razlika u tome što imaju veći genom u usporedbi s ostalim spiralnim bakterijama (Nachimento i sur., 2004., Bulach i sur. 2006.). *Leptospira biflexa* je saprofitska vrsta koja živi u površinskim vodama i tlu. Patogene vrste *Leptospira interrogans* i *Leptospira borgpetersenii* uzročnici su leptospiroze.

Genom patogenih vrsta leptospira veličine je otprilike 5 000 kb. Sastoji od dva kružna kromosoma koji se nazivaju CI i CII kromosom. Saprofitska vrsta *Leptospira biflexa* ima još jedan dodatni replikon veličine 74 kb.

CI kromosom genomske vrste *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni, soj Fiocruz L1-130, sadrži 4 349 158 baznih parova. Genomska vrsta *Leptospira biflexa* serovar Patoc soj Ames, ima CI kromosom veličine 3 603 977 bp. Manji kromosom CII u *Leptospira interrogans* soj Fiocruz L1-130 sadrži 359 372 bp.

Brojni geni leptospira su klonirani i analizirani uključujući gene za sintezu aminokiselina, gene koji kodiraju ribosomalne proteine, RNA polimerazu, zatim gene za popravak DNA, gene koji kodiraju vanjsko membranske proteine, flagelarne i druge proteine (Bharti i sur., 2003., Nascimento i sur., 2004.). Genskim analizama razvijaju se nove spoznaje o fiziologiji leptospira, patogenezi i faktorima virulencije (Levett, 2001.)

2.2.6 Epizootiologija i epidemiologija leptospiroze

Leptospiroza je najraširenija svjetska zoonoza. Javlja se u mnogih vrsta domaćih i divljih životinja i čovjeka. Izvori zaraze su mokraća životinja oboljelih od leptospiroze kao i životinja kliconoša, te kontaminirana voda, tlo i hrana. Izlučivanje uzročnika može uslijediti tijekom bolesti, u rekonvalescenciji, ali i nakon ozdravljenja (Zaharija i sur., 1982.), te može biti trajno ili pak samo povremeno (Adler i de la Pena Moctuezuma, 2010.). Životinje koje izlučuju leptospire mokraćom nazivamo kliconošama leptospira (Zaharija i sur., 1982.). Leptospire slabo preživljavaju u mokraći s niskom pH vrijednosti. Upravo zbog toga životinje

s alkalnom mokraćom predstavljaju važniji izvor infekcije. Iz mokraće leptospire dospijevaju u površinske vode i tlo, te tu preživljavaju tjednima, pa čak i mjesecima. Njihovom opstanku izvan domaćina doprinosi mogućnost grupiranja i stvaranja biofilma (Trueba i sur., 2004., Ristow i sur., 2008.). Topla i vlažna klima iznimno pogoduju preživljavanju leptospira u okolišu. Područja s najvećom pojavnosti leptospiroze su zemlje tropskog pojasa, te zemlje u razvoju, u kojima neuređeni higijenski uvjeti i način života osobito pogoduju pojavnosti infekcije, ali i područja u kojima klimatski, geografski i edafski čimbenici pogoduju nastanku prirodnih žarišta leptospiroze poput Hrvatske. U proteklih 15 godina pojavile su se epidemija leptospiroze u Brazilu, Tajlandu, Filipinima i drugim zemljama tropskog pojasa, kao posljedice nesređenih kanalizacijskih sustava i prirodnih nepogoda - poplava (Ko i sur., 1999., Thaipadungpanit i sur., 2007., Amilsan i sur., 2012.). Područja koja su podvrgnuta čestim navodnjavanjima također su vrlo česti izvor infekcije leptospirozom (Ko i sur., 1999.). Prirodnim žarištima leptospiroze nazivamo područja u kojima su prisutni uvjeti koji pogoduju održavanju određenih serovara leptospira i širenju infekcije. Do infekcije najčešće dolazi nakon izravnog kontakta s infektivnom mokraćom ili pak neizravno, nakon kontakta s vodama, hranom ili tlom kontaminiranim leptospirama. Uzročnik ulazi u organizam kroz posjekotine na koži ili sluznici (Faine i sur., 1999.). Infekcije ljudi u prošlosti su bile više vezane uz profesionalna oboljenja stočara, radnika u poljima riže, veterinara, poljoprivrednika, rudara, mesara, odnosno ljudi koji su dolazili u kontakt sa životinjama oboljelim od leptospiroze, točnije njihovom mokraćom. U današnje vrijeme u ekonomski razvijenim zemljama leptospiroza je bolest od koje najčešće obolijevaju ljudi koji se bave nekom sportskom aktivnošću npr. plivanjem u vodama stajačicama kontraminiranim leptospirama (Radl i sur., 2011.) ili turista koji posjećuju tropske zemlje gdje je povećana mogućnost infekcije.

Životinje prijemljive za infekciju leptospirama s obzirom na međuodnos sa uzročnikom bolesti dijele se na:

1. rezervoare bolesti
2. evolucijske domaćine
3. slučajne domaćine

Rezervoari bolesti su životinje kod kojih nakon infekcije, vrlo često, ne dolazi do razvoja bolesti ili dolazi samo do njenog blažeg oblika. Značajno je da kod njih dolazi do trajnog naseljavanja leptospira u bubrežne kanaliće, te najčešće doživotnog kliconoštva (Faine i sur.,

1999.). Najznačajniji rezervoari leptospiroze su mišoliki glodavci. Obično se inficiraju u ranoj dobi. Infekcija se širi horizontalno, a vjerojatno i vertikalno sa životinje na životinju. Izvor zaraze, za životinje i čovjeka, je mokraća životinje kliconoše (Faine i sur., 1999.). Vrste mišolikih glodavaca - rezervoara iz kojih su na području R. Hrvatske izdvojene leptospire su žutogrli miš *(Apodemus flavicollis)*, šumski miš *(Apodemus sylvaticus)*, obična rovka *(Sorex araneus*), poljska voluharica (*Myodes glareolus*), te obični puh (*Muscardinus avellanarius*) (Zaharija, 1968., Zaharija i Modrić, 1971., Borčić i sur., 1982., Borčić i sur., 1983., Milas i sur., 2002., Turk i sur., 2003.). Različiti serovari leptospira prilagodili su se infekciji i suživotu s različitim životinjskim vrstama, koji im onda služe kao rezervoar bolesti. Visok stupanj međusobne prilagodbe razvili su štakor *(Rattus norvegicus)* i serovar Icterohaemorhagiae i Copenhageni, zatim poljska voluharica (*Myodes glareolus*) i serovar Grippotyphosa; kućni miš *(Mus musculus)* i serovar Saxkoebing; žutogrli miš *(Apodemus flavicollis)* i serovar Bratislava i poljski miš *(Apodemus agrarius)* i serovar Pomona.

Istraživanjima rezervoara bolesti dobivamo uvid u epidemiologiju i epizootiologiju leptospiroze, te prisutnost nekog serovara na određenom području. Rizik obolijevanja ljudi od leptospiroze u izravnoj je vezi s brojnošću populacije rezervoara na osnovi veće ili manje izloženosti ljudi kontamiranom okolišu.

Slučajni domaćini su životinje koje nakon infekcije pokazuju kliničke znakove bolesti. Samo im ime govori da su se sasvim slučajno uključili u epidemiološko - epizootiološki ciklus leptospiroze. U slučajne domaćine spadaju i ljudi. Nakon infekcije očituju kliničke znakove bolesti, a nakon preboljenja mogu izlučivati uzročnika mokraćom. Uzrok infekcija u ljudi najčešće je kontakt s mokraćom mišolikih glodavaca. Serološka skupina Australis navodi se kao najučestaliji vjerojatni uzročnik leptospiroze u ljudi u Hrvatskoj (Balen Topić i sur., 2010.), dok se u ostalim europskim zemaljama (Italija, Njemačka, Francuska) kao najučestaliji vjerojatno infektivni serovar navodi serovar Ichterohaemorrhagiae (Ciceroni i sur., 2000., Jansen i sur., 2005., Baranton i Postic, 2006.). Važno je napomenuti da se Hrvatska ističe među ostalim europskim zemljama po visokom postotku infekcije (1,83 oboljelih na 100 000 stanovnika) po čemu zauzima prvo mjesto po broju oboljelih od leptospiroze u Europi (Balen Topić i sur., 2010.), te 13. mjesto po broju oboljelih u svijetu (Pappas i sur., 2008.). Vrlo visoka incidencija infekcije i specifičnost infektivnih serovara objašnjava se činjenicom da Hrvatska spada u arhaična prirodna žarišta leptospiroze. Područja su to koja svojim povoljnim klimatskim, hidrološkim i edafskim uvjetima utječu na pojavnost

leptospiroze, u prvom redu zbog očuvanosti prirodnih staništa glodavaca - rezervoara leptospiroze.

Evolucijski domaćini su životinje kod kojih je u toku proces prilagodbe određenog serovara leptospire na tu životinjsku vrstu. Budući da prilagodba još nije sasvim završila, te životinje nakon infekcije imaju blage simptome bolesti, te nakon njih izlučuju leptospire urinom i do nekoliko mjeseci. Domaće životinje evolucijski su domaćini nekih serovara leptospira. Tako su npr. goveda evolucijski domaćini serovara Hardjo i Pomona (Leonard i sur., 1992.). Psi su evolucijski domaćini serovara Canicola (Faine i sur., 1999.), a svinje serovara Pomona, Tarassovi i Bratislava (Ellis, 1986.). Za konje se smatra da su evolucijski domaćini serovara Bratislava (Ellis, 1999.), no zabilježene su i česte infekcije serovarima Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae i Canicola gdje konj predstavlja slučajnog domaćina (Faine i sur., 1999.).

2.2.7 Patogeneza leptospiroze

Mnoga istraživanja usmjerena su ka razjašnjavanju patogenog djelovanja leptospira na organizam domaćina, no još uvijek nije detaljno razjašnjen mehanizam patogeneze. Razlog tome je između ostalog i sposobnost leptospira da se prilagode uvjetima okoliša u kojem se nalaze. Ustanovljeno je da postoje razlike u proteinima koje leptospire izražavaju u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima, što uvelike otežava proučavanje patogeneze leptospiroze (Nally i sur., 2001.).

Važni čimbenici virulencije leptospira su: sposobnost prianjanja, pokretljivost, tvorba toksina, te površinski proteini leptospira.

Prianjanje leptospira na stanice domaćina, preko oštećene kože ili sluznice, prvi je stadij infekcije. Patogeni sojevi na svojoj površini imaju izražene fibronektin - vezujuće proteine. Oni vežu fibronektin koji pomaže u prianjanju i prodiranju leptospira u organizam domaćina (Mérien i sur., 2000.).

Pokretljivost leptospira izuzetno je važan mehanizam virulencije u početnoj fazi infekcije. Genomskom analizom *L. interrogans* ustanovljeno je postojanje čak 50 različitih gena koji se povezuju s pokretljivošću leptospira (Ren i sur., 2003.). Patogene leptospire imaju sposobnost

kemotaksije prema hemoglobinu. Devet gena patogenih sojeva kodira hemolizine i sfingomijelinaze (Lee i sur., 2002.).

Ulaskom u organizam domaćina započinje stadij bakterijemije. Prolaskom kroz stanice domaćina leptospire dospijevaju do ciljnih organa (Thomas i Higbie, 1990., Barocchi i sur., 2002.), mada se ranije smatralo da, kao i ostale spirohete, prolaze kroz međustanične prostore (Haake i Levett, 1994.). Smatra se da kliničko očitovanje leptospiroze započinje proizvodnjom aglutinirajućih protutijela (Faine i sur., 1999.). Porastom koncentracije protutijela, leptospire nestaju iz cirkulacije, ali se zadržavaju u proksimalnim bubrežnim kanalićima domaćina, gdje su nedostupne protutijelima. Tada počinje faza povremenog ili stalnog izlučivanja leptospira urinom. Leptospire u bubrezima domaćina mogu izazvati oštećenja. Izrazito je važna činjenica da ne izazivaju nikakve patološke procese u bubrezima životinja rezervoara. Do komplikacija leptospiroze dolazi zbog imunosnih procesa nakon tvorbe protutijela. Pretpostavka je da se tijekom imunosnih reakcija oslobađaju strukturni dijelovi leptospira koji potiču proizvodnju upalnih citokina. Oni posreduju pri upali i oštećenju ciljnih organa (Diament i sur., 2002.). Oštećenjem epitela lokalnih krvnih žila dolazi do lokalizirane ishemije u ciljnim organima. To dovodi do nekroze bubrežnih kanalića, oštećenja jetre, pluća ili placente, te upale mišićja ili moždanih ovojnica. Često i nakon oporavka zaostaju kronična oštećenja bubrega. U središnjem živčanom sustavu kao posljedica nastanka imunosnih reakcija također mogu nastati upalni procesi.

Ustanovljeno je da postoji homologija nekih proteina leptospira s proteinima životinja i ljudi. Ti proteini leptospira mogu pokrenuti autoimunosni odgovor. Rekurentni uveitis (mjesečna sljepoća) u konja najvjerojatnije je posljedica autoimunosne reakcije specifičnih protutijela na leptospire i okularnog tkiva (Faber i sur., 2000.).

Humoralni odgovor, odnosno stvaranje protutijela na specifične lipopolisaharide (LPS) vanjske ovojnice leptospira, glavni je čimbenik imunosnog odgovora organizma domaćina na patogeni soj (Adler i Faine, 1977.). Tijek i ishod bolesti uvelike ovisi i o građi LPS-a leptospira (Nally i sur., 2005.), odnosno infektivnom serovaru leptospira. Protutijela nastaju već nekoliko dana nakon infekcije. Nakon opsonizacije, mikroorganizam se djelovanjem retikuloendotelnog sustava uklanja iz organizma domaćina.

Novija istraživanja pokazuju da i stanični odgovor domaćina sudjeluje u imunosnoj reakciji (Naiman i sur., 2002.).

2.2.8 Leptospiroza u konja

Prvi slučaj prirodne infekcije leptospirama u konja zabilježen je u Rusiji, 1947. godine (Ljubašenko i Novikova, 1947.). U Hrvatskoj je klinički nalaz leptospiroze u konja prvi puta utvrđen svega nekoliko godina kasnije, 1951. godine (Zaharija, 1953.).

Rezultati seroloških istraživanja leptospiroze u konja pokazuju relativno visok postotak pozitivnih životinja. Obzirom na visoku seroprevalenciju, smatra se da su konji osjetljiviji na infekciju leptospirama od ostalih vrsta domaćih životinja (Ellis, 1999.).

Najčešći infektivni serovari su Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae i Canicola (Faine i sur., 1999.). Rezultati seroloških istraživanja provedenih na populaciji konja Republike Hrvatske, također ukazuju na visoku seroprevalenciju leptospiroze (Cvetnić i sur., 2004.) s najvećom učestalošću infektivnih serovara serološke skupine Australis, Pomona i Grippotyphosa (Habuš i sur., 2008., Turk i sur., 2013.).

Serološka istraživanja klinički zdravih konja pokazala su da serovar Bratislava, serološke skupine Australis, ima visoku seroprevalenciju u Kanadi (Lees i Gale, 1994.), Švicarskoj (Blatti i sur., 2011.), Sjevernoj Americi (Barwick i sur., 1998.), Južnoj Americi (Hamond i sur., 2012.b), Sjevernoj Irskoj (Ellis i sur. 1983.). Na osnovu toga, smatra se da je u tijeku evolucijska prilagodba konja na serovar Bratislava (Ellis, 1999.).

Konji se najčešće inficiraju u izravnom kontaktu s urinom životinja kliconoša, ili pak u neizravnom kontaktu s vodom i hranom kontaminiranom urinom životinja kliconoša. Veći postotak serološki pozitivnih konja zamijećen je u skupno držanih životinja, u odnosu na pojedinačni uzgoj (Baverud i sur., 2009.). U odraslih konja zapažen je razvoj višeg titra protutijela nego u mlađih konja (Hines, 2007., Baverud i sur., 2009.).

Leptospiroza uzrokuje goleme ekonomske gubitke u industriji konja SAD-a (Donahue, 2001., Newman i Donahue, 2007.).

Usprkos velikom broju provedenih istraživanja leptospiroze u konja, relativno malo se zna o uzročnicima bolesti. Razlog tome je mali broj izdvojenih leptospira iz inficiranih konja. Potpuni uvid u svojstva infektivnog soja moguće je dobiti samo na osnovu cjelovite identifikacije izolata (Ellis i sur. 1983.).

2.2.8.1 Klinička slika leptospiroze u konja

Relativno mali broj kliničkih slučajeva leptospiroze u konja, dokaz je da infekcija najčešće prolazi bez vidljivih kliničkih znakova (Ellis i O' Brien, 1988., Wood, 1994.). U gravidnih životinja leptospiroza se očituje pobačajem i često je to jedini klinički simptom ove bolesti. Unatoč tome moguć je i razvoj teških akutnih oblika leptospiroze u konja (Bernard, 1993., Bernard i sur., 1993.).

Najnovija istraživanja pokazala su da i subklinička leptospiroza može imati utjecaj na slabljenje fizičke sposobnosti konja. Dokazano je to na primjeru trkaćih konja sa subkliničkom leptospirozom, koja se negativno odrazila na njihove sportske rezultate (Baverud i sur., 2009., Hamond i sur., 2012.). Subklinička leptospiroza u konja ne smije se zanemariti i zbog činjenice što inficirani konji, zbog povremenog izlučivanja uzročnika urinom, predstavljaju mogući izvor širenja leptospiroze, pa stoga i izravnu opasnost od zaraze za ljude ili ostale domaće životinje (Barwick i sur., 1997., Hamond i sur., 2012.). Urin konja ima idealan pH (7,5- 7,9) za preživljavanje leptospira, a time onda i širenje zaraze (Hamond i sur., 2012.).

2.2.8.1.1 Akutni oblici leptospiroze u konja

U težim oblicima bolesti, akutna infekcija započinje izraženim općim infekcijskim sindromom, anoreksijom i nevoljkošću. Od ostalih simptoma pojavljuju se slabost u mišićima, žutica i hematurija (Brudnjak i sur., 1956., Zaharija i sur., 1982.). Zapažena je i pojava fotofobije, iscjetka i suzenja očiju, te natečenost vjeđa (Zaharija i sur., 1982.). Akutna septikemija s trajnim oštećenjima jetre, bubrega i pluća u konja također je zabilježena, ali je iznimno rijetka (Hamond i sur., 2011.).

Pobačaj je također vrlo česta posljedica akutne infekcije leptospirozom (Kinde i sur., 1996., Faine i sur., 1999.). U gravidnih kobila, infekcija posteljice pokreće imunosni odgovor koji posljedično dovodi do vaskulitisa, edema, tromboze, stanične infiltracije, nekroze i kalcifikacije. Do pobačaja najčešće dolazi u zadnjem stadiju gravidnosti, kao posljedica potpune narušenosti funkcije posteljice (Wiliams i sur., 1994.). Ždrebad, inficirana u uterusu, može pokazivati teške kliničke oblike bolesti koja vrlo često imaju letalni ishod (Bernard i sur., 1993., Faine i sur., 1999.). U većini slučajeva pobačaji su povezani s vjerojatno

infektivnim serovarima Pomona, Icterohaemorrhagiae i Grippotyphosa (Donahue i sur., 1991., Kinde i sur., 1996.).

2.2.8.1.2 Kronični oblici leptospiroze u konja

U konja se kronični oblik leptospiroze očituje pojavom rekurentnog uveitisa ili „mjesečne sljepoće". Javlja se i do nekoliko mjeseci nakon infekcije patogenim leptospirama (Brudnjak i sur., 1956., Faine i sur., 1999., Verma i sur., 2012.). Ukoliko se ne dijagnosticira na vrijeme i ne liječi pravilno, može dovesti i do sljepoće. Smatra se da je razvoj „mjesečne sljepoće" posljedica autoimunosnog procesa (Wolanke i sur., 1998., Faber i sur., 2000.).

2.2.9 Leptospiroza u ostalih domaćih životinja

2.2.9.1 Leptospiroza u goveda

U goveda infekcija leptospirama najčešće prolazi asimptomatski, ali poznati su i slučajevi razvoja težeg oblika bolesti s izraženim općim infekcijskim sindromom, ikterusom, hemoblubinurijom, a kao posljedica infekcije često se javlja i značajan pad mliječnosti (Faine i sur. 1999.). Smatra se da su goveda evolucijski domaćini za serovar Hardjobovis. Infekcija tim serovarom obično ne uzrokuje pojavu bolesti, dok infekcija drugim serovarima, npr. Pomona, Grippotyphosa ili Icterohaemorrhagiae može uzrokovati teži klinički oblik leptospiroze u tovne teladi i junadi (Zaharija, 1955., Modrić i sur., 1979., Ellis, 1994., Faine i sur., 1999.). Bolest se u njih očituje povišenom temperaturom, anemijom, žuticom, a može rezultirati i uginućem (Faine i sur., 1999.). U gravidnih goveda može se javiti pobačaj ili preuranjeno teljenje s posljedicom avitalnosti teladi. U istraživanjima leptospiroze teladi u Hrvatskoj najčešća ustanovljena infekcija bila je infekcija serovarom Pomona (Zaharija, 1955., Modrić i sur., 1979.). U junadi je pak ustanovljena najčešća infekcija serovarom Tarassovi (Zaharija i Modrić, 1971.).

2.2.9.2 Leptospiroza u svinja

Infekcija u odraslih svinja vrlo često prolazi asimptomatski. Teži klinički oblici bolesti mogući su u prasadi i tovljenika, a očituju se pojavom visoke temperature, žuticom, pa čak i uginućem slabije prasadi (Modrić i sur., 2006.). Infekcija može i u svinja biti uzrok pobačaja i reprodukcijskih poremetnji. Svinje su evolucijski domaćini za serovare Bratislava, Pomona i Tarassovi koji u njih rijetko uzrokuju pojavu bolesti (Faine i sur., 1999.). Također je moguća i infekcija serovarima Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Hardjo i Canicola (Modrić i sur., 2006.).

2.2.9.3 Leptospiroza u koza i ovaca

Infekcija leptospirama u koza i ovaca u većini slučajeva prolazi inaparentno. Najčešći infektivni serovari su Grippotyphosa, Pomona, Bratislava i Hardjo. Klinička leptospiroza javlja se obično u mlađih životinja. Može biti uzrokom reprodukcijskih poremetnji, pobačaja ili uginuća janjadi i jaradi (Faine i sur., 1999.). U većini slučajeva infekcija se otkriva tek utvrđivanjem serokonverzija.

2.2.9.4 Leptospiroza u pasa

Najčešći serovari uzročnici leptospiroze u pasa su Pomona, Icterohaemorrhagiae, Bratislava i Grippotyphosa (Zaharija, 1954., Modrić i sur., 1985., Faine i sur., 1999., Štritof Majetić i sur., 2012.). Vrlo su česte subkliničke infekcije praćene dugotrajnim izlučivanjem leptospira urinom. Blaži oblici bolesti popraćeni su nespecifičnim simptomima, koji se povlače spontano ili nakon terapije antibioticima, te bolest vrlo često ostaje nedijagnosticirana. Teži slučajevi očituju se hemoragijskim gastroenteritisom, oštećenjima bubrega, jetre ili pluća, te su povezani s visokom smrtnosti. Leptospiroza u pasa također može rezultirati pobačajem ili pak razvojem uveitisa i konjuktivitisa (Faine i sur., 1999.).

2.2.9.5 Leptospiroza u mačaka

Klinička leptospiroza u mačaka je iznimno rijetka (Faine i sur., 1999.). Kao i u drugih životinja, infekcija leptospirama može biti uzrokom pobačaja (Reilly i sur., 1994.). Serološkim testovima dokazana je prisutnost protutijela na leptospire (Modrić, 1978.), a iz bubrega mačaka su izdvojeni serovari Pomona, Icterohaemorrhagiae, Australis i Bataviae (Modrić, 1978., Modrić i sur., 1981.).

2.2.10 Leptospiroza u ljudi

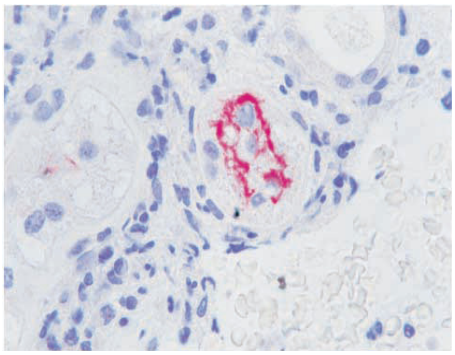
Leptospiroza u ljudi najčešće prolazi inaparentno ili s tek blagim kliničkim očitovanjem. Upravo zbog toga u većini slučajeva bolest ostaje poddijagnosticirana i neprijavljena u epidemiološkim izvještajima. Blaži oblik leptospiroze započinje pojavom općeg infekcijskog sindroma koji se očituje vrućicom, bolovima u mišićima i trbuhu, glavoboljom i konjuktivalnim podljevima. Blaži klinički simptomi u većini slučajeva prolaze i bez liječenja za otprilike tjedan dana. Teži oblik leptospiroze, tzv. ikterični oblik, javlja se u otprilike 5 do 15% slučajeva, te se naziva Weilova bolest. Od simptoma se javljaju vrućica, krvarenja, oštećenja jetre i zatajenje bubrega. Zabilježena je smrtnost od tog oblika leptospiroze u 5 do 15% pacijenata (Levett, 2001.). U novije vrijeme porastao je broj slučajeva leptospiroze s teškim plućnim hemoragijskim sindromom. U više od 50% pacijenata s tim oblikom leptospiroze, zabilježen je smrtni ishod bolesti (Ahmad i Sarwari, 2010., Helmerhorst i sur., 2012.). U prošlosti su od leptospiroze obolijevali ljudi profesionalno izloženi većem riziku od infekcije. Ugrožene skupine su bile uzgajivači stoke, veterinari, poljoprivrednici, mesari i rudari. Danas je leptospiroza bolest s najvećom pojavnosti u nerazvijenim tropskim zemljama koje imaju nesređene higijenske uvjete života, te u zemljama pogođenim čestim poplavama, te u zemljama s prirodnim žarištima leptospiroze. U razvijenim zemljama od leptospiroze najčešće obolijevaju rekreativci i sportaši plivači u površinskim vodama (Lingappa i sur., 2004.), te turisti posjetitelji tropskih zemlja.

2.2.11 Dijagnostika leptospiroze

Boravak u prirodi, u blizini stajaćih voda i rijeka, ili u okolišu kontaminiranom urinom mišolikih glodavaca, može biti vrlo važan anamnestički podatak koji upućuje na infekciju leptospirama. Klinički znakovi leptospiroze u ljudi i životinja su pojava ikteričnih oblika bolesti praćenih povišenom temperaturom, hepatorenalni sindrom, leukocitoza i trombocitopenija. Pobačaj kod kobila, krava ili krmača, također upućuje na moguću infekciju leptospirama. Zbog raznolikosti kliničkih znakova, vrlo je teško postaviti dijagnozu samo na temelju kliničke slike. Potvrda leptospiroze zbog toga se temelji na laboratorijskim pretragama koje uključuju mikrobiološke metode kojima izravno dokazujemo prisutnost uzročnika, zatim molekularne metode kojima se dokazuje prisutnost genskog materijala uzročnika, ili pak serološke metode kojima se dokazuju specifična protutijela. Leptospire je u krvi, cerebrospinalnoj tekućini ili tekućini iz peritoneuma moguće dokazati u prvih 7 do 10 dana od početka bolesti. Nakon toga leptospire se izlučuju urinom, pa je i dokaz njihove prisutnosti, moguć jedino analizom urina. Izlučivanje može biti stalno ili pak povremeno, što uvelike otežava dijagnostiku leptospiroze iz urina.

2.2.11.1 Metode izravnog dokazivanja leptospira u krvi, tjelesnim tekućinama i histopatološkim preparatima

Leptospire se u tjelesnim tekućinama mogu dokazati promatranjem nativnog preparata pod mikroskopom s tamnim poljem. U histopatološkim preparatima leptospire se dokazuju imunohistokemijskim metodama (slika 11) ili bojenjem preparata srebrom.



Slika 11. Dokaz prisutnosti leptospira u proksimalnim kanalićima psa dobiven imunohistokemijskom metodom (izvor: Wild i sur., 2002.).

2.2.11.2 Molekularne metode dokazivanja prisutnosti leptospira

Molekularnim metodama dokazuje se prisutnost genetskog materijala leptospira u krvi, tjelesnim tekućinama i histopatološkim preparatima. Najčešće upotrebljavana molekularna metoda je lančana reakcija polimerazom (PCR) i metoda PCR u stvarnom vremenu (Real Time PCR). U literaturi je opisan velik broj početnica koje se mogu rabiti za dijagnostiku leptospiroze PCR metodom, odnosno dokazivanje prisutnosti DNA leptospira u kliničkom materijalu (Brown i sur., 1995., Mérien i sur., 1995., Levett i sur., 2005., Slack i sur. 2006.). Prednosti PCR metode su visoka specifičnost, brzina izvođenja, dostupnost metode velikom broju dijagnostičkih laboratorija, te mogućnost kvantifikacije uzročnika u ispitivanom materijalu. PCR metodom je moguće dokazati prisutnost leptospira u krvi, urinu, cerebrospinalnom likvoru ili uzorcima organa i tjelesnih tekućina uzetih posmortem (Brown i sur., 1995., Mérien i sur., 1995.). Nedostatak PCR metode je što zasada njenom uporabom nije moguće odrediti infektivni serovar koji ima epidemiološko i javno-zdravstveno značenje (Bharti i sur., 2003.).

2.2.11.3 Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala

Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala iznimno je dugotrajan i složen dijagnostički postupak. Budući da se leptospire u različitim fazama bolesti, nalaze u različitim dijelovima organizma domaćina, izdvajanje se vrši iz kliničkog materijala koji odgovara fazi bolesti. U početnoj fazi, leptospire je moguće izdvojiti iz krvi (prvih 7 dana bolesti). Krv se nacjepljuje u tekuću hranidbenu podlogu i inkubira pri temperaturi 28 - 30º C u trajanju i do 6 mjeseci. Rast izolata provjerava se pod mikroskopom s tamnim poljem, jednom tjedno. Iz urina se leptospire mogu izdvojiti od sedmog dana bolesti. Budući da leptospire ne mogu preživjeti u urinu niske pH vrijednosti, potrebno je kod izdvajanja neutralizirati hranidbenu podlogu. Radi umanjenja mogućnosti kontaminacije izolata ostalim bakterijama, potrebno je u hranidbenu podlogu dodati 5- fluorouracil ili neki drugi drugi protektiv. Izdvajanje leptospira iz kliničkog materijala, zbog svoje slabe osjetljivosti i dugotrajnosti, nije od velikog značaja za kliniku i liječenje, ali ima iznimnu znanstvenu vrijednost, prije svega zato jer omogućuje daljnje istraživanje i tipiziranje dobivenog izolata uzročnika.

2.2.11.4 Serološke metode dijagnostike leptospiroze

Prisutnost specifičnih protutijela u serumu moguće je dokazati različitim serološkim metodama. U većini laboratorija za dijagnostiku leptospiroze najčešće se upotrebljava metoda mikroskopske aglutinacije (MAT). Ostale serološke metode koje se upotrebljavaju su: imunoenzimni test, neizravna inhibicija hemaglutinacije, reakcija vezanja komplementa i druge. Razvijeni su i mnogi komercijalni tzv. brzi dijagnostički testovi, koji se temelje na imunoenzimnom testu (ELISA- od *eng.* enzyme - linked immunosorbent assay) ili pak makroskopskoj ili tzv. lateks - aglutinaciji. Imunoenzimnim testovima moguće je utvrditi prisutnost IgM protutijela za lipopolisaharide vanjske ovojnice leptospira u serumu ljudi i različitih vrsta životinja (Abdoel i sur., 2011.). Nedostaci imunoenzimnih testova su relativno visoka cijena i niska specifičnost, odnosno nemogućnost identifikacije infektivnog serovara (Shekatkar i sur., 2010.). U razvoju novih metoda dijagnostike leptospiroze puno se pozornosti posvećuje razvoju ELISA testova za detekciju IgG protutijela sa rekombinantnim vanjsko - membranskim proteinima leptospira, LipL32 i Loa 22 (Chalayon i sur., 2011.). Lateks - aglutinacijom moguće je dokazati prisutnost IgM i IgG protutijela u serumu. Manjkavosti ovih "brzih" testova su niska osjetljivost, nemogućnost dokazivanja infektivnog serovara, te vrsna nespecifičnost.

2.2.11.4.1 Metoda mikroskopske aglutinacije (MAT)

Referentna serološka metoda za dijagnosticiranje leptospiroze je mikroskopska aglutinacija ili MAT. Njome se dokazuje prisutnost IgM i IgG protutijela u pretraživanom serumu. U dijagnosticiranju se koristi kao kvalitativna i kvantitativna metoda kojom se može ustanoviti postoje li u pretraživanom serumu protutijela za određeni serovar leptospira i u kojem su titru. Kvantitativni dio MAT izvodi se u dvostrukim serijskim razrjeđenjima istraživanog seruma, te određuje titar protutijela za svaki pojedini antigen u panelu antigena. Panel antigena prilagođen je vrsti životinje čiji serum istražujemo, ili je pak prilagođen za serološku dijagnostiku ljudi (Dikken i Kmety, 1978.). Panel se sastoji od referentnih sojeva, različitih serovara živih leptospira. Jedan ili više serovara može predstavljati istu serološku skupinu u panelu. Paneli antigena, koji se upotrebljavaju u laboratorijima, ovisni su o epizootiološkim i epidemiološkim prilikama u državi i podložni su promjenama.

Očitavanje rezultata MAT metode izvodi se pod mikroskopom s tamnim poljem. To je subjektivna metoda u kojoj se određuje postotak slobodnih, neaglutiniranih leptospira u vidnom polju. Pozitivnim serumom smatra se svaki u kojem je 50% ili više leptospira aglutinirano, odnosno slijepljeno u nakupine (aglutinate). Prednosti MAT- a su specifičnost metode i mogućnost određivanja vjerojatno infektivnog serovara. Nedostaci metode su manja osjetljivost, zahtjevnost za izvođenje, subjektivnost. Još jedan od nedostataka je i nemogućnost razlikovanja rezidualnog titra od onog koji nastaje u akutnoj infekciji. Za potvrdu akutne infekcije potrebno je pretražiti tzv. parni serum koji se uzorkuje nekoliko dana nakon prvog uzorkovanja. Ukoliko se utvrdi četverostruki ili veći porast titra, radi se o akutnoj infekciji. U akutnom stadiju bolesti često se u MAT metodi javljaju kooaglutinacije, odnosno, uz aglutinacije protutijela sa antigenom vjerojatno infektivnog serovara javljaju se i aglutinacije s drugim serovarima. Česta je i pojava tzv. paradoksalne reakcije u kojoj se najviši titar pokazuje na onaj na serovar koji zapravo nije infektivni (Levett, 2001.).

U svrhu dijagnosticiranja rane faze bolesti i pravovremenog početka terapije, razvijaju se brze i jednostavne metode s ciljem utvrđivanja IgM protutijela u prvom tjednu bolesti. No, ti brzi testovi ne mogu zamijeniti MAT upravo zbog njegove visoke specifičnosti i preciznosti.

2.2.12 Proteomika u istraživanjima leptospiroze

Od novijih metoda istraživanja leptospiroze važno je spomenuti metode proteomike koje na osnovu elektroforeze u poliakrilamidnom gelu i tzv. „imunoblotting-a“ omogućuju identificiranje i analizu proteina i aktivnih antigena leptospira. Eksperimentalna proteomika ima ključnu ulogu u razvoju specifičnih ELISA IgG testova (Haake i sur., 2000., Nally i sur., 2005., Monahan i sur., 2008., Ko i sur., 2009.). Usprkos činjenici da se još uvijek relativno malo zna o proteinima vanjske membrane leptospira, nekoliko njih se izravno povezuje s patogenosti leptospira, Omp L1, LipL32, Loa22, LigB, LenA, LipL41, LipL36, Qlp42, LenD (Nally i sur., 2005., Ko i sur., 2009.). Proučavanje vanjskih membranskih proteina koji pokreću imunosni odgovor u domaćina vrlo je bitno za razvoj dijagnostičkih metoda i vakcina. Metode proteomike korištene su u istraživanju vanjskih membranskih proteina vrste *Leptospira interrogans,* serovar Hardjobovis za identificiranje specifičnih epitopa serološke skupine Hardjo i razvoj vakcine goveda (Brown i sur., 1991.).

2.2.13 Liječenje i prevencija leptospiroze

2.2.13.1 Liječenje leptospiroze

Leptospire su osjetljive na velik broj antibiotika, među kojima su aminoglikozidi, tetraciklini, β- laktami, kinoloni i makrolidi (Levett, 2007.). Antibiotici su djelotvorni u liječenju ukoliko se primijene u početku bolesti. Mehanizam njihovog djelovanja svodi se uglavnom na uklanjanje leptospira iz cirkulacije, a jedino streptomicin i doksiciklin uklanjaju leptospire iz bubrega (Faine i sur., 1999.).

2.2.13.2 Prevencija leptospiroze

Osnovna prevencijska mjera zaštite od leptospiroze je sprječavanje, odnosno smanjenje mogućnosti kontakta domaćih životinja i ljudi s izvorima infekcije. Najčešći izvori infekcije su mišoliki glodavci koji predstavljaju rezervoare bolesti. Kontrolom brojnosti populacije glodavaca, te održavanjem higijensko - sanitarnih mjera zaštite, moguće je u velikoj mjeri suzbiti pojavnost infekcije. Budući da je leptospiroza bolest prirodnog žarišta, navedene preventivne mjere nisu u potpunosti provedive. Potencijalnu opasnost od zaraze predstavljaju i subklinički inficirane domaće, te divlje životinje koje izlučuju leptospire urinom. Značajna mjera zaštite od leptospiroze je izdvajanje životinja kliconoša od zdravih životinja, te sprječavanje kliconoštva terapijom inficirane životinje antibioticima.

U svrhu imunoprofilakse leptospiroze u domaćih životinja, na tržištu postoje mnoga komercijalna cjepiva. Ta su cjepiva bakterini dobiveni inaktivacijom cijele bakterijske stanice. Njihovom primjenom postiže se kratkotrajna (šestomjesečna), djelomična imunost. Manjkavost cjepiva je izostanak unakrižne zaštitne imunosne reakcije među serovarima. U humanoj medicini cjepiva protiv leptospiroze se ne primjenjuju.

2.3 Glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC sustav)

Glavni sustav tkivne podudarnosti ili *eng*. major histocompatibility complex (MHC) čini sustav membranskih glikoproteinskih receptora izloženih na stanicama kralješnjaka. Uloga tih receptora vrlo je važna u pokretanju imunosnog odgovora. Oni prikazuju proteinske antigene T-limfocitima (Klein, 1986.). Receptori na T-limfocitima prepoznaju jedino antigene koji su izloženi na MHC receptorima. Otkriveni su zahvaljujući njihovoj ulozi u odbacivanju ili prihvaćanju presadka kod transplantacijskih reakcija, zbog čega nose i naziv *antigeni tkivne podudarnosti*. Pronađeni su najprije na leukocitima, odakle im pak naziv *sustav leukocitnih antigena* koji se često koristi u opisu MHC različitih vrsta, npr. ljudski leukocitni antigen (*eng*. human leukocyte antigen, HLA), konjski leukocitni antigen (*eng*. equine leukocyte antigen, ELA), pseći leukocitni antigen *(eng*. dog leukocyte antigen, DLA) i drugi.

Geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti najraznovrsnija su, dosad poznata, skupina gena u kralješnjaka. Kodiraju stanične površinske receptore, koji imaju ključnu ulogu u prepoznavanju vlastitih od stranih molekula, zatim u autoimunosnim reakcijama i imunosnom odgovoru kod zaraznih bolesti. Polimorfizam MHC gena održava se u populaciji prirodnim odabirom.

Da bi se organizam uspješno obranio od patogenih mikroorganizama, mora imati sposobnost razlikovanja vlastitih molekula od stranih. Imunosno prepoznavanje velikim je dijelom pod kontrolom MHC gena. Oni zauzimaju velik dio genoma, u ljudi oko 4 milijuna baznih parova, ili 0,1% genoma. MHC genska regija u ljudi ima oko 200 kodirajućih lokusa. Razlikovanje stranih od vlastitih molekula kontrolirano je MHC genima skupine I i II. Prikazivanjem antigena, MHC molekule imaju ključnu ulogu u započinjanju specifičnih imunosnih reakcija. Upravo zbog središnje uloge u imunosnom odgovoru, imaju veliki utjecaj na razvoj prijemljivosti, odnosno otpornosti organizma na zarazne i autoimunosne bolesti.

2.3.1 Otkriće MHC gena

MHC geni otkriveni su pri pokušaju razjašnjavanja uzroka odbacivanja tkivnih presadaka u transplantacijskim reakcijama na pokusnim životinjama - mišu i kuniću. Istraživači Little i Tyzer su 1916. godine izveli pokusnu transplantaciju tumorskog tkiva na miševima (Little i Tyzer, 1916.). Otkrili su da do odbacivanja stranog tkiva neće doći jedino u slučaju kada su primatelj i davatelj blizanci. Ta su otkrića dovela do spoznaje da je tkivna podudarnost kontrolirana na genskoj razini. Krajem 30-tih godina prošlog stoljeća znanstvenik Gorer je opisao postojanje 4 grupe krvnih antigena u miša. Nazvao ih je „antigen I, II, III i IV" (Gorer, 1936.). Otkrio je, također, da je odbijanje ili prihvaćanje stranog tkiva povezano s ekspresijom tih antigena (Gorer., 1937.).

Krajem 40 - tih godina prošlog stoljeća Medawar (1946.) je otkrio da je odbacivanje transplantacijskog tkiva povezano s imunosnim odgovorom na strani antigen. Nekoliko godina kasnije, Snell i suradnici uspjeli su uzgojiti genomski identične miševe koji su se razlikovali jedino u genskoj regiji koja kontrolira odbijanje stranog tkiva. Gene te regije nazvali su genima tkivne podudarnosti ili H genima (od *eng*. histocompatibility) (Snell, 1951.). U kasnijim istraživanjima ista skupina znanstvenika utvrdila je da postoji nekoliko gena za tkivnu podudarnost, te da se svi nalaze na istom kromosomu. Tu gensku regiju nazvali su eng. major histocompatibility complex ili MHC, odnosno glavni sustav tkivne podudarnosti (Snell i Higgins, 1951.). Funkcija MHC gena u imunosnim reakcijama bila je nepoznata sve do 70 - tih godina prošlog stoljeća kada su Zinkernagel i Doherty 1974. godine otkrili da aktivacija i djelovanje T-limfocita ne ovisi samo o antigenu, nego i o MHC molekulama (Doherty i Zinkernagel, 1975.). Prema njihovoj teoriji MHC heterozigotne jedinke imaju prednost u pokretanju imunosnog odgovora u odnosu na homozigotne. Ta je teorija doprinijela objašnjenju evolucijske sposobnosti duplikacije MHC gena i postojanju njihove raznolikosti. Struktura MHC molekula otkrivena je metodama rendgenske kristalografije 80-tih i 90-tih godina prošloga stoljeća (Bjorkman i sur., 1987., Brown i sur., 1993.).

2.3.2 Struktura MHC molekula

Kod većine kralješnjaka razlikujemo dvije skupine MHC molekula: skupinu I i II. U sisavaca se uz te dvije skupine pojavljuje još i skupina III. MHC molekule skupine I i II imaju vrlo sličnu strukturnu građu. Transmembranski su heterodimeri. Njihove izvanstanične amino-terminalne domene vežu antigeni peptid nakon prerade antigena u stanici, koji onda prikazuju T-limfocitima.

2.3.2.1 MHC molekule skupine I

MHC molekule skupine I polimorfna su skupina glikoproteinskih receptora izloženih na površini svake stanice s jezgrom u kralješnjaka. Struktura im je heterodimerna (slika 12.), sastavljene su od dva polipeptidna lanca:

- α lanca (naziva se još i „teški“ lanac)
- ß lanca (ili „laki“ lanac)

α lanac sastoji se od:

- izvanstanične domene - koja se sastoji se od tri podjedinice: α1, α2 i α3
- hidrofobne transmembranske domene i
- hidrofilne citoplazmatske domene

α lanac se odlikuje izrazitom varijabilnosti, posebno α1 i α2 domena.

ß lanac se nalazi izvan stanice. Sastoji od:

- jedne domene koja je nekovalentnim vezama povezana s α lancem preko α3 domene.

MHC genska regija kod ljudi se nalazi na šestom kromosomu, a iznimka tome je ß lanac (ili ß2 mikroglobulin) koji je kodiran genom koji se nalazi na 15 - tom kromosomu. β2-mikroglobulin je neophodan za ekspresiju MHC molekula skupine I. Taj gen ne odlikuje varijabilnost. Jednak je unutar svake vrste (Golub i Green, 1991.). Njegova je uloga stabilizacija molekule, što je dokazano istraživanjem provedenom na miševima s neaktivnim genom za ß lanac. Takvi miševi nisu imali niti jednu β MHC molekulu skupine I izloženu na površini svojih stanica (Williamson i sur., 1989.).

Glavna funkcija MHC molekula skupine I je vezanje prerađenih stranih proteinskih antigena i njihovo prikazivanje na površini stanica citotoksičnim T-limfocitima. Zbog toga je najvažniji dio molekule upravo onaj koji veže antigeni peptid. Taj se dio sastoji od 180 aminokiselina, koji čine α1 i α2 domene. Te dvije domene zajedno tvore žlijeb u koji se veže prerađeni peptid (Andreis, 2004.). U žlijeb se može vezati 8 - 10 aminokiselina (Chicz i sur., 1992.). Polimorfnost MHC I gena omogućava stvaranje različitih stereokemijskih površina žljebova. Pojedina MHC molekula sposobna je prikazati mnogo različitih antigenih peptida, no ipak, zbog postojanja jednog žlijeba, prikazuje samo po jedan peptid. Koji će se peptid vezati u vezni žlijeb ovisi o aminokiselinskoj građi pojedinog veznog žlijeba. MHC geni skupine I visoko su konzervirani i unutar vrste i među vrstama (Guillemot i sur., 1986.). Ljudski MHC I genski sustav sastoji se od 3 regije koje čine HLA-A, B i C geni. Oni zajedno sadrže oko 2 milijuna pb (Male i sur., 1996.).

2.3.2.2 MHC molekule skupine II

MHC molekule skupine II imaju znatno suženiju ekspresiju od MHC molekula skupine I. One su naime, izložene samo na površini stanica imunosnog sustava koje prikazuju antigen (makrofazi, dendritične stanice, B-limfociti). Mogu se nalaziti, također i na površini epitelnih stanica, te na vezivno - tkivnim stanicama. Njihova uloga je prikazivanje antigena pomoćničkim T-limfocitima, koji onda pokreću otpuštanje citokina i započinju odgovarajući imunosni odgovor.

MHC molekule skupine II također su heterodimerne građe, sastoje se od dva lanca: **α i ß lanca** (slika 12).

α lanac se sastoji od:

- dvije izvanstanične domene - α1 i α2 domene,
- transmembranske regije - sastavljene od 30 aminokiselina i
- citoplazmatske regije koju čini 10 - 12 aminokiselina.

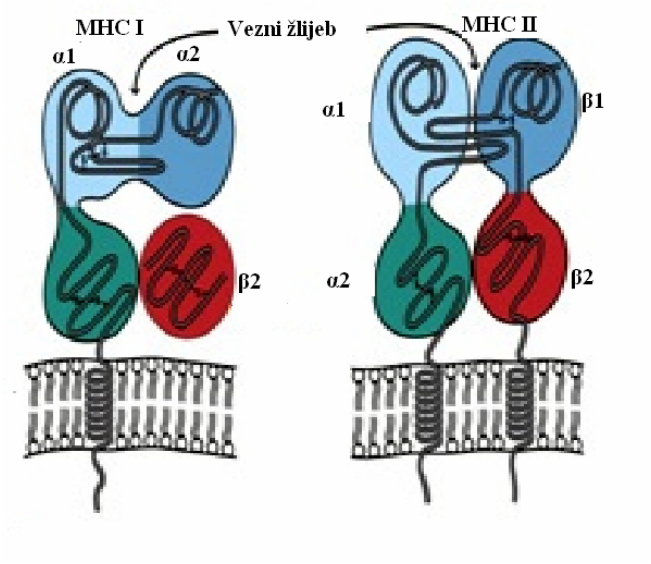
β lanac se sastoji od:

- dvije izvanstanične domene - ß1 i ß2 domene (svaka sastavljena od oko 90 aminokiselina),
- transmembranske regije - sastavljene od 30 aminokiselina i
- citoplazmatske regije koju čini 10 - 12 aminokiselina.

α lanac i ß lanac međusobno su povezani nekovalentnim vezama.

MHC molekule skupine II također su glikoproteinski transmembranski receptori koji vežu antigene peptide u žlijeb na vrhu molekule. Žlijeb receptora čine α1 i ß1 domena. Za razliku od veznog žlijeba MHC molekule skupine I, krajevi žlijeba MHC molekule skupine II su otvoreni, tako da vezani antigeni peptid viri izvan MHC molekule skupine II. Zbog toga se u žlijeb MHC molekule skupine II mogu vezati veći peptidi, sastavljeni od 13 do 24 aminokiselina (Male i sur., 2006.).
Domenska građa receptora određena je nukleotidnim slijedom drugog egzona gena koji kodiraju prvu domenu receptora (α1 ili β1), odnosno vezni žlijeb receptora koji veže peptidni odsječak antigena. Raznolikost aminokiselina koje tvore vezni žlijeb pojedine MHC molekule razlog su postojanja različite sklonosti jedinki prema pojedinim antigenim peptidima.

Geni koji kodiraju za α i β lance MHC molekula skupine II smješteni su u tzv. „D regiji". U ljudi tu regiju nazivamo HLA - D regija. Veličine je oko 1000 kb. Sadrži lokuse DR, DQ i DP s pripadajućim genima DRA, DRB, DQA, DQB, DPA i DPB.
β lanci MHC molekula skupine II izrazito su polimorfni. U populaciji može biti prisutno i do nekoliko stotina različitih alela. α lanci jednog haplotipa mogu se spajati s β lancima drugog haplotipa i obratno. Zbog toga heterozigotna jedinka na površini svojih stanica koje prikazuju antigen može imati izloženo i više od deset MHC molekula skupine II (Andreis i sur., 2004.).



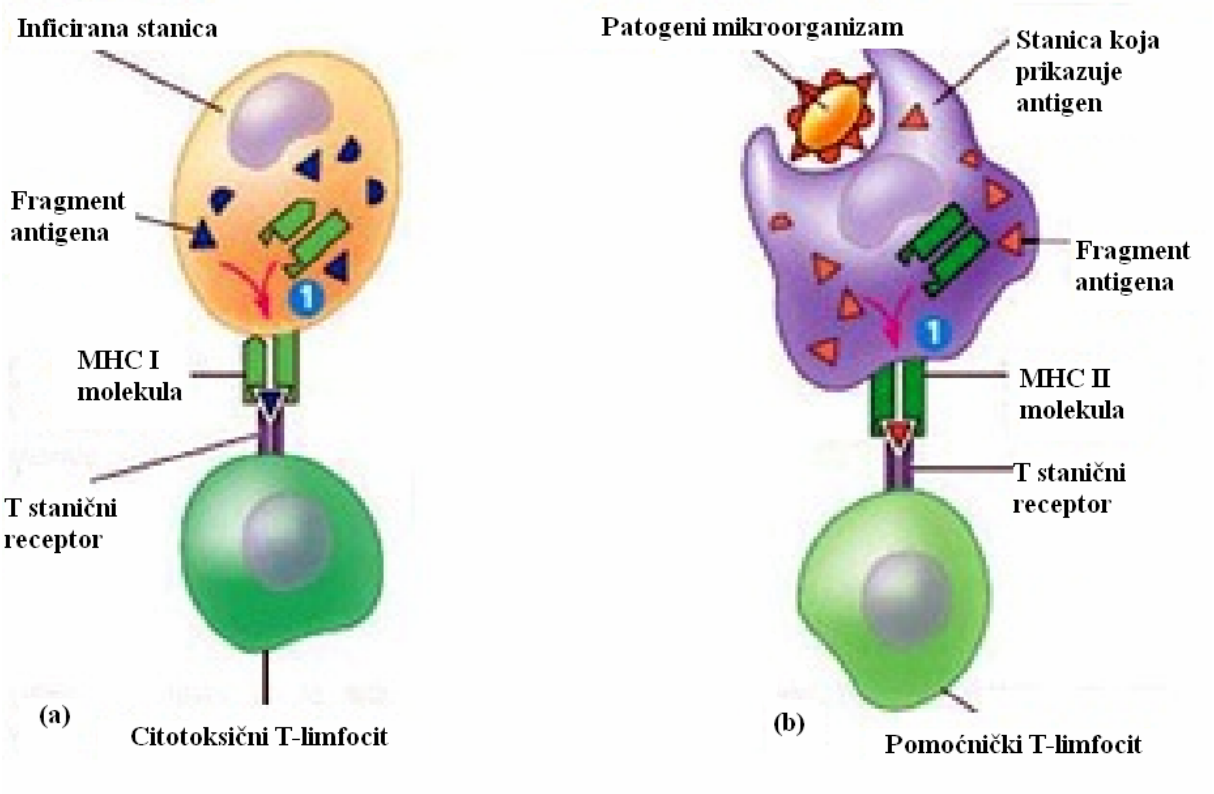
Slika 12. Shematski prikaz građe MHC molekula skupine I i II (izvor: Kindt i sur., 2007.).

2.3.3 Funkcija MHC molekula skupine I i II u imunosnom sustavu

MHC molekule skupine I i II ne razlikuju se značajno u strukturi, ali zato postoje razlike u njihovim funkcijama i načinu pokretanja imunosnog odgovora (slika 13).

MHC molekule skupine I imaju važnu ulogu u pokretanju imunosnog odgovora domaćina u obrani od unutarstaničnih patogenih mikroorganizama. Izložene su na površini svih stanica kralješnjaka koje imaju jezgru. U inficiranoj stanici, patogeni mikroorganizam prerađuje se i razlaže na antigene peptide, odnosno kratke aminokiselinske lance (osam do deset aminokiselina). Zatim se ti peptidi vežu na MHC molekule skupine I koje ih izlažu na površini inficirane stanice. Citotoksični T-limfociti na svojoj površini uz receptor imaju izloženu i molekulu CD8. Upravo se uz pomoć te molekule, vežu na MHC molekulu skupine I (slika 13a). Ukoliko stanica nije inficirana, ona na svojoj površini ima MHC I molekule sa izloženim vlastitim proteinima. Citotoksični T-limfociti vežu se samo na MHC molekule skupine I na inficiranoj stanici. To znači da oni prepoznaju samo strani antigen vezan i izložen na MHC molekuli skupine I, na površini bilo koje stanice domaćina inficirane unutarstaničnim patogenim mikroorganizmom, npr. virusom.

MHC molekule skupine II izložene su samo na specijaliziranim stanicama koje imaju ulogu prikazivanja antigena (makrofazi, B-limfociti, dendritične stanice). Izvanstanični patogeni mikroorganizmi u tim se stanicama, nakon što budu fagocitirani, razlažu na antigene peptide. Prerađeni antigeni izlažu se na površini stanica koje prikazuju antigen tako što su vezani na MHC molekule skupine II. Pomoćnički T-limfociti na svojoj površini imaju izložene molekule CD4. To su molekule preko kojih se pomoćnički T-limfociti vežu na MHC molekule skupine II. Njihovim vezanjem započinje otpuštanje citokina i pokretanje različitih puteva imunosnog odgovora (slika 13b).



Slika 13. Mehanizam djelovanja MHC molekula skupine I (a) i II (b) u imunosnim reakcijama (izvor: https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images).

2.3.4 Geni glavnoga sustava tkivne podudarnosti

Genska regija glavnoga sustava tkivne podudarnosti (MHC genska regija) kromosomska je regija s preko 200 kodirajućih lokusa. Sastoji se od MHC gena skupine I i II koji kontroliraju sve specifične imunosne reakcije, te od još nekih gena koji imaju ulogu u rastu i razvoju organizma. Lokusi MHC skupina I i II najpolimorfniji su lokusi u genomu kralješnjaka. U nekih vrsta, njihov se polimorfizam očituje u postojanju više desetaka, pa čak i više stotina alela po lokusu. Budući da su MHC lokusi smješteni vrlo blizu jedan drugome na kromosomu, jedinka nasljeđuje kombinaciju MHC alela ili haplotip. Svi MHC geni su koodominantni, odnosno na stanicama se nalaze izložena oba kompleta antigena nasljeđena i od majke i od oca. Geni MHC sustava nasljeđuju se prema Mendelovim zakonima genetike. Prema tome, postoji 25% vjerojatnosti da će dva potomka istih roditelja imati iste haplotipove, 50% vjerojatnosti da će imati jedan isti haplotip, a drugi različit, te 25% vjerojatnosti da će im oba haplotipa biti različita (Stites i sur., 1989.).

2.3.5 Evolucija gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnosti evolucijski razvio se u isto vrijeme kad i adaptivni imunosni sustav, točnije prije otprilike 528 milijuna godina (Danchin i sur., 2004.). Bilo je to razdoblje nakon razdvajanja čeljustoustih i nečeljustoustih kralješnjaka (Klein i sur., 2000.). Postoji teorija da je MHC genska regija nastala procesom transformiranja i ponovnog kombiniranja postojećih gena ili njihovih dijelova (*eng*. molecular tinkering) (Danchin i sur., 2004.). Prije radijacije čeljustousta MHC genska regija prošla je kroz tzv. *en-bloc* duplikaciju (Danchin i sur., 2003). Smatra se da je to važan mehanizam nastanka novih gena (Darbo i sur., 2008.). Geni se nisu duplicirali pojedinačno, već u skupinama. Zbog toga se skupna povezanost MHC gena smatra njihovom evolucijski očuvanom osobinom (Darbo i sur., 2008.). Isto tako, prostorno grupiranje gena sa sličnom funkcijom, pogodovalo je usporednoj evoluciji više lokusa (Trowsdale, 2002.). Novonastali geni postali su ili aktivni geni, ili pseudogeni, ili su pak bili uklonjeni iz genoma. Na taj način nastala je višegenska porodica, tzv. MHC genska regija, sastavljena od srodnih gena i pseudogena. Stvaranje novih i uklanjanje starih gena iz regije naziva se *birth-and-death* evolucijom (Piontkivska i Nei, 2003.).

2.3.6 Polimorfnost MHC genske regije

Genska organizacija MHC regije skupine II razlikuje se od vrste do vrste, što je dokaz brze evolucije MHC gena (Kelley i sur., 2005.). Vrste se mogu razlikovati po broju specifičnih MHC II lokusa. Tako se u ljudi može pronaći jedan DRA lokus, devet DRB lokusa, dva DQA lokusa i tri DQB lokusa (http://hla.alleles.org/alleles). U rodu *Equus* npr. DRA lokus prisutan je u samo jednoj kopiji, dok se lokusi DRB, DQA i DQB, pojavljuju u tri kopije (Tseng i sur., 2010.).

MHC geni među najraznolikijim su genima u genomu sisavaca (Bernatchez i Landry, 2003.). Za lokuse koji imaju dva ili više alela, te je učestalost pojavljivanja najčešćeg alela u populaciji manja od 0,99%, kažemo da su polimorfni (Klein i sur, 1987.b). Ljudski geni MHC skupine I (HLA I geni) imaju od 50 do 200 različitih alela. Kod gena MHC skupine II koji kodiraju Dβ lanac do danas je opisano postojanje 20 do 70 alela (Day i Schultz, 2013.). Značajno je, također, da se genska struktura i organizacija MHC lokusa razlikuje među vrstama. Druga osobitost MHC regije je njihova poligenost. MHC receptori kodirani su,

naime, većim brojem gena. Polimorfizam i poligenija zajedno pridonose raznolikosti molekula receptora izraženih na stanicama pojedine jedinke.

MHC polimorfizam može nastati ili kao rezultat genske konverzije, odnosno zamjene pojedinih dijelova gena s dijelovima drugog gena, ili pak genskom rekombinacijom između različitih alela istog lokusa. Također može nastati i točkastim mutacijama koje uzrokuju promjenu pojedinog nukleotida (Andreis i sur., 2004.).

MHC aleli razlikuju se ponekad i u više od 100 nukleotida, te u više od 50 aminokiselina (Orr i sur., 1979.). Raznolikost polimorfnih lokusa ograničena je na određene regije gena, odnosno proteina koje kodiraju (Klein i sur., 1987.b). Te su regije u MHC molekula skupine I domene α1 i α2, a u MHC molekula skupine II domene α1 i β1. Značajno je napomenuti da upravo te domene grade funkcionalni dio receptora, odnosno žlijeb receptora u koji se veže antigeni peptid (Hughes i Yeager, 1998.), po čemu se i nazivaju regijama za vezanje antigena, odnosno tzv. PBR regijama (*eng*. peptide - binding region*)*. Unutar tih regija postoje izrazito varijabilna mjesta koja pokazuju veći udio nesinonimnih od sinonimnih supstitucija, što je suprotno situaciji kod neutralnih regija genoma ili gena koji podliježu purifikacijskom selekcijskom pritisku (Hughes i Nei, 1988., Gyllensten i sur., 1996.). Znanstvenik Huttley je još 1999. godine tvrdio da je HLA regija jedna od 11 genskih regija koje imaju najveću veznu neravnotežu mikrosatelitskih lokusa unutar čitavog ljudskog genoma (Huttley i sur., 1999.).

Za razumijevanje MHC polimorfizma potrebno je razjasniti mehanizme nastajanja raznolikosti unutar MHC gena, te mehanizme selekcije koji sudjeluju u oblikovanju tih raznolikosti.

Glavni nositelj polimorfizma MHC molekula na genskoj razini je egzon 2. Raznolikost među alelima grupirana je u baš tom dijelu gena, pa je to i razlog da se u istraživanjima gena MHC skupine II kao pokazatelj funkcionalnog polimorfizma redovito analizira baš egzon 2 (Murray i sur., 1999.). Varijabilnost funkcionalnog dijela receptora temelji se na raznolikosti egzona 2. (Hughes i Yeager, 1998., Kindt i sur., 2007.). Raznolikost među alelima egzona 2 nalazimo također i na razini jedinke. Zbog koodominantnog nasljeđivanja su na stanicama jedinke izraženi receptori naslijeđeni od oba roditelja. Sposobnost receptora da vežu različite antigenske peptide raste s razinom raznolikosti unutar te genske regije MHC. Građa receptora izravno utječe na pokretanje i učinkovitost imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odnosno njegovu prijemljivost ili otpornost na infekcije (Kindt i sur., 2007). Polimorfnost MHC gena povezana je s prirodnim odabirom, te usporednom evolucijom

domaćina i patogenog mikroorganizma (Bernartchez i Landry, 2003.). Zbog svojih jedinstvenih i važnih funkcija geni MHC trenutno predstavljaju najbolji sustav za procjenu mogućnosti prilagodbe vrste na promjene u okolišu (Bernatchez i Landry, 2003., Sommer, 2005.).

Sposobnost prilagodbe različitim uvjetima okoliša ovisi o genskoj raznolikosti populacije (Reed i Frankham, 2003.). Smanjena MHC genska raznolikost dovodi se u direktnu vezu sa smanjenom sposobnošću jedinki da se uspješno obrane od novih i promijenjenih uzročnika bolesti (Frankham, 2003.). Imunosni odgovor predstavlja jedan od osnovnih čimbenika preživljavanja jedinke, na način da određuje njenu sposobnost da se obrani od patogenih mikroorganizama, ali isto tako i da uspostavi određeni međuodnos s pripadnicima ostalih vrsta iz okoliša (Lazzaro i Little, 2009.). Raznolikost gena čija je funkcija vezana uz imunosne reakcije ima velik utjecaj na otpornost, odnosno prijemljivost domaćina na određeni patogeni mikroorganizam. Raznolikost MHC molekula jedinke izravno je povezana s raznolikosti receptora na njenim T-limfocitima, te zbog toga i s njenom otpornosti na patogene mikroorganizme (Klein, 1986.). Raznolikost MHC molekula odražava se kroz povećani udio nesinonimnih nad sinonimnim nukleotidnim supstitucijama u funkcionalno važnim dijelovima receptora, odnosno antigen vezujućim mjestima. Smatra se da su nesinonimne supstitucije pokretač procesa selekcije (Hughes i Nei, 1988., Jeffery i Bangham, 2000.).

U populaciji koja je izložena djelovanju različitih patogenih mikroorganizama, heterozigotna jedinka za određeni MHC lokus, ima prednost u preživljavanju nad homozigotnom jedinkom. Ta prednost rezultat je njene sposobnosti prikazivanja većeg broja antigenih peptida T-limfocitima, u odnosu na homozigotnu jedinku. Navedeni se mehanizam naziva prednost heterozigotnih jedinki, *eng.* overdominant selection.

Izbor partnera za parenje također je jedan od mehanizama koji uvjetuju selekciju na MHC lokusima i održavanje visoke razine polimorfizma (Penn i Potts, 1999.). Pretpostavka je da jedinka odabire partnera s različitim MHC alelima, što ima za posljedicu nastajanje heterozigotnog potomstva koje je otpornije na bolesti. Postoji također i hipoteza izbjegavanja parenja u srodstvu (Potts i Wakeland, 1990.), koja je osnovana na pretpostavci da su jedinke s istim haplotipovima najvjerojatnije u srodstvu, te se zbog toga izbjegava parenje s njima (Jordan i Bruford, 1998.).

Hipoteza prednosti preživljavanja jedinki s rijetkim alelima u populaciji pretpostavlja da je genska raznolikost MHC molekula očuvana kroz usporednu evoluciju domaćina i patogenih mikroorganizama (Takahata i Nei, 1990.). Naime, pojavom novog patogenog mikroorganizma rijetki MHC aleli u populaciji su ti koji će pokrenuti imunosni odgovor. Rijetki aleli će se tako proširiti u populaciji. S druge strane evoluirati će i patogeni mikroorganizam i preživjeti će samo oni oblici koji su prepoznati od rijetkih alela (Jeffery i Bangham, 2000.). Ta hipoteza pretpostavlja da aleli rijetki u populaciji imaju prednost u obrani od novih patogenih mikroorganizama. Ta je prednost određena polimorfizmom na MHC lokusima (Clarke i Kirby, 1966.).

2.3.7 Testovi selekcije

MHC geni su pod djelovanjem pozitivne selekcije. Eksperimentalni podatci pokazali su da se radi o ravnotežnoj selekciji koja se odražava kroz postojanje više funkcionalnih alela koji pripadaju istom lokusu u populaciji ili vrsti, te kroz njihov opstanak kroz dugo evolucijsko razdoblje, milijunima ili čak desetcima milijuna godina (Hughes i Nei 1988., Richman, 2000.). Da bi se dokazalo djelovanje selekcije na određenom MHC lokusu primjenjuju se odgovarajući testovi na populaciji koji testiraju ili sadašnju populaciju, ili populaciju kroz povijest ili populaciju kroz evoluciju vrste.

2.3.7.1 Testovi selekcije u sadašnjoj populaciji

Postojanje selekcije u sadašnjoj populaciji vidljivo je samo u onim generacijama koje su bile pod djelovanjem selekcije. Za vjerodostojnost ovog testiranja vrlo važno je uzeti u obzir broj ispitanih jedinki, te broj alela koji su pronađeni u populaciji (Garrigan i Hedrick, 2003.).
U svrhu testiranja radi se test Hardy-Weinbergove ravnoteže.
Hardy-Weinbergov zakon zasniva se na teoretskoj, idealnoj populaciji, tj. na populaciji koja zadovoljava nekoliko uvjeta: nema nepravilnosti u staničnoj diobi (mejozi), populacija je zatvorena i neograničeno velika, te u populaciji nema novih mutacija, a jedinke nisu izložene selekciji. Unutar populacije jedinke se sparuju nasumce.
Nakon jedne generacije slobodnog sparivanja uspostavlja se određeni omjer između homozigota i heterozigota koji je ovisan o početnoj učestalosti alela. Iz generacije u

generaciju, pod gore navedenim uvjetima, u populaciji će ostati ista učestalost alela i genotipova, odnosno fenotipova.

No, u prirodi su populacije ograničene u svojoj veličini, što čini odstupanje od idealnih uvjeta potrebnih za Hardy-Weinbergovu ravnotežu. S obzirom da zigote predstavljaju uzorak gameta iz prethodne generacije, svaka promjena može se odraziti na učestalost alela i genotipova u sljedećoj generaciji, odnosno može se poremetiti uspostavljena ravnoteža. Najčešće se kao razlozi narušavanja ravnoteže navode još migracija, selekcija, mutacije i selektivno sparivanje.

U Hardy-Weinbergovom testiranju se pokazateljima djelovanja selekcije smatraju odstupanje od ravnoteže i višak heterozigota zbog njihove selektivne prednosti.
Ipak, većina istraživanja životinjskih populacija pokazuje da ne postoji otklon od Hardy-Weinberg ravnoteže (Garrigan i Hedrick, 2003.). Kao objašnjenje navodi se činjenica da selekcija nije dovoljno jaka sila da ostavi traga unutar jedne generacije ili pak da do odabira ne dolazi u svim generacijama i na svim prostorima. Jedno od objašnjenja jest i da se selekcija ne odražava kroz povećanje heterozigotnosti unutar populacije (Piertney i Oliver, 2006.).

Jedan od pokazatelja selekcije u sadašnjoj populaciji je i odstupanje od nasumičnog parenja. (Yamazaki i sur., 1976., Egid i Brown, 1989., Ober i sur., 1992., Potts i sur., 1991., Landry i Bernatchez, 2001., Reusch i sur., 2001.).

Dokazano je da postoji veza između određenih MHC alela i podložnosti, ili pak otpornosti na određene bolesti, što je također jedan od pokazatelja djelovanja selekcije u sadašnjoj populaciji (Hedrick, 2004.), o čemu će biti više riječi u narednim poglavljima.

2.3.7.2 Testovi selekcije kroz povijest populacije

Djelovanje selekcije kroz povijest populacije dokazuje se pomoću testova koji se temelje na utvrđivanju učestalosti alela u populaciji. Djelovanje ravnotežne selekcije odražava se fiksacijom više funkcionalnih alela u populaciji (Hedrick i Thomson, 1983.).

Jedna od posljedica selekcije je i neuravnoteženo vezanje alela različitih lokusa u tzv. haplotipove. Ta je pojava karakteristična za MHC gensku regiju. Prisutnost određenog

haplotipa rezultira selektivnom prednošću u otpornosti na određene patogene mikroorganizme (Klitz i Thomson, 1987.).

2.3.7.3 Testovi selekcije kroz evoluciju vrste

Za dokazivanje selekcije koja se događa kroz evoluciju vrste najčešće se koriste dN/dS testovi ili se izrađuju genealoška stabla alela određenog lokusa.

dN/dS testom utvrđuje se omjer nesinonimnih i sinonimnih supstitucija u kodonima ispitujućih MHC alela. Ravnotežnom selekcijom nastaju novi proteini, zbog čega se kod MHC alela očekuje veća učestalost nesinonimnih nukleotidnih supstitucija, u odnosu na sinonimne. Također se podrazumijeva i njihovo zadržavanje u populaciji. U prilog tome treba navesti činjenicu da su nesinonimne nukleotidne supstitucije zapažene u dijelovima MHC gena koji kodiraju dijelove molekule odgovorne za koji vezanje antigenih peptida (Hughes i Nei, 1988., Hughes i Nei, 1989.). Metaanaliza kojom su uspoređivani rezultati velikog broja istraživanja u kojima se dN/dS testovima analiziralo djelovanje selekcije na MHC gensku regiju kod različitih vrsti, pokazala je da je u većini istraživanja zapažen veći broj nesinonimnih u odnosu na sinonimne supstitucije (Bernatchez i Landry, 2003.).

Izrada genealoškog stabla alela za određeni lokus drugi je način dokazivanja selekcije koja se događa kroz povijest vrste. Ravnotežnom selekcijom se u populaciju tijekom evolucije unose nove mutacije, ali se zadržavaju i one stare (Takahata i Nei, 1990.). Često se alel koji nastane u nekoj ancestralnoj vrsti zadržava i nakon razdvajanja vrsti. Zbog toga nailazimo na alele koji su sličniji alelima drugih vrsti s kojima dijele zajedničko podrijetlo, nego što su slični međusobno unutar iste vrste. Tu se radi o tzv. trans-specijskom polimorfizmu (Klein, 1980.) koji je izravan dokaz djelovanja selekcije kroz povijest vrste. Posljedica trans-specijskog polimorfizma je neslaganje genealoških stabala alela s filogenijskim stablima (Piertney i Oliver, 2006.).

2.3.8 Povezanost polimorfizma MHC gena s prijemljivosti i otpornosti jedinke na infekciju patogenim mikroorganizmima i infestaciju različitim vrstama parazita

Povezanost genske raznolikosti MHC sustava i otpornosti, odnosno osjetljivosti domaćina na patogene mikroorganizme, nije još sasvim razjašnjena. Empirijski dokaz da je prirodni odabir i opstanak jedinke ovisan o njenim MHC genima, odnosno o patogenom mikroorganizmu, zasnovan je na analizama raznolikosti MHC gena i njihove povezanosti s otpornosti, odnosno prijemljivosti na patogene mikroorganizme (Spurgin i Richardson, 2010.). Određeni MHC haplotipovi mogu biti povezani s većom ili manjom otpornosti ili pak prijemljivosti na određeni patogeni mikroorganizam (Apanius i sur., 1997., Medina i North, 1998.). Pokusne infekcije kongeničnih miševa potvrdile su teoriju da MHC geni imaju utjecaj na otpornost organizma na infektivne uzročnike (Apanius i sur., 1997.). Koliko su te teorije primjenjive na populacije koje žive slobodno u prirodi, još nije u potpunosti razjašnjeno (Carrington i sur.,1999., Langefors i sur., 2001.), no proučavanje populacija koja imaju specifična staništa i izložene su različitim patogenim mikroorganizmima, od velike je važnosti u razjašnjavanju uzroka postojanja raznolikosti MHC gena.

Provedena su brojna istraživanja u kojima se pokušavalo utvrditi postoji li veza između određenih MHC alela i zaraznih bolesti, kako u ljudi, tako i u životinja (Deter i sur., 2008., Fernandez de Mera i sur., 2009., Schwensow i sur., 2010., Cutrera i sur., 2011.). Što se tiče povezanosti određenih alela HLA genske regije i zoonotske bolesti leptospiroze, značajno je spomenuti istraživanje u kojem je dokazana veća prijemljivost na leptospirozu u ljudi koji imaju HLA-DQ6 alel (Lingappa i sur., 2004.).

Patogeni mikroorganizmi i različite parazitske vrste imaju značajnu ulogu u oblikovanju genomske raznolikosti populacije domaćina, a posebice njihovih gena uključenih u regulaciju imunosnog odgovora. U brojnim istraživanjima proučavao se odnos između patogena i domaćina na osnovu raznolikosti domaćinovih MHC gena. Analizom MHC gena endemske vrste voluharice istočne Argentine, *Ctenomys talarum,* pokušalo se uvidjeti kakav utjecaj imaju gastrointestinalni parazitski oblići (*Trichuris pampeana, Paraspidodera uncinata* i *Graphidioides subterraneus),* te praživotinjske vrste (*Eimeria* sp.*)* na pokretanje imunosnog odgovora (Cutrera i sur., 2011.). Analizirana je MHC genska raznolikost voluharice, a nakon toga je provedena statistička analiza povezanosti sklonosti infestaciji različitim rodovima parazita, s obzirom na imunokompetentnost jedinke. U istraživanoj populaciji zapažen je značajno velik broj heterozigota za DRB lokus. Analize su pokazale da postoji veća

povezanost specifičnih DRB alela sa sklonošću infestaciji određenom parazitskom vrstom i imunokompetentnosti domaćina, nego sa heterozigotnosti za DRB lokus. To potvrđuje važnu ulogu ravnotežne selekcije pod utjecajem patogena u nastajanju MHC raznolikosti kod vrste *Ctenomys talarum*.

Empirijskih dokaza za postavljenu hipotezu, da se varijabilnost MHC regije održava prirodnim odabirom ovisnim o patogenu, a posredovanom ili heterozigotnom prednosti ili učestalosti alela, ima relativno malo. Jedan od njih je temeljen na istraživanju varijabilnosti egzona 2 DRB lokusa u vrste *Rhabdomys pumilio,*vrste miša kojemu je stanište južna Kalahara (Froeschke i Sommer, 2005.). U tom istraživanju pokušavao se objasniti međuodnos varijabilnosti DRB genske regije i sklonosti infestaciji jedinki endoparazitima. Infestacija jedinke određivala se na osnovu prisutnosti jajašaca parazita u izmetu. Među DRB alelima infestiranih životinja (58,6%) utvrđeno je postojanje 20 novih alela s visokom razinom međusobne raznolikosti. DRB genski sljedovi koji kodiraju mjesta za vezanje antigena, pokazivali su značajno veći udio nesinonimnih u odnosu na sinonimne supstitucije, što ide u prilog ravnotežnoj selekciji. Na osnovu smanjene podložnosti infestacijama, dokazana je prednost preživljavanja heterozigotnih jedinki u populaciji. Znatno veći broj jajašaca parazita pronađen je u izmetu homozigotnih jedinki. Alel *Rhpu-DRB*1* pojavljivao se puno češće u infestiranim jedinkama, odnosno u jedinkama s većim brojem jajašca parazita u izmetu, dok je alel *Rhpu-DRB*8* značajno bio više zastupljen u jedinkama s malim brojem pronađenih jajašca u izmetu. Ovi rezultati dokazuju da je MHC polimorfizam u vrste *Rhabdomys pumilio* određen prirodnim odabirom i to na osnovu sklonosti odnosno podložnosti jedinke infestaciji patogenom vrstom parazita.

U još nekoliko, u daljnjem tekstu navedenih istraživanja, dokazano je da se prirodni odabir odražava kroz prednost preživljavanja heterozigotnih jedinki, te jedinki koje imaju određene alele. U jednom od njih, britanska grupa znanstvenika proučavala je postoji li povezanost MHC gena i infestacije islandske populacije voluharica (*Arvicola terrestris)* krpeljima (*Ixodes ricinus)* i buhama (*Megabothris walkeri*). Dokazali su infestiranost jedinki heterozigotnog genotipa s manjim brojem parazita, nego što je slučaj u jedinki homozigotnog genotipa (Oliver i sur., 2009.)

U istraživanju otpornosti, odnosno sklonosti ovaca infestaciji gastrointestinalnim parazitima (Hickford i sur., 2011.) pokušavala se pronaći veza između određenih DQA2 alela i infestacije. Prisutnost infestacije potvrđivana je na osnovu prisutnosti jajašaca parazita u

izmetu ovaca. Istraživanje je provedeno na velikoj grupi ovaca (4 676 jedinki) s Novog Zelanda, u starosnoj dobi od 4 mjeseca, te istih jedinki u dobi od 9 mjeseci. Ovce su bile uzgajane na 25 različitih farmi. Genotipizacijom DQA2 lokusa utvrđeno je postojanje ukupno 21 DQA2 alela u istraživanoj populaciji. U tom istraživanju dokazano je da postoji povezanost broja pronađenih jajašaca parazita, odnosno intenziteta infestacije, sa starosnom dobi domaćina, kao i s određenim haplotipom domaćina. Prisutnost određenih alela, odnosno haplotipova, te njihova učestalost, razlikovala se od farme do farme. Alel *0103 je pronađen kod jedinki na svim farmama. Kombinacija alela *0101–*1601 bila je prisutna kod dvije jedinke na samo jednoj farmi. Iznimka je alel *1201 čija je prisutnost povezana s povećanim brojem jajašaca u obje dobne skupine. Povezanost alela i haplotipova bila je dobno specifična, te isto tako specifična s obzirom na vrstu parazita kojima su jedinke bile infestirane.

Malo je istraživanja u kojima se pojedinačni selekcijski pritisak određenih parazitskih vrsta proučavao u višestruko infestiranih jedinki. Proučavanjem dviju vrsta lemura *(Cheirogaleus medius* i *Microcebus murinus)* istraživano je može li se među dvije simpatički i ekološki slične vrste, koje su infestirane sličnim parazitskim vrstama, naći poveznica s prisutnosti specifičnih MHC alela (Schwensow i sur., 2010.). Većina parazitskih vrsti iz roda *Ascaris* pronađena je u obje istraživane vrste lemura. Također je pronađen DRB alel koji je u obje vrste lemura u pozitivnoj vezi s infestacijom domaćina parazitom iz roda *Ascaris*. DRB aleli infestiranih jedinki vrlo su slični jedni drugima, ali istovremeno jako varijabilni u odnosu na DRB alele neinfestiranih jedinki, s obzirom na aminokiselinski sastav funkcionalno značajnog mjesta MHC molekule, odnosno mjesta vezanja antigena. Rezultati navedenog istraživanja izravano dokazuju povezanost određenih DRB alela s parazitskim vrstama iz roda *Ascaris*, iz čega se može zaključiti da određene parazitske vrste vrše izravan selekcijski pritisak na MHC gene divljih životinja.

U istraživanju raznolikosti egzona 2 DRB2 lokusa iberskog crvenog jelena *(Cervus elaphus hispanicus),* proučavan je utjecaj polimorfizma na podložnost jedinke krpeljima i infekciji tuberkulozom (Fernandez-de-Mera i sur., 2009.). Nijedan DRB2 alel nije direktno povezan s većom otpornosti ili pak prijemljivosti na makroparazite, krpelje. U istraživanje je bilo uključeno više vrsti krpelja: *Hyalomma marginatum, Rhipicephalus bursa, Hyalomma lusitanicum* i *Dermacentor marginatus*. Nije ustanovljena niti povezanost određenog alela DRB2 lokusa s povećanom prijemljivosti ili otpornosti na uzročnika bolesti tuberkuloze *(Mycobacterium tuberculosis*). No, usprkos tome pronađeni su zanimljivi međuodnosi nekih alela sa prijemljivosti domaćina infekciji. Rezultati istraživanja podupiru teoriju da su MHC

geni skupine II genomski elementi koji sudjeluju u povećanju „fitnessa“ populacije, koji može biti oblikovan djelovanjem parazita. Gubitak genomske raznolikosti populacije može voditi ka povećanju prijemljivosti na zarazne bolesti. Proučavanje MHC gena je i ekološki značajno, zbog povezanosti infekcije i evolucije istraživane populacije. Zaključak istraživanja bio je da MHC imunogenska istraživanja mogu poslužiti kao dobar izvor podataka za praćenje populacije iberskog crvenog jelena.

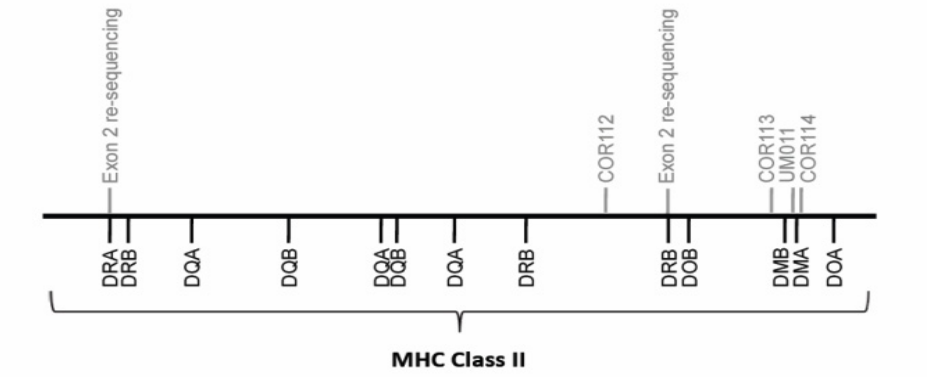
Mišoloki glodavci, voluharice (*Myodes glareolus)* domaćini su i rezervoari virusa iz roda *Hantavirus*. Infekcija ljudi hantavirusom uzrokuje teški oblik hemoragijske groznice s renalnim sindromom. Klinička slika pacijenata razlikuje se ovisno o njihovoj HLA genskoj strukturi. Istraživano je da li se s obzirom na polimorfizam egzona 2 DQA genske regije, pojedini DQA alel domaćina može povezati s prisutnošću hantavirusa, kao i još nekih virusa, istog domaćina, npr. virusa kravljih boginja (Deter i sur., 2008.). Rezultati istraživanja pokazali su da postoji povezanost pojedinih DQA alela s prisutnosti virusa. Heterozigotnost jedinke nije dovedena u vezu s virusnom infekcijom.

2.3.9 MHC genski sustav porodice Equidae

MHC genski sustav konja naziva se još ELA (skraćenica od *eng.* equine lymphocyte antigen*)* ili Eqca *(*skraćenica od *Equus caballus*). Taj je sustav gena smješten na 20 - tom kromosomu, a točna lokacija mu je 20q14-q22 (Makinen i sur., 1989., Bailey i sur., 2000.). Njegovo mjesto na kromosomu utvrđeno je metodom *in situ* hibridizacije, tj. upotrebom hibridizacijskih sondi DNA čovjeka i svinje (Ansari i sur., 1988.)

MHC genski sustav porodice Equidae pogodan je za istraživanje genske raznolikosti, a isto tako i za komparativne genomske studije budući da rod *Equus* uključuje domaće vrste i one koje slobodno žive u prirodi na različitim staništima (Nowak, 1999.). Proces pripitomljavanja konja trajao je preko 6000 godina. Kompletan slijed baza genoma domaćeg konja objavljen je tek nedavno (Lindgren i sur., 2004.).

Evolucijsko razdvajanje MHC gena ljudi i konja dogodilo se prije otprilike 100 milijuna godina (Kelley i sur., 2005.), no usprkos tome imaju vrlo sličnu MHC gensku organizaciju. Razlikujemo ELA gene skupine I, II i III (Gustafson i sur., 2003.).



Slika 14. Shematski prikaz ELA gena skupine II (izvor: Andersson i sur., 2012.).

ELA II genska regija sastoji se od po tri DQA, DQB i DRB lokusa i samo jednog DRA lokusa (Tseng i sur., 2010., Andersson i sur., 2012.) (slika 14).

2.3.10 Dosadašnja istraživanja polimorfizma ELA genske regije skupine II

ELA geni skupine II proučavani su u domaćih konja, ali i u ostalih vrsta iz porodice Equidae (Bailey, 1994., Albright- Fraser i sur., 1996., Fraser i Bailey 1998., Horin i Matiasović, 2002., Brown i sur., 2004., Janova i sur., 2009.). Prvi sekvencirani ELA gen bio je upravo DRA gen (Albright i sur., 1991.). S obzirom da se DRA lokus u većini istraživanih vrsti ne odlikuje s polimorfnosti, npr. u pasa (Wenger i sur., 1999.) i svinja (Chardon i sur., 1999.) je monomorfan, značajno je napomenuti da porodica Equidae čini iznimku jer je kod nje uočen značajan polimorfizam DRA lokusa (Brown i sur., 2004.). U domaćih konja pronađeno je dosad pet DRA alela; DRA*0101, DRA*0201, DRA*0301, DRA*0401 i DRA*0501. Do danas je u porodici Equidae utvrđeno 23 alela DRA lokusa (Albright-Fraser i sur. 1996., Brown i sur, 2004., Luís i sur., 2005., Janova i sur. 2009.). Varijacije u nukleotidnom slijedu grupirane su većinom u dijelu egzona 2 koji kodira izvanstaničnu domenu receptora koja veže antigen.

Valja spomenuti nekoliko značajnijih istraživanja koja su se bavila problematikom polimorfizma egzona 2 lokusa ELA II genske regije. Na osnovu genske analize egzona 2 DRA lokusa 69 istraživanih jedinki iz populacije konja različitih vrsti: domaćih konja (*Equus caballus*), magaraca (*Equus asinus*), zebri (*Equus boehmi*), te azijske divlje vrste magarca (*Equus hemionus*), po prvi puta je napravljen referentni panel alela za tu ELA II gensku regiju (Brown i sur., 2004.). U istraživanju je pronađeno pet od šest otprije poznatih alela; ELA-DRA*0101, ELA-DRA*0201, ELA-DRA*0301, ELA-DRA*0501 (Albright-Fraser i sur., 1996.) i ELA-DRA*0601 (GenBank, AF5419361). Dokazano je i postojanje četiri nova alela DRA lokusa. Kod vrste *Equus caballus* pronađen je alel ELA-DRA*JBH11. Alel DRA*JBZ185 pronađen kod *Equus boehmi* i *Equus hemionus,* a aleli ELA-DRA*JBD3, ELA-DRA*JBD17 i ELA-DRA*JBH45 pronađeni su kod vrste *Equus asinus.*

U istraživanju genskog polimorfizma DRA i DQA lokusa (Janova i sur., 2009.) pronađeno je šest novih DRA i 13 novih DQA alela unutar roda *Equus*. Filogenijske analize tih dvaju lokusa dokazale su postojanje trans-specijskog polimorfizma u porodici Equidae. Odnosi među vrstama dobiveni filogenijskim analizama DRA i DQA lokusa razlikovali su se od odnosa među vrstama definiranih standardnom taksonomijom roda *Equus.* Razlikovali su se i od filogenijskih odnosa među vrstama dobivenih analizama sljedova nukleotida mitohondrijske DNA i sljedova nukleotida neutralnih gena.

Visoka razina polimorfizma zabilježena je i u ELA DRB, DQA i DQB lokusima (Fraser i Bailey, 1996., Fraser i Bailey, 1998., Horin i Matiasovic, 2002., Mashima, 2003., Andersson i sur., 2012.). Dosad je pronađeno 37 ELA DQA alela (Fraser i Bailey, 1998., Janova i sur., 2009.). Promjene jednog nukleotida zapažene uglavnom u DRA lokusu,dok su promjene više od jednog nukleotida karakteristika DQA lokusa. U oba slučaja nukleotidne promjene rezultiraju promjenom aminokiseline na mjestu MHC molekule koje služi za vezanje antigenog peptida (Albright-Fraser i sur., 1996.).

Preosjetljivost na ubod kukaca, *Culicoides* spp. i *Simulium* spp., u konja izaziva razvoj kroničnog alergijskog dermatitisa. Bolest se pojavljuje periodično, ovisno o prisutnim razvojnim stadijima kukaca. Prevalencija se razlikuje ovisno o geografskom položaju. Dvije su pasmine konja bile uključene u istraživanje povezanosti raznolikosti DRA i DRB3 lokusa i razvoja kroničnog alergijskog dermatitisa u konja. Bile su to švedska uzgojna linija konja podrijetlom s Islanda, te vrsta ponija (Andersson i sur., 2012.). Sekvenciranjem polimorfnih regija egzona 2 DRA i DRB3 lokusa, dokazano je da je raznolikost alela povezana s mogućnosti razvoja alergijskog dermatitisa nakon uboda kukaca. Posebno se to odnosilo na alel *COR112:274* u obje istraživane pasmine konja. Kombinacijom rezultata dobivenih istraživanjem mikrosatelitskih regija i genskih sljedova egzona 2 DRA i DRB3 lokusa dokazano je da je homozigotnost unutar cijele ELA II regije povezana sa povećanim rizikom oboljevanja konja od alergijskog dermatitisa.

U istraživanju polimorfizma ELA DRA lokusa (Kalemkerian i sur., 2011.), pokušalo se pronaći poveznicu između pojedinih DRA alela i prijemljivosti konja na virusni arteritis. Istraživanje je provedeno na konjima iz Argentine. Pronađena su tri ELA DRA alela u istraživanoj populaciji konja, no ne i veza između određenog alela i prijemljivosti konja na virusni arteritis.

Istraživanja genske raznolikosti egzona 2 ELA DRA lokusa provedena su i na dvije autohtone pasmine konja Hrvatske, hrvatskom hladnokrvnjaku i hrvatskom posavcu. U 88 istraživanih jedinki pronađena su ukupno četiri različita alela (DRA*0101, DRA*0201, DRA*Hld105, DRA*JBH11), od kojih je alel DRA*Hld105 po prvi puta opisan u literaturi. Novi alel rezultat je promjene aminokiseline u mjestu vezanja antigena (Arbanasić i sur., 2009).

Od istraživanja polimorfizma MHC II genske regije porodice Equidae značajno je spomenuti istraživanje polimorfizma egzona 2 DRA lokusa u magaraca (Arbanasić i sur., 2013.). Analiziran je DRA lokus u 248 magaraca s područja balkanskog poluotoka (Albanija, Bugarska, Hrvatska, Makedonija, Grčka i Crna Gora). Pronađeno je pet otprije poznatih DRA alela, a utvrđena su i dva nova. Novi alel Eqas-DRA*0601 nosio je sinonimnu, a alel Eqas-DRA*0701 nesinonimnu mutaciju. Zaključak istraživanja bio je da se DRA polimorfizam pojavio relativno nedavno u porodici konja, te da je pozitivna selekcija vjerojatno djelovala na DRA lokus relativno kratak vremenski period.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Uzorci seruma ili krvi konja

Za potrebe ovog istraživanja odabrala sam 200 uzoraka krvi ili seruma konja, ovisno o dostupnosti materijala za pojedinu jedinku. Svi su uzorci iz arhive Laboratorija za leptospire Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Odabrala sam ih na osnovu rezultata serološke pretrage na leptospirozu metodom mikroskopske aglutinacije (MAT). U istraživanje sam uvrstila 100 krvi/ seruma konja kod kojih je titar na leptospirozu bio 1600 i / ili veći. Uz svaki pozitivan uzorak u istraživanje sam uključila i uzorak negativne kontrole. Negativnom kontrolom smatra se uzorak krvi konja kod kojeg je titar na leptospirozu bio < 50, te je konj iz istih uvjeta uzgoja, odnosno boravišta (staje), u kojem je utvrđen serološki pozitivan uzorak krvi konja na leptospirozu. Uzorak negativne kontrole uzorkovan je u isto vrijeme kad i pozitivan uzorak. Podaci o jedinkama koje su korištene u istraživanju prikazani su u Prilogu 1.

3.2 Metoda mikroskopske aglutinacije (MAT)

Metoda mikroskopske aglutinacije referentna je serološka metoda za dijagnosticiranje leptospiroze kojom se utvrđuje prisutnost protutijela na leptospire u pretraživanom serumu. Metoda se izvodi s dvostrukim serijskim razrjeđenjima seruma kako bi se ustanovio titar protutijela za svaki pojedini antigen u panelu antigena. Panel antigena čini niz referentnih sojeva različitih serovara živih leptospira koje koristimo u izvođenju mikroskopske aglutinacije. Panel antigena prilagođen je pojedinoj vrsti životinje, a ovisan je o epizootiološkom i epidemiološkom stanju leptospiroze u državi (tablica 4).

Tablica 4. Panel antigena za provođenje MAT metode u svrhu serološkog dijagnosticiranja leptospiroze u konja prilagođen epizootiološkom i epidemiološkom stanju leptospiroze u R. Hrvatskoj.

Rb.	Serološka skupina	Serovar	Soj	Genomska vrsta
1	Grippotyphosa	Grippotyphosa	MoskvaV	*L. kirschneri*
2	Sejroe	Sejroe	M 84	*L. borgpetersenii*
3	Australis	Bratislava	Jež Bratislava	*L. interrogans*
4	Pomona	Pomona	Pomona	*L. interrogans*
5	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	*L. interrogans*
6	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	*L. interrogans*
7	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24	*L. interrogans*
8	Bataviae	Bataviae	Swart	*L. interrogans*

Materijal:

- pretraživani serumi konja

Pribor i oprema:

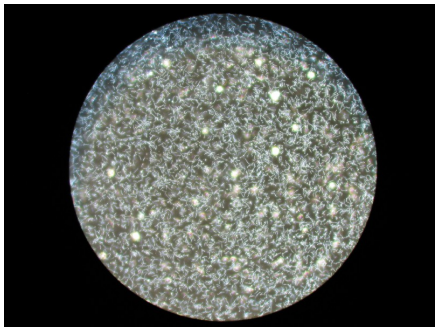
- mikrotitracijska plitica s 96 jažica V dna
- mikropipete s odgovarajućim nastavcima
- mikroskop s tamnim poljem, Olympus BX35, Olympus
- metalna eza
- plamenik
- termostatirana komora 28 - 30º C

Reagensi:

- panel antigena koji se sastoji od kulture živih leptospira različitih serovara, odnosno seroloških skupina
- fosfatni (PBS) pufer, pH 7,4

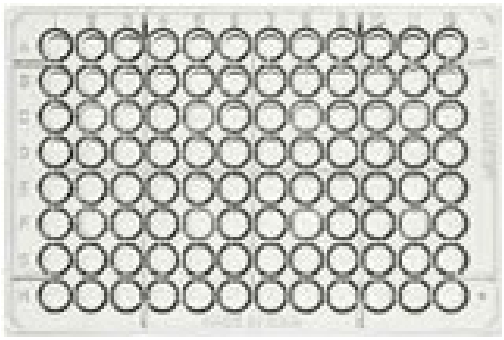
Postupak izvođenja MAT metode:

Prije izvođenja MAT metode provjerila sam gustoću, pokretljivost i čistoću antigena (živih leptospira različitih serovara) tako da sam kap kulture svakog pojedinog antigena mikroskopirala u tamnom vidnom polju. Za pretraživanje se rabe samo kulture antigena starosti do 10 dana, gustoće od 2 - 4 x 10^8 leptospira/ ml, bez vidljivog zagađenja (slika 15). Određivanje gustoće subjektivno se procjenjuje i označava oznakama 0 do 4+. Primjerenost subjektivne procjene procjenjuje se jednom godišnje brojanjem bakterija u komorici za brojenje stanica.



Slika 15. Kultura leptospira gustoće 2 x 10^8 leptospira/ml gledano pod mikroskopom s tamnim poljem.

MAT metoda provodi se u mikrotitracijskim pliticama (slika16). Mikrotitracijska plitica se postavi horizontalno, tako da ima 8 redova i 12 kolona.



Slika 16. Mikrotitracijska plitica za izvođenje MAT pretrage.

U svaku jažicu mikrotitracijske plitice otpipetirala sam po 50 µl PBS pufera. U jažice druge kolone dodala sam još po 50 µl pufera i po 4,2 µl pretraživanog seruma. Višekanalnom pipetom promiješala sam sadržaj druge kolone. Potom sam 50 µl tog sadržaja prebacila u treću kolonu, pa ponovno promiješala i ponovila postupak do jažica posljednje, dvanaeste kolone. Iz jažica posljednje kolone izbacila sam po 50 µl sadržaja. Tako sam od početnog

razrjeđenja ispitivanog seruma 1: 25, u jažicama druge kolone dobila razrjeđenje 1: 50, te slijedom u ostalim kolonama serijska dvostruka razrjeđenja seruma (u trećoj koloni 1:100, četvrtoj 1: 200, petoj 1: 400, šestoj 1: 800, sedmoj 1:1 600, sedmoj 1: 3 200, osmoj 1: 6 400 itd.). U posljednjoj koloni razrjeđenje ispitivanog seruma je 1: 51 200. Zatim sam u svaku jažicu dodala po 50 µl kulture živog antigena. Svaki red mikrotitracijske plitice, koji sam prethodno označila brojem, odgovara rednom broju određenog antigena iz panela antigena. Prva kolona sadrži samo živi antigen i predstavlja negativnu kontrolu antigena. Sadržaj mikrotitracijske plitice inkubira se dva sata u termostatu pri temperaturi 28 do 30º C. Očitavanje rezultata ispitivanja provodila sam pod mikroskopom s tamnim poljem, tako da sam procjenjivala udio živih leptospira u vidnom polju. Važno je napomenuti da je MAT subjektivna metoda. Posljednju jažicu u kojoj je vidljiva pozitivna reakcija, odnosno gdje je prisutno 50% aglutiniranih (slijepljenih) leptospira, označila sam kao krajnji rezultat pretraživanja, odnosno titar u kojem je uzorak pozitivan.

3.3 Izdvajanje DNA iz krvi ili seruma

Izdvajanje DNA iz dostupnog materijala krvi ili seruma radila sam pomoću komercijalnog kompleta za izdvajanje DNA iz krvi, *Qiagen Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača.

Pribor i oprema:

- mikropipete raspona zapremnine nastavka 1 - 10 µl, 10 - 100 µl i 100 - 1000 µl, te odgovarajući im plastični nastavci
- plastične epruvetice Eppendorf zapremnine 1,5 ml
- mikrocentrifuga Eppendorf, Mini Spin Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- termoblok sa rotacijom (TS - 100, Thermo Shaker, Bio San Riga, Latvija)
- laboratorijska tresilica

Reagensi:

- komercijalni komplet za izdvajanje DNA iz krvi i tkiva, *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Njemačka) koji uključuje:
  - plastične epruvetice sa silikagelskom membranom

- plastične epruvetice za sakupljanje otopine kojom se ispire DNA na silikagelskoj membrani
- enzim proteinaza K, koncentracije 10 mg/ml
- pufer za lizu stanica - AL pufer
- AW1 i AW2 pufere za ispiranje membrane
- AE pufer u kojem se otapa i pohranjuje DNA
- 96% -tnu otopinu etilnog alkohola

Postupak izdvajanja DNA iz krvi ili seruma:

U plastične epruvetice s čepom, zapremnine 1,5 ml, stavila sam po 200 µl uzorka - krvi ili seruma. Zatim sam dodala 20 µl proteinaze K, koncentracije 10mg/ml, te 200 µl pufera AL. Otopinu sam protresla na laboratorijskoj tresilici i kratko centrifugirala da se spuste kapljice s čepa epruvetice i spriječe moguće međusobne kontaminacije uzoraka. Nakon toga sam otopinu inkubirala u termobloku pri temperaturi 56º C, sa rotacijom od 500 okretaja u minuti u trajanju od 10 minuta. Otopini ohlađenoj na sobnu temperaturu nakon toga sam dodala 200 µl 96% otopine etilnog alkohola, te kratko protresla na tresilici. Sadržaj epruvetice sam pažljivo prebacila u epruveticu sa silikagelskom membranom i centrifugirala u mikrocentrifugi pri brzini 8 000 okretaja u minuti, u trajanju 1 minute. Epruveticu za sakupljanje sam zamijenila novom sakupljačkom epruveticom. U epruvetu sa silikagelskom membranom sam stavila 500 µl pufera za ispiranje AW1, te centrifugirala u mikrocentrifugi pri brzini 8 000 okretaja u minuti, u trajanju 1 minute. Donju sakupljačku epruveticu ponovno sam zamijenila novom. U gornju epruvetu sa membranom dodala sam pufer za ispiranje, AW2 pufer. Centrifugirala sam epruvete u mikrocentrifugi pri najvećoj brzini, 14 000 okretaja u minuti, u trajanju 3 minute. Donju sakupljačku epruvetu sam zamijenila plastičnom epruvetom Eppendorf s čepom, zapremnine 1,5 ml. U gornju epruvetu sa silikagelskom membranom sam dodala 200 µl AE pufera za otpuštanje DNA s membrane i njeno pohranjivanje. Nakon inkubacije otopine na sobnoj temperaturi od 1 minute, centrifugirala sam epruvetu u mikrocentrifugi pri brzini 8 000 okretaja u minuti,u trajanju 1 minute. DNA dobivenu u donjoj epruveti sam pohranila pri temperaturi - 20º C do daljnje uporabe.

3.4 Genotipizacija DRA i DRB lokusa

Lančanom reakcijom polimeraze (PCR, *eng.* polymerase chain reaction) umnažala sam odsječke DRA i DRB lokusa koji obuhvaćaju ciljnu regiju (egzon 2) DRA i DRB lokusa genskog sustava ELA skupine II u konja.

Početnice za ciljni dio DRA i DRB lokusa izradila sam prema sekvenci tih dvaju lokusa u konja koja se nalazi pohranjena u internetskoj bazi podataka Ensembl Genome Browser: http://www.ensembl.org/index.html. Početnice sam osmislila na temelju intronskih nukleotidnih sljedova koji se nalaze uzvodno i nizvodno u odnosu na egzon 2. Za kreiranje početnica koristila sam web aplikaciju za izradu početnica Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) koja je sastavni dio NCBI baze (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery).
Materijal:

- DNA izdvojena iz krvi ili seruma konja

Pribor i oprema:

- mikropipete raspona zapremnine nastavka 1 - 10 µl, 10 - 100 µl i 100 - 1000 µl, te odgovarajući im plastični nastavci
- plastične epruvetice Eppendorf, zapremnine 1,5 ml
- plastične epruvetice za PCR, zapremnine 0,2 ml
- PCR uređaj (BioRad, MJ Mini, Personal Thermal Cycler, BioRad, Richmond, SAD)
- PCR uređaj (GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)

Reagensi:

- komercijalni komplet za izvođenje PCR reakcije, *Platinum® Taq Polimerase* (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD) koji se sastoji od:

  - pufera sa uravnoteženim koncentracijama soli potrebnim za izvođenje PCR reakcije, 10x koncentriran

  - otopine magnezijevog klorida, $MgCl_2$, 50 mM

- otopine deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 10 mM

- enzima Platinum Taq polimeraze, 5 U/µl

- početnice (za svaki lokus uzvodna i nizvodna početnica) sintetizirane od tvrtke Bio Basic, Ontario, Kanada

- voda bez nukleaza

3.4.1 PCR reakcija za umnažanje ciljnog dijela DRA lokusa

Lančanom reakcijom polimeraze umnažala sam dio DRA lokusa, duljine 419 pb koji obuhvaća ciljnu regiju, egzon 2, duljine 243 pb.

Sljedovi konstruiranih početnica su:

DRAF: 5' - TGCCTCACATCCTGGGTTCT - 3 '

DRAR: 5'- CCCCAGGAGGGAAAGTTAGT - 3 '

Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom:

Za umnažanje ciljnog dijela DRA lokusa koristila sam mješavinu reagensa iz komercijalnog kompleta za izvođenje PCR reakcije, *Platinum® Taq Polimerase Kit*, te uzvodnu DRAF i nizvodnu DRAR početnicu.

Svaku početnicu sam najprije otopila u vodi bez nukleaza do koncentracije 100 µM. Zatim sam tu otopinu razrijedila do radne koncentracije 10 µM.

Za svaki uzorak pripremila sam mješavinu reagensa u ukupnom volumenu od 13,5 µl, a koja se sastojala od:

8,55 µl vode bez nukleaza

1,5 µl pufera za PCR reakciju (10x)

0,6 µl otopine $MgCl_2$ (50 mM)

0,3 µl dNTP smjese (10 mM)

0,45 µl otopine početnice DRAF (10µM)

0,45 µl otopine početnice DRAR (10µM)

0,15 µl Platinum Taq polimeraze (5 U/µl)

U epruvetu za svaki uzorak dodala sam 1,5 µl izdvojene DNA uzorka.

PCR reakciju sam provodila u PCR uređaju u optimiziranim uvjetima izvođenja reakcije (temperatura i vremensko trajanje svakog pojedinog koraka reakcije umnažanja):

95º C, 5 minuta (početna aktivacija enzima polimeraze)

30 ciklusa:

94º C, 30 sekundi (denaturacija DNA lanaca)

60º C, 90 sekundi (vezanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza)

72º C, 1 minuta (produljenje početnica)

72º C, 9 minuta (konačno produljenje umnoženih sljedova DNA)

Po završetku PCR reakcije, uzorke sam pohranjivala u hladnjak, pri temperaturi 4ºC, do daljnje analize PCR proizvoda.

3.4.2 PCR reakcija za umnažanje ciljnog dijela DRB lokusa

Lančanom reakcijom polimeraze umnažala sam dio DRB lokusa, duljine 543 pb koji obuhvaća ciljnu regiju, egzon 2, duljine 270 pb.

Sljedovi konstruiranih početnica su:

DRBF1: 5' - CCGTAGGGTGCTGGTAGTTC - 3 '

DRBR1: 5' - CACAGTCCTACACTCACGGG - 3 '

Postupak izvođenja PCR reakcije:

Za umnažanje ciljnog dijela DRB lokusa koristila sam mješavinu reagensa iz komercijalnog kompleta za izvođenje PCR reakcije, *Platinum® Taq Polimerase Kit*, te uzvodnu DRBF1 i nizvodnu DRB R1 početnicu. Svaku početnicu sam najprije otopila u vodi bez nukleaza do koncentracije 100 µM. Zatim sam tu otopinu razrijedila do radne koncentracije 10 µM. Za svaki uzorak pripremila sam mješavinu reagensa u ukupnom volumenu od 13,5 µl, a koja se sastojala od:

10,05 µl vode bez nukleaza

1,5 µl pufera za PCR reakciju (10x)

0,6 µl $MgCl_2$ (50 mM)

0,3 µl dNTP smjese (10 mM)

0,45 µl otopine početnice DRBF1 (10µM)

0,45 µl otopine početnice DRBR1 (10µM)

0,15 µl Platinum Taq polimeraze (5 U/µl)

U epruvetu za svaki uzorak dodala 1,5 µl izdvojene DNA uzorka.

PCR reakciju sam provodila u PCR uređaju u optimiziranim uvjetima izvođenja reakcije (temperatura i vremensko trajanje svakog pojedinog koraka reakcije umnažanja):

95º C , 5 minuta (početna aktivacija polimeraze)

30 ciklusa:

94º C, 30 sekundi (denaturacija)

60º C, 90 sekundi (spajanje početnica na ciljni komplementarni slijed baza)

72º C, 1 minuta (produljenje početnica)

72º C, 9 minuta (konačno produljenje umnoženih sljedova DNA).

Po završetku PCR reakcije uzorke sam pohranjivala u hladnjak, pri temperaturi od 4º C, do daljnje analize PCR proizvoda.

3.4.3 „Poluugniježdena“ PCR reakcija za umnažanje dijela DRB1 lokusa kod pojedinih uzorka

Za uzorke, koji u gore navedenoj PCR reakciji s početnicama DRBF1 i DRBR1 nisu davali PCR proizvod ili je pak rezultat sekvenciranja bio nečitljiv i nekvalitetan slijed baza (129 uzoraka), provedena je “poluugniježdena“ PCR reakcija. Ta se reakcija sastojala od umnažanja dijela DRB1 lokusa s tri početnice.

U prvoj PCR reakciji rabila sam početnice DRBF1 i DRBR2.

DRBR2 početnica konstruirana je također pomoću baze Ensambl Genome Browser, a nalazi se nizvodnije od DRBR1 početnice.

Slijed konstruirane početnice je:

DRBR2: 5' - CTGAAGGCACCCTCCTGGAC - 3 '

Početnicama DRBF1 i DRBR2 umnažala sam dio DRB1 lokusa duljine oko 751 pb. Nakon provjere prisutnosti i duljine umnoženih odsječaka DNA elektroforezom na 1% agaroznom gelu, radila sam drugu PCR reakciju s početnicama DRBF1 i DRBR1 kojom se umnaža dio DRB lokusa duljine 543 pb koji obuhvaća ciljnu regiju DRB1 lokusa, egzon 2, duljine 267 pb. Umjesto DNA izdvojene iz seruma / krvi rabila sam proizvod prve PCR reakcije.

Postupak provođenja „poluugniježdene“ PCR reakcije:

Za provođenje „poluugniježdene“ PCR reakcije koristila sam *QIAGEN Multiplex PCR komplet* (QIAGEN GmbH, Germany). Komplet se sastoji od tzv. „Master Mix“-a koji sadrži optimizirane koncentracije enzima HotStar Taq DNA polimeraze, $MgCl_2$, dNTP i PCR pufera koji ima uravnoteženu koncentraciju soli.

Za prvu PCR reakciju rabila sam:
5µl *Qiagen Master Mix*- a
po 0,4 µl otopine početnica DRBF1 i DRBR2 (početne koncentracije 5 µM)
3,2 µl vode bez nukleaza

1 µl izdvojene DNA uzorka
Ukupni volumen PCR smjese bio je 10 µl.

PCR reakciju sam provodila u plastičnim epruveticama zapremnine 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip, Applied Biosystems u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Optimizirani uvjeti izvođenja PCR bili su sljedeći:
95° C, 15 min (početna aktivacija polimeraze)

20 ciklusa:
95° C, 30 s (denaturacija)
60° C, 1 min uz spuštanje temperature za 0,5° C u svakom ciklusu (spajanje početnica)
72° C, 1 min (produljenje početnica)

25 ciklusa:
95° C, 30 s (denaturacija)
50° C, 1 min (spajanje početnica)
72° C, 1 min (produljenje početnica)
konačno produljenje umnoženih sljedova DNA 72° C, 10 min.

Za drugu PCR reakciju rabila sam:
20 µl *Qiagen Master Mix*-a
po 1,6 µl otopine početnica DRBF1 i DRBR1 (početne koncentracije 5 µM)
15,8 µl vode bez nukleaza
1 µl PCR proizvoda prve reakcije razrijeđenog vodom bez nukleaza u omjeru 1:10.
Ukupni volumen PCR otopine bio je 40 µl.
PCR reakciju sam provodila u plastičnim epruveticama od 0,2 ml, MicroAmp Reaction Tubes (8 Tubes/Strip) i MicroAmp Caps (8 Caps/Strip), Applied Biosystems, u uređaju GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).

Optimizirani uvjeti izvođenja PCR bili su sljedeći:
95° C, 15 minuta (početna aktivacija polimeraze)

20 ciklusa:
95° C, 30 sekundi (denaturacija)
60° C, 1 minuta uz spuštanje temperature za 0,5° C u svakom ciklusu (spajanje početnica)
72° C, 1 minuta (produljenje početnica)

25 ciklusa:
95° C, 30 sekundi (denaturacija)
50° C, 1 minuta (spajanje početnica)
72° C, 1 minuta (produljenje početnica)
konačno produljenje umnoženih sljedova DNA 72° C, 10 minuta.

Po završetku PCR reakcije uzorke sam pohranjivala u hladnjak, pri temperaturi od 4º C, do daljnje analize PCR proizvoda.

3.4.4 Provjera PCR proizvoda elektroforezom na agaroznom gelu

Duljinu i prisutnost umnoženih odsječaka DNA (PCR proizvoda) su provjerila sam elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

Materijal:

- proizvodi PCR reakcija

Pribor i oprema:

- sustav za provođenje elektroforeze koji uključuje:
- izvor električne struje, kadicu za provođenje elektroforeze i kalupe za agarozni gel s pripadajućim češljevima za jažice (Scie - Plast, Cambridge, England)
- parafinski film
- mikropipete i odgovarajući im nastavci
- staklena tikvica zapremnine 100 ml
- mikrovalna pećnica

- sustav za detekciju DNA pod ultraljubičastim svjetlom. Sustav se sastoji od komore s UV svjetlom i kamere s odgovarajućim filterima koja je povezana s računalnim softverom za obradu podataka i snimanje gelova (Gel Doc 200, BioRad, Richmond, SAD)

Reagensi:

- agaroza u prahu (Sigma Aldrich, St Louis, USA)
- Tris baza (Tris (hidroksimetil) aminometane) (Sigma Aldrich, St Louis, USA)
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) (Sigma Aldrich, St Louis, USA)
- ledena octena kiselina (Sigma Aldrich, St Louis, USA)
- boja za DNA u agaroznom gelu (GelStar, Lonza Rockland, USA)
- biljeg veličine DNA odsječaka, koji se sastoji od dvolančanih molekula DNA veličine po 100 pb (*100 bp DNA ladder*, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- otopina za nanošenje PCR proizvoda u gel koja sadrži brom fenol plavilo (Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, SAD)
- TAE (tris acetatni pufer) pufer, 1X koncentriran - tu sam radnu otopinu pufera dobila razrjeđivanjem 50X koncentrirane otopine TAE

<u>50X koncentrirana otopina TAE:</u>

242 g Tris baze

57,1 g ledene octene kiseline

100 ml 0,5 M EDTA

destilirana voda do 1 litre

pH otopine bio je 8,5

0,5 M otopina EDTA:

186,1 g EDTA

destilirana voda do 1 litre

pH otopine bio je 8,0

Postupak izvođenja elektroforeze u agaroznom gelu:

Gel sam napravila otapanjem 0,5 g agaroze u prahu u 50 ml TAE, 1X pufera. Otopinu agaroze zagrijala sam do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon otapanja agaroze i kratkotrajnog hlađenja gela dodala sam boju za DNA u tekuću agarozu. Da bi u gelu dobila jažice u još tekuću agarozu sam stavila plastični češljić. Nakon polimerizacije agaroze, uklonila sam češljić i stavila gel u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazio TAE pufer, 1X. Na parafilmu sam pomiješala 7 µl svakog PCR proizvoda sa 3 µl otopine brom fenol plavila. Mješavinu svakog uzorka mikropipetom sam prenijela u jažice gela. U jednu jažicu dodala sam biljeg veličine DNA odsječaka. Elektroforezu sam provodila u uređaju za elektroforezu, pri naponu 100 V, jakosti struje 80 mA, u trajanju 30 minuta. Nakon provedene elektroforeze prisutnost PCR proizvoda u gelu provjerila sam pod UV svjetlom u komori za snimanje gelova, te sam gel fotografirala pomoću kamere s filtrima za UV svjetlost koja je spojena s kompjuterskim programom koji omogućuje pohranu fotografije, u svrhu dokumentiranja uspješnosti PCR reakcije.

3.4.5 Pročišćavanje PCR proizvoda

Prije sekvenciranja PCR proizvod je potrebno pročistiti od neuporabljenih sastojaka PCR reakcije, da bi se dobio što "čišći„ slijed nukleotida umnoženog dijela DNA.

Pribor i oprema:

- mikrocentrifuga
- mikropipete sa odgovarajućim plastičnim nastavcima
- tresilica
- mikroepruvete Eppendorf, zapremnine 1,5 ml

Reagensi:

- komercijalni komplet za pročišćavanje PCR proizvoda, *PCR Purification Kit,* (QIAGEN GmbH, Germany) koji se sastoji od:
- indikatora za provjeru pH PCR proizvoda
- plastičnih kolona za pročišćavanje koju čini gornja epruveta sa silikagelskom membranom, te donja epruveta u koju se sakuplja otopina nakon centrifugiranja
- PB pufera koji služi za vezanje DNA na silikagelsku membranu
- PE pufera koji služi za ispiranje membrane
- EB pufera koji služi za otpuštanje DNA sa membrane

Postupak pročišćavanja PCR proizvoda:

pH vrijednost PCR proizvoda najprije sam provjerila pomoću indikatora koji sam dodala puferu za vezanje DNA na silikagelsku membranu. Na 500 µl PB pufera dodala sam 2 µl indikatora. Zatim sam dobivenu otopinu pomiješala s PCR proizvodom u omjeru 1:5. Žuta boja otopine pokazuje da je pH PCR proizvoda optimalan. Otopinu sam zatim pomoću mikropipete i odgovarajućeg nastavaka prenijela u gornju epruvetu kolonice za pročišćavanje. Nakon centrifugiranja na 14 000 okretaja u minuti u trajanju 1 minute, zamijenila sam donju epruveticu čistom. U gornju epruveticu sam dodala 750 µl pufera za ispiranje, PE. Nakon centrifugiranja na 14 000 okretaja u minuti u trajanju 1 minute, ponovno sam donju epruveticu zamijenila čistom epruveticom, zapremnine 1,5 ml. U gornju epruvetu sam dodala 50 µl pufera za otpuštanje DNA sa silikagelske membrane. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju 1 minute, te centrifugiranja na 14 000 okretaja u minuti u trajanju 1 minute, u donju epruvetu se otpustila DNA, odnosno pročišćeni PCR proizvod.

3.4.6 Sekvenciranje i analiza DNA sljedova

Nakon pročišćavanja, PCR proizvode sam poslala u servis za sekvenciranje, Macrogen, Nizozemska. Reakcija sekvenciranja u servisu izvodi se na 96 - kapilarnom genskom analizatoru „ABI3730xl DNA Analyzer“, Applied Biosystems. Iste početnice, s kojima su umnoženi dijelovi DNA u PCR reakciji, rabljene su i u sekvenciranju.

Kvalitetu dobivenih sljedova baza provjerila sam u programu Chromas Lite http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html. PCR proizvodi za koje nisu dobiveni čitljivi sljedovi izbačeni su iz daljnje analize. Za njih je ponovljena PCR reakcija, te je novi PCR proizvod pročišćen i ponovno poslan u servis za sekvenciranje.
Daljnju analizu DNA sljedova radila sam pomoću programa Bio Edit (Hall, 1999.) u koji je ugrađen program ClustalW (Thompson i sur., 1994.). Pomoću tih programa provela sam višestruko sravnjivanje DNA sljedova i identificirala postojeća polimorfna mjesta unutar slijeda svakog pojedinog uzorka.

3.4.7 Identifikacija alela programom SeqScape

Budući da je genom konja diploidan**,** svaka jedinka za svaki lokus ima dva alela (naslijeđena jedan od oca, drugi od majke). Ukoliko se radi o dva jednaka alela, radi se o homozigotnoj jedinci. Ukoliko jedinka ima dva različita alela, radi se o heterozigotnoj jedinci. Oba alela umnožavaju se u reakciji PCR. Da se radi o heterozigotnoj jedinci, vidljivo je tek u analizi slijeda baza dobivenog sekvenciranjem, gdje se prikazuju dva alela. Tada je potrebno odvojiti gametne faze, odnosno razdvojiti alel dobiven od oca, od onog dobivenog od majke. To nije moguće napraviti analizom slijeda baza iz elektroferograma. Odvajanje gametnih faza radila sam pomoću programa SeqScape, Applied Biosystems. Taj je program izrađen za analizu sljedova baza na osnovu postojanja referentne knjižnice alela. Zbog toga je prikladan za istraživanje gena onih vrsta (ili srodnih vrsta) za koje u genskim bazama postoje aleli, koji nam onda mogu poslužiti za izradu referentne knjižnice alela. Referentna knjižnica alela izradi se tako da se u program dodaju svi aleli koji su dosad pronađeni i objavljeni za ispitivani lokus istraživane vrste (najčešće aleli iz objavljenih radova i pohranjeni u bazama podataka). SeqScape program radi analizu elektroferograma heterozigota tako da ih najprije uspoređuje s heterozigotima iz referentne knjižnice. U slučaju kad program u knjižnici alela uspije pronaći kombinaciju alela koja odgovara ispitivanom elektroferogramu, rezultat analize je potpuno podudaranje s tom alelnom kombinacijom. U slučaju kad program ne uspijeva pronaći alelnu kombinaciju sa 100% - tnim podudaranjem, tada kao rezultat prikazuje alelnu kombinaciju s najmanjim brojem nepodudarnih nukleotidnih mjesta.
Referentnu knjižnicu alela napravila sam koristeći gensku bazu GenBank, odnosno NCBI (National Center for Biotechology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Za pretraživanje baze koristila sam program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) koji

pronalazi najsličnije sljedove baza ispitivanom slijedu. Za MHC lokuse konja postoji značajan broj prijavljenih alela, tako da sam bila u mogućnosti napraviti referentnu knjižnicu alela unutar programa SeqScape. Aleli MHC molekula skupine II često se podudaraju među različitim vrstama unutar istog roda, zbog čega sam za tvorbu referentne knjižnice uzela sve dostupne alele roda *Equus*. Referentne knjižnice konstruirala sam za lokuse DRA i DRB. DRA knjižnica početno je sadržavala 5 alela, a DRB knjižnica 21 alel.

Pojedine jedinke program SeqScape nije uspio identificirati, odnosno nije uspio u dostupnoj knjižnici pronaći niti jednu kombinaciju alela koja bi im odgovarala. U tim slučajevima ponovila bih PCR reakciju, poslala PCR proizvod na sekvenciranje i ponovno uvrstila dobiveni slijed baza u SeqScape program. Ukoliko i tada ne bih dobila podudarnu alelnu kombinaciju, pretpostavila bih da se radi o novim, dotad u baze podataka neuvrštenim alelima, te bih te uzorke podvrgla molekularnom kloniranju (kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora). Kloniranje mi je u tim slučajevima omogućilo razdvajanje gametnih faza.

3.4.8 Kloniranje odsječka DNA pomoću plazmidnog vektora

U PCR reakciji, enzim Taq polimeraza na kraj sintetiziranog nukleotidnog slijeda dodaje bazu adenin, čime je omogućeno sparivanje s bazom timin na otvorenom 3' kraju plazmida, što pak omogućuje ugradnju PCR proizvoda u plazmidni vektor. Odabir bakterijskih stanica koje su ugradile plazmid, radila sam na temelju njihove otpornosti na antibiotik ampicilin, budući da plazmidi nose gen za otpornost na taj antibiotik. Ukoliko bakterijska stanica ugradi plazmid, raste na bakterijskoj podlozi. Nadalje, odabir klonova bakterijskih stanica koje su ugradile plazmid s ugrađenim PCR proizvodom, radila sam na temelju tzv. plavo - bijele selekcije. PCR proizvod se ugrađuje u plazmidnu DNA unutar gena za enzim galaktozidazu. Supstrat za taj enzim je X - gal koji je dodan u bakterijsku podlogu. Preradom supstrata nastaje plavo obojenje kolonija bakterijskih stanica. Ukoliko je u plazmid ugrađen PCR proizvod, gen za galaktozidazu nije funkcionalan i kolonije bakterijskih kolonija ostaju bijele.

Pribor i oprema:

- centrifuga (brzine vrtnje do 6 000 okretaja u minuti)
- mikropipete sa odgovarajućim nastavcima

- laboratorijska tresilica
- mikroepruvete Eppendorf, zapremnine 1,5 ml
- oprema za elektroforezu u agaroznom gelu

Reagensi:

- komercijalni komplet *pGEM® - T Vector System II*, Promega

Komplet se sastoji od:

- plazmidnog vektora (pGEM® - T Vector) koji ima otvoreni 3' kraj i dodan timin
- pozitivne kontrole ligacijske reakcije ili kontrolnog inserta
- enzima T4 DNA ligaze
- pufera reakcije ligacije
- JM 109 kompetentnih stanica
- LB (lysogen broth) hranjiva podloga, čiji je sastav:
    - 10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g natrijevog klorida i 15 g agara

pH hranidbene podloge bio je 7,0.

Za podešavanje pH sam koristila natrijev hidroksid.

Postupak kloniranja odsječaka DNA u plazmidni vektor:

Ligacija

Prije reakcije ligacije izračunala sam optimalni omjer između PCR proizvoda koji će se ugrađivati u plazmid i vektora odnosno plazmida (tablica 5). Pogodan molarni omjer između PCR proizvoda (insert) i plazmida (vektor) je od 8 : 1, pa do 1 : 8. Približnu koncentraciju PCR proizvoda odredila sam pomoću elektroforeze. Uspoređivala sam intenzitet fluorescencije PCR proizvoda s intenzitetom fluorescencije PCR proizvoda poznate koncentracije. U reakciju ligacije sam stavila pozitivnu i negativnu kontrolu koja mi je poslužila za provjeru učinkovitosti same reakcije. Kao pozitivnu kontrolu koristila sam kontrolni insert iz komercijalnog kompleta. Kao negativna kontrola poslužila mi je reakcija u kojoj je samo DNA plazmidnog vektora. Ligacijsku smjesu inkubirala sam preko noći pri temperaturi 4º C.

Tablica 5. Tabelarni prikaz ligacijske reakcije.

Reagens iz komercijalnog paketa	Uzorak - proizvod	Pozitivna kontrola PCR reakcije	Negativna kontrola
ligacijski pufer	5 µl	5 µl	**5 µl**
vektor	1 µl	1 µl	**1 µl**
PCR proizvod	X* µl – ovisno o omjeru insert : vektor	-	-
kontrolni insert	-	2 µl	-
T4 DNA ligaza	1 µl	1 µl	**1 µl**
voda bez nukleaza	**do 10 µl**	**do 10 µl**	**do 10 µl**

Transformacija

Za rast bakterija koristila sam hranjivu podlogu LB (skraćenica od *eng*. lysogen broth). Sterilizirala sam hranjivu podlogu autoklaviranjem. Kada se otopina ohladila na 50° C dodala sam antibiotik ampicilin u koncentraciji 100 µg/ml. Podlogu sam zatim razdijelila u Petrijeve ploče. Ploče su pripremljene za svaki od PCR uzoraka, ali i za pozitivnu i negativnu kontrolu ligacije. Isto tako na jednoj ploči je određivana učinkovitost transformacije. Na pripremljenu krutu podlogu dodala sam 20 µl otopine IPTG (isopropil β-D-1-thiogalaktopiranozid) koncentracije 100 µM. IPTG je promotor gena za galaktozidazu. Na ploču sam dodala i 20 µl otopine X- gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) koncentracije 50 mg/ml. X-gal je supstrat galatozidaze. Epruvete s ligacijskom smjesom sam centrifugirala, te razdijelila po 2 µl ligacijske smjese u sterilne Eppendorf epruvete, zapremnine 1,5 ml. U jednu od epruveta stavila sam 0,1 ng nerazrezanog plazmida. Ta epruveta poslužila mi je za procjenu učinkovitosti transformacije. Kompetentne bakterijske stanice pohranila sam do uporabe pri temperaturi - 80° C. Neposredno prije uporabe, stanice sam stavila na led i ostavila ih tako 5 minuta. Promiješala sam ih laganim protresanjem. U epruvete sa ligacijskom smjesom stavila sam po 50 µl bakterijskih stanica. U epruvetu koja mi je služila za kontrolu učinkovitosti transformacije stavila sam 100 µl bakterijskih stanica. Sve epruvete ostavila sam na ledu 20 minuta. Nakon toga sam ih stavila u vodenu kupelj na temperaturu 42° C na 45 - 50 sekundi.

Nakon toga sam ih opet vratila na led na 2 minute. U svaku epruvetu sam dodala 950 µl tekućeg LB medija s ampicilinom. U epruvetu za učinkovitost transformacije dodala sam 900 µl istog medija. Epruvete sam zatim stavila pri temperaturu 37° C i uz lagano miješanje inkubirala smjesu 90 minuta. Nakon toga sam smjesu iz epruveta nasadila na pripremljene ploče s hranjivom LB podlogom, te ih inkubirala pri temperaturi od 37° C preko noći.

Umnažanje odabranih kolonija

S ploča s uzorcima odabrala sam deset bijelih kolonija i svaku od njih prenijela u epruvetu s 5 ml tekućeg LB medija s ampicilinom. Epruvete sam stavila na inkubaciju pri temperaturi od 37° C uz lagano miješanje, preko noći.

Izdvajanje plazmida iz bakterijskih stanica i pročišćavanje plazmida

Za izdvajanje plazmida iz bakterijskih stanica i njihovo pročišćavanje rabila sam isti komercijalni komplet, *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, Promega.
Komplet se sastoji od:

- *Cell Resuspension Solution* - otopine za resuspenziju stanica
- *Cell Lysis Solution* - otopine za lizu stanica
- *Alkaline Protease Solution* - otopine alkalne fosfataze
- *Neutralisation Solution* - otopine za neutralizaciju
- *Membrane Wash Solution* - otopine za ispiranje membrane
- *Nuclease-Free Water* - vode bez nukleaza

Najprije sam pomoću komercijalnog kompleta *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* izvodila postupak izdvajanja plazmida iz bakterijskih stanica. Centrifugirala sam kulturu bakterijskih stanica, odlila supernatant i ostavila talog u epruveti. Zatim sam dodala 250 µl otopine za resuspenziju stanica iz kita i dobro promiješala otopinu na tresilici. Sadržaj epruvete sam prenijela u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5 ml. Nakon toga sam dodala 250 µl otopine za lizu stanica. Sadržaj epruvete sam promiješala laganim prevrtanjem, te sam inkubirala otopinu 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam dodala 10 µl otopine alkalne fosfataze, te sadržaj epruvete promiješala laganim prevrtanjem i inkubirala 5 minuta

na sobnoj temperaturi. Zatim sam dodala 350 µl otopine za neutralizaciju, sadržaj epruvete sam promiješala laganim prevrtanjem. Nakon toga sam je centrifugirala 10 minuta na 6 000 okretaja u minuti i odlila nadtalog. Nadalje, nadtalog sam prebacila u epruveticu sa silikagelskom membranom i centrifugirala na 14 000 okretaja u minuti, u trajanju 1 minute. Otopinu iz sakupljačke epruvetice sam izbacila i vratila u nju epruveticu sa membranom. DNA plazmida se vezala na silikagelnu membranu. Tada sam u epruveticu sa membranom dodala 700 µl otopine za ispiranje membrane. Centrifugirala sam otopinu pri 14 000 okretaja u minuti, u trajanju 1 minute, te ponovno izbacila tekućinu iz sakupljačke epruvete. Nakon toga sam dodala 250 µl otopine za ispiranje membrane u epruveticu s membranom i centrifugirala pri 14 000 okretaja u minuti, u trajanju 2 minute. Epruveticu s membranom sam premjestila u novu sakupljačku epruvetu i dodala 50 µl vode bez nukleaza. Centrifugirala sam epruvetu pri 14 000 okretaja u minuti, u trajanju 1 minute. DNA plazmida u tom se koraku otpustila s membrane. Epruvetu sa pročišćenom DNA sam pohranila pri temperaturi 4° C.

3.4.9 Sekvenciranje proizvoda kloniranja

Proizvodi kloniranja poslani su u servis za sekvenciranje, Macrogen, Amsterdam i sekvencirani su s jednakim početnicama kao i prvotni PCR proizvodi. Servis je izvršio sekvenciranje u oba smjera, s uzvodnom i nizvodnom početnicom. Dobivene sljedove DNA analizirala sam u programu BioEdit (Hall, 1999.). Za analizu dobivenih sljedova koristila sam program SeqScape.

3.5 Genske analize

3.5.1 Utvrđivanje dvolokusnih haplotipova

DRA/DRB haplotipove prisutne u istraživanoj populaciji konja utvrdila sam kombiniranjem metode izlučivanja haplotipova korištenjem homozigotnih jedinki - sekvencijalni analitički proces (Kennedy i sur., 2002.) s rezultatima rekonstrukcijske analize pomoću ELB algoritma (Excoffier i sur., 2003.), koji se nalazi u programskom paketu Arlequin 3.11 (Excoffier i sur., 2005.).

3.5.2 Program MEGA 6.06

Računalni paket MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) rabi se za evolucijske i filogenijske analize nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova (Tamura i sur., 2013.).

Program MEGA 6.06 rabila sam za prevođenje nukleotidnih sljedova u aminokiselinske, određivanje broja varijabilnih mjesta, odabir najprikladnijeg nukleotidnog ili aminokiselinskog supstitucijskog modela, za dN/dS test, te za računanje nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među alelima pronađenim na određenom lokusu. Aminokiselinski ostaci potencijalno uključeni u vezanje stranog peptida, odnosno oni koji tvore vezna mjesta (PBR), određeni su na temelju analize ljudskih ortolognih DRA i DRB gena (Brown i sur., 1993.).

3.5.2.1 Odabir modela supstitucije

Najprikladniji nukleotidni ili aminokiselinski supstitucijski model za alele svakog istraživanog lokusa odredila sam pomoću programa MEGA 6.06 analizom *Model Selection.* U analizi je rabljena statistička metoda *Maximal Likelihood*. Modeli s najnižim Bayesovim informacijskim kriterijem smatraju se najprikladnijim supstitucijskim modelima.Odabrane modele koristila sam u analizama nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među alelima.

3.5.2.2 Evolucijske udaljenosti

Evolucijske udaljenosti među sljedovima određuju se prema broju nukleotidnih, odnosno aminokiselinskih supstitucija koje postoje među njima. Evolucijske udaljenosti rabe se za istraživanja molekularne evolucije, a također i za određivanje filogenijskih odnosa među jedinkama. Nukleotidne evolucijske udaljenosti određivala sam za alele koje sam na pojedinom lokusu pronašla u ispitivanom uzorku jedinki, a aminokiselinske udaljenosti za pripadajuće im aminokiselinske sljedove. Uz to, nukleotidne evolucijske udaljenosti određivala sam za alele upotrijebljene za izradu filogenijskih stabala.
Pomoću programa MEGA 6.06 određene su nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među DRA i DRB alelima koji su prisutni u pretraženom uzorku.

Kao najprikladniji model za računanje evolucijske udaljenosti nukleotidnih sljedova DRA alela odabran je Jukes - Cantor (JC) model, dok je za aminokislinske sljedove istog lokusa odabran Jones - Taylor - Thornton (JTT) model. U JC modelu udio nukleotidnih supstitucija je jednak za sve parove četiriju nukleotida A, T, C, i G. U JTT modelu uzimaju se u obzir višestruke supstitucije osnivane na modelu aminokiselinskih supstitucija (Tamura i sur., 2013.). Za alele DRB lokusa kao najprikladniji model nukleotidne supstitucije program je izabrao Tajima Nei distance (T92 model). T92 model u obzir uzima nejednak udio različitih nukleotida u sekvenci, a T92+G, ugrađuje i gama parametar (G) koji pretpostavlja da varijacije u učestalosti supstitucija među različitim nukleotidnim mjestima imaju oblik gama distribucije. Za najprikladniji model aminokiselinske supstitucije odabran je JTT model sa gama distribucijom (JTT+G) (tablica 9).

3.6 Dokazivanje djelovanja pozitivne selekcije na DRA i DRB lokusima

Postojanje pozitivne selekcije na DRA i DRB lokusima analizirala sam pomoću dva testa: dN/dS testom i CODEML testom u PAML programu.

3.6.1 dN/dS test

dN/dS test se temelji na omjeru nesinonimnih i sinonimnih nukleotidnih supstitucija između dva ili više nukleotidnih sljedova. Rezultati tog testa nam omogućuju da odredimo vrstu i razinu selekcije na određenom lokusu. Ukoliko je broj nesinonimnih i sinonimnih

nukleotidnih supstitucija podjednak radi se o neutralnoj selekciji. U slučaju kada je broj sinonimnih supstitucija veći od broja nesinonimnih supstitucija djeluje tzv. purificirajuća selekcija, a kad je broj nesinonimnih supstitucija veći od broja sinonimnih supstitucija lokus je vjerojatno pod utjecajem pozitivne selekcije. dN/dS test u programskom paketu MEGA utvrđuje vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze, odnosno pretpostavke da se radi o neutralnoj evoluciji (dN=dS), u korist alternativne hipoteze koja pretpostavlja djelovanje pozitivne selekcije (dN>dS). dN/dS test radila sam odvojeno na nukleotidnim sljedovima koji obuhvaćaju vezne i nevezne regije DRA i DRB lokusa.

Analizirala sam skupine alela koje sam pronašla na pojedinačnom lokusu. Koristila sam analizu *Codon - based Z - test of Selection*. Za analizu sam koristila Nei-Gojobori metodu, kojom se određuje broj sinonimnih i nesinonimnih supstitucija, te broj mogućih sinonimnih i nesinonimnih mjesta u slijedu (Nei i Gojobori 1986.). Varijanca je izračunata *Bootstrap* metodom sa 1 000 ponavljanja.

3.7 Filogenijska analiza

Filogenijsku analizu provela sam pojedinačno za alele DRA i DRB lokusa. Kod izrade filogenijskog stabala DRA alela u obzir sam uzela 23 dosad poznata DRA alela roda *Equus* koji su dostupni u genskoj banci (GenBank). Osim alela konja, u obzir sam uzela alele magarca *(E. asinus*), Burchellii zebre (*E. burchellii*), Grevy zebre (*E. grevy*), kulana ili azijskog magarca *(E. hemionus*), tibetanskog magarca (*E. kiang*) i planinske zebre (*E. zebra*). Kao vanjska grupa uzeti su DRA aleli svinje i goveda. Za izradu filogenijskog stabla DRB alela koristila sam ukupno 39 DRB alela utvrđenih u pripadnika roda *Equus*. Kao vanjska grupa uzet je ljudski HLA-DRA alel. Za alele oba lokusa stabla su konstruirana metodom *Maximum Likelihood*, na osnovu evolucijske nukleotidne udaljenosti dobivene K2+G modelom nukleotidne supstitucije. Statistička podržanost pojedinih grana određena je *Bootstrap* metodom sa 2 500 ponavljanja.

3.8 Program PAML

PAML (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) je paket računalnih programa za filogenijsku analizu nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova (Yang, 2007). Program CODEML koji služi za istraživanje djelovanja pozitivne selekcije na pojedinim kodonima jedan je od programa računalnog paketa PAML. Primjenom *Maximum Likelihood* metode program CODEML unutar nukleotidnog slijeda određuje omjer nesinonimnih i sinonimnih mutacija ($\omega=dN/dS$). Budući da pozitivna selekcija ne djeluje na čitavi nukleotidni slijed, CODEML procjenjuje vrijednosti ω za pojedinačne kodone. U slučaju kada je $\omega=1$ radi se o neutralnoj evoluciji. Ako na kodon djeluje usmjerena selekcija $\omega<1$, dok je u slučaju ravnotežne selekcije $\omega>1$.

Modeli supstitucije koje sadrži CODEML program su: M0 (One-ratio), M1a (Nearly Neutral), M2a (Positive Selection), M3 (Discrete model), M7 i M8. Model M0 pretpostavlja istu vrijednost ω za sve kodone. Model M1a predviđa postojanje dviju skupina kodona: onih koji se nalaze pod djelovanjem usmjerene selekcije ($0<\omega<1$) i neutralnih kodona ($\omega=1$).

Model M2a predviđa i treću skupinu kodona kod kojih je ω slobodni parametar i može imati vrijednost veću od 1. Model M3 podrazumijeva diskretnu distribuciju triju skupina kodona. Model M7 temelji se na β distribuciji, te podrazumijeva ω vrijednosti u rasponu od 0 do 1. Model M8 u odnosu na model M7 dopušta mogućnost $\omega>1$.

Modeli M0, M1a i M7 ne dopuštaju pozitivnu selekciju. Oni se koriste kao kao tzv. „nul“ modeli ili modeli za usporedbu s modelima M3, M2a i M8. Kako bi se utvrdilo da li određenoj skupini kodirajućih sekvenci bolje odgovaraju modeli koji uključuju parametre za utvrđivanje pozitivne selekcije, sekvence se analiziraju s obje skupine modela. Usporedba modela radi se *likelihood ratio* testom (LRT). LRT testom međusobno se uspoređuju modeli M0 i M3, M1a i M2a, te M7 i M8 na taj način da se udvostručena razlika log-*likelihood* vrijednosti uspoređivanih modela ($2(Lb-La)$) uspoređuje $\chi 2$ testom distribucije uz odgovarajući broj stupnjeva slobode.

3.9 Statističke analize

U svrhu preliminarnog istraživanja grupiranja, podatci za koje su bile poznate sve vrijednosti su podvrgnuti hijerarhijskom grupiranju i *fuzzy c - usrednjenoj rojnoj analizi* (FCMCA, eng. *fuzzy c - means cluster analysis*). U tu svrhu su korišteni odgovarajući paketi u okviru R programskog sučelja za statistiku (R Development Core Team, 2014.). FCMCA tehnika je odabrana zbog njezine temeljne karakteristike da svakom članu omogućava pripadanje većem broju grupa. FCMCA je načinjena s predviđenim brojem 3 do 10 grupa.

Višestruka analiza povezanosti (MCA, *eng*. Multiple correspondence analysis) je provedena sa svrhom uočavanja i kvantifikacije značajnosti međusobnih povezanosti među varijablama, te iznalaženja podatkovnih struktura. Korišteni su paketi za kategoričnu MCA u okviru R programskog sučelja. Tijekom MCA napravljena je analiza skupnih povezanosti s izlaznim parametrima vjerojatnosti statističke značajnosti povezanosti (p) i transformacije p vrijednosti u normalne kvantile tj. v-statistike (Ludovic i sur., 1997.).

4. REZULTATI

4.1 Osobitosti DRA i DRB lokusa u istraživanoj populaciji konja

Istraživana populacija konja sastojala se od ukupno 200 jedinki. Na temelju rezultata MAT pretrage, jedinke su podijeljene u dvije skupine:

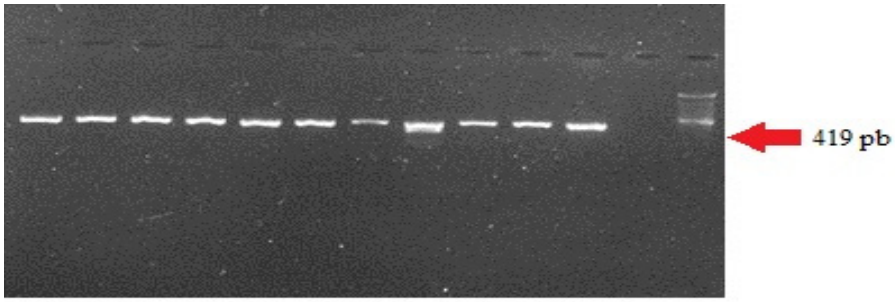
- pozitivna skupina - jedinke kod kojih je MAT metodom utvrđen titar protutijela na leptospirozu 1600 i veći (na različite serovare leptospira, Prilog 1)
- negativna skupina - jedinke kod kojih je MAT metodom utvrđen titar protutijela < 50.

Za obje skupine jedinki radila sam PCR reakciju u kojoj sam umnožavala dijelove DRA i DRB lokusa koji pripadaju genskoj regiji MHC skupine II.

Za svaki lokus analiziran je ciljni dio, egzon 2, odnosno dio genske regije MHC skupine II koji kodira za domenu receptora odgovornu za vezanje antigenskog peptida.

4.1.1 DRA lokus

DRA lokus uspješno sam umnožila PCR reakcijom kod svih 200 jedinki. PCR proizvod veličine 419 pb obuhvaćao je u cijelosti ciljnu regiju, egzon 2, veličine 243 pb (slika 17).



Slika 17. Elektroforeza u 1% - tnom agaroznom gelu. Dobiveni signali prikazuju PCR proizvode umnoženog dijela DRA lokusa veličine 419 pb.

U istraženom uzorku jedinki konja SeqScape programom identificirala sam ukupno pet različitih DRA alela. Svih pet alela već je utvrđeno u prethodnim istraživanjima i pohranjeno u bazi podataka Gen Bank (Albright-Fraser i sur., 1996., Brown i sur., 2004., Arbanasic i sur., 2009.).

Određivanjem učestalosti dobivenih alela DRA lokusa utvrdila sam da je Eqca-DRA*0101 najučestaliji alel u istraženoj populaciji konja. On je utvrđen u čak 68,25% istraženih jedinki. Alel sa najmanjom učestalosti je Eqca-DRA*0501. Utvrđen je u svega 5 jedinki. Četiri od pet alela pronađeni su i u homozigotnom i heterozigotnom obliku, dok je Eqca-DRA*0501 alel pronađen samo u heterozigotnom obliku (tablica 6).

Tablica 6. Učestalost alela DRA lokusa u istraživanoj populaciji konja izražena u %, apsolutan broj jedinki kod kojih je utvrđen pojedini alel, te broj jedinki kod kojih je alel pronađen u homozigotnom obliku.

Ime alela	Učestalost alela u istraživanoj populaciji %	Apsolutan broj alela u istraživanoj populaciji	Broj jedinki homozigota za istraživani alel
Eqca-DRA*0101	68,25	273	106
Eqca-DRA*0201	12,75	51	4
Eqca-DRA*0301	13,00	52	3
Eqca-DRA*0401	4,75	19	2
Eqca-DRA*0501	1,25	5	0

Na slici 18 prikazani su nukleotidni sljedovi svih pet alela DRA lokusa utvrđenih u istraživanoj populaciji konja. Ukupni broj promjenjivih nukleotidnih mjesta je osam, od kojih pet rezultira promjenom aminokiseline (slika 19).

```
                                                                  *
Eqca-DRA*0101 GATCACGTAA TCATCCAGGC TGAGTTCTAT CTGAAGCCTG GCGACTCAGG [50]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... .......... [50]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... .......... .......... [50]
Eqca-DRA*0501 .......... .......... .......... .......... .......... [50]
Eqca-DRA*0401 ........G. .......... .......... .....C.... .......... [50]

                  *
Eqca-DRA*0101 AGAGTTTATG TTTGACTTTG ATGGTGATGA GATTTTTCAC GTGGATATGG [100]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... .......... [100]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... .......... .......... [100]
Eqca-DRA*0501 .....A.... .......... .......... .......... .....C.... [100]
Eqca-DRA*0401 .......... .......... .......... .......... .......... [100]
```

```
                                                                  *     *
Eqca-DRA*0101 ACAAGAAGGA GACGGTCTGG CGGCTTGAAG AATTTGGACG TTTTGCCAGC [150]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... ....A..... [150]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... .........A .......... [150]
Eqca-DRA*0501 .......... .......... .......... .......... .......... [150]
Eqca-DRA*0401 .......... .......... .......... .......... .......... [150]

                                                               *
Eqca-DRA*0101 TTTGAGGCTC AGGGTGCTTT GGCCAATATA GCTGTGGACA AAGCCAACCT [200]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... .......... [200]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... ........G. .......... [200]
Eqca-DRA*0501 .......... .......... .......... .......... .......... [200]
Eqca-DRA*0401 .......... .......... .......... .......... ....T..... [200]


Eqca-DRA*0101 GGAGATCATG ATGAAGCGCT CCAACAACAC TCCAAACACC AAT [243]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... ... [243]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... .......... ... [243]
Eqca-DRA*0501 .......... .......... .......... .......... ... [243]
Eqca-DRA*0401 .......... .......... .......... .......... ... [243]
```

Slika 18. Nukleotidni sljedovi alela DRA lokusa. Nesinonimna promjenjiva nukleotidna mjesta označena su *****. Nukleotidi koji su identični onima u prvoj liniji označeni su točkom.

```
Eqca-DRA*0101 DHVIIQAEFY LKPGDSGEFM FDFDGDEIFH VDMDKKETVW RLEEFGRFAS [50]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... .......... .......T. [50]
Eqca-DRA*0301 .......... .......... .......... .......... ......H... [50]
Eqca-DRA*0501 .......... ........Y. .......... .......... .......... [50]
Eqca-DRA*0401 .......... .N...... .......... .......... .......... [50]

Eqca-DRA*0101 FEAQGALANI AVDKANLEIM MKRSNNTPNT N [81]
Eqca-DRA*0201 .......... .......... .......... . [81]
Eqca-DRA*0301 .......... ..E....... .......... . [81]
Eqca-DRA*0501 .......... .......... .......... . [81]
Eqca-DRA*0401 .......... .......... .......... . [81]
```

Slika 19. Aminokiselinski sljedovi za DRA alele prisutne u istraživanoj populaciji konja. Aminokiseline identične aminokiselinama alela u prvom redu prikazane su točkom. Plavom bojom označena je aminokiselina koja se nalazi izvan veznog mjesta receptora, a ružičastom aminokiselina unutar veznog mjesta.

Svaki od pet pronađenih alela na DRA lokusu translacijom daje jedinstveni aminokiselinski slijed (slika 19). Ukupno je promijenjeno pet aminokiselinskih ostataka (slika 19). Kod alela Eqca-DRA*0401 je u odnosu na alel Eqca-DRA*0101 na 12. aminokiselinskom mjestu došlo je promjene lizina (K) u asparagin (N) u odnosu na alel Eqca-DRA*0101. Kod alela Eqca-DRA*0501 na 19. mjestu došlo je do promjene fenilalanina (F) u tirozin (Y). Zatim, kod alela Eqca-DRA*0201 na 49. aminokiselinskom mjestu alanin (A) je promijenjen u treonin (T). Kod alela Eqca-DRA*0301 prisutne su dvije aminokiselinske promjene u odnosu na alel Eqca-DRA*0101. Promjena arginina (R) u histidin (H) dogodila se na 47. aminokiselinskom mjestu, a promjena asparaginske kiseline (D) u glutaminsku kiselinu (E) na 63. aminokiselinskom mjestu. Značajno je napomenuti da se promijenjeni aminokiselinski ostatak kod alela Eqca-DRA*0401 na 12. mjestu nalazi izvan veznog mjesta receptora, dok ostali promijenjeni aminokiselinski ostaci tvore dio receptora koji veže antigen. Aminokiseline koje tvore vezno mjesto određene su na temelju analize ljudskog ortolognog DRA gena.

4.1.2 DRB lokus

DRB lokus uspješno sam umnožila kod 187 jedinki. U PCR reakciji umnožavanja DRB lokusa sa početnicama DRBF1 i DRBR1, kod 71 jedinke uspjela sam dobiti PCR proizvod dugačak 543 pb upotrebljiv za daljnje analize. Za preostalih 129 jedinki radila sam „poluugniježdenu“ PCR reakciju u dva koraka. PCR proizvod duljine 543 pb kod 116 jedinki dobiven je s početnicama DRBF1 i DRBR1, pri čemu je kao kalup korišten proizvod dobiven prvom PCR reakcijom (početnice DRBF1 i DRBR2). Proizvodi obaju PCR reakcija obuhvatili su cijeli egzon 2 koji je kod DRB lokusa veličine 267 pb. U istraženom uzorku konja pomoću SeqScape programa identificirala sam ukupno 14 različitih DRB alela. Osam ih je već prije utvrđeno u konja i pohranjeno u genskoj banci (Gen Bank), dok za šest alela nisam pronašla podatke ni u genskoj banci, ni u literaturi, te smatram da su po prvi put identificirani u ovom istraživanju. Kod četiri jedinke SeqScape programom su identificirana dva DRB alela s delecijom od ukupno 15 nukleotida. Delecija u navedenim alelima pri translaciji nije utjecala na okvir čitanja.

U tablici 7 prikazani su DRB aleli pronađeni i identificirani u istraženoj populaciji konja pomoću SeqScape programa. Ista tablica prikazuje apsolutan broj pronađenih pojedinih alela, njegovu učestalost u populaciji i broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u

homozigotnom i heterozigotnom obliku. U istraženoj populaciji konja, najučestaliji alel je DRB*03 utvrđen u čak 129 jedinki. Taj se alel u homozigotnom obliku pojavljuje u čak 43 jedinke. Zatim slijedi DRB*04 alel utvrđen u ukupno 63 jedinke, od kojih je 15 homozigotno za dati alel. Alel DRB*06 utvrđen je u 41 jedinke, od kojih se u svega osam jedinki pojavljuje u homozigotnom obliku. DRB*01 alel utvrđen je kod 39 jedinki, a u homozigotnom obliku pojavljuje se u njih čak 19. Nakon njih slijede DRB*11 i DRB*02 aleli koji se pojavljuju s učestalošću 5 - 10%, te aleli DRB*12, DRB*14 i DRB*10 s učestalošću od 1 - 5%. Pet je DRB alela koji se u istraživanoj populaciji konja pojavljuju s učestalošću manjom od 1%. Masnim tiskom su u tablici 7 prikazani novoutvrđeni aleli u istraženoj populaciji konja. Svi novi aleli se u istraživanoj populaciji pojavljuju u homozigotnom obliku, osim alela DRB*08 koji se pojavljuje samo u jednoj jedinci i to u heterozigotnom obliku. Zanimljivo je istaknuti da je novi alel DRB*01 utvrđen kod čak 10,43% jedinki, a u čak njih 19 pojavljuje se u homozigotnom obliku. Ostalih pet novih alela prisutno je u populaciji s učestalošću nižom od 5%.

Tablica 7. DRB aleli utvrđeni u istraživanoj populaciji konja, njihova učestalost, te broj jedinki kod kojih je pojedini alel pronađen u homozigotnom stanju. Masnim tiskom označeni su po prvi puta identificirani DRB aleli.

Ime alela	Učestalost alela u istraživanoj populaciji konja (%)	Apsolutan broj alela u istraživanoj populaciji konja	Broj jedinki homozigota za utvrđeni alel	Broj jedinki heterozigota za utvrđeni alel
DRB*03	34,49	129	43	43
DRB*04	16,85	63	15	30
DRB*06	10,96	41	8	25
DRB*01	**10,43**	**39**	**19**	**1**
DRB*11	8,56	32	16	0
DRB*02	7,49	28	14	0
DRB*12	**4,28**	**16**	**8**	**0**
DRB*14	**2,94**	**11**	**5**	**1**
DRB*10	1,07	4	1	2
DRB*07	0,80	3	0	3
DRB*09	**0,80**	**3**	**1**	**1**
DRB*13	**0,53**	**2**	**1**	**0**
DRB*05	0,53	2	1	0
DRB*08	**0,27**	**1**	**0**	**1**

Na slici 20 prikazani su nukleotidni sljedovi svih 14 DRB alela utvrđenih u istraživanoj populaciji konja. Osjenčani aleli su novi aleli, identificirani po prvi puta u ovom istraživanju. Ukupan broj promjenjivih nukleotidnih mjesta među alelima je 78. Od toga su na 71

nukleotidnom mjestu zabilježene nesinonimne nukleotidne supstitucije, dok se na sedam nukleotidnih mjesta pojavljuju sinonimne mutacije.

```
                *              *** ***  ** **          *       *

Eqca-DRB*03    CAT TTC CTG GAG TAT AGT ACC TTC GAG TGT CAT TTC TCC  [ 39]
Eqca-DRB*02    ... ... ... ... GC. GTG .AG .A. ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*05    ... ... ... ... GC. GTG .AG ... ... ... .G. ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*06    ... ... ... ... ... ... ..G .C. ... ... ... ... .T.  [ 39]
Eqca-DRB*07    ... ... ... ... ... ... ..G .C. ... ... ... ... .T.  [ 39]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*11    ... ... ... ... GC. GTG .AG ... ... ... .G. ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*01    ... ... ... ... ATG .T. .AA CA. ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*08    ... ... ... ... ... ... ..G .C. ... ... ... ... .T.  [ 39]
Eqca-DRB*09    .G. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*12    ... ... ... ... ... CT. .AG ... ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*13    ... ... ... ... ATG GT. .AA CA. ... ... ... ... ...  [ 39]
Eqca-DRB*14    ... ... ... ... ... CT. .AG ... ... ... ... ... ...  [ 39]

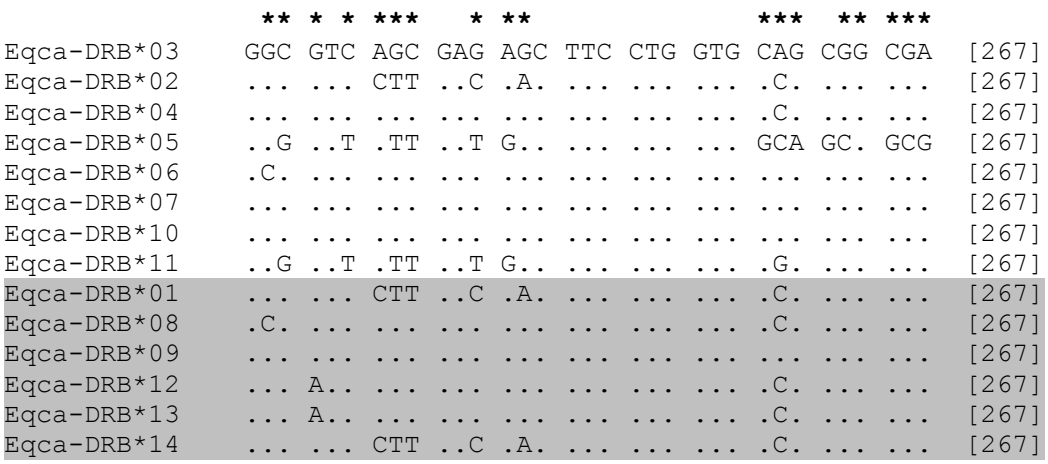

                        *            ** **      * *     **
Eqca-DRB*03    AAC GGG ACT CAG CGG GTG CTA TAC TTG CAC AGA CTC TTC  [ 78]
Eqca-DRB*02    ... ... ... G.. ... ... .G. ... C.. G.A ... ... ...  [ 78]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 78]
Eqca-DRB*05    ... ... ... G.. ..A ... .GG .T. C.. G.G ... .G. ...  [ 78]
Eqca-DRB*06    ... ..A ..A G.. ..A ... .GG ... ... G.. ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*07    ... ..A ..A G.. ..A ... .GG ... ... G.. ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 78]
Eqca-DRB*11    ... ... ... G.. ..A ... .G. .T. C.. G.G ... .G. ...  [ 78]
Eqca-DRB*01    ... ... ... ... ..A ... .GG .T. C.. G.. ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*08    ... ..A ..A G.. ..A ... .GG ... ... G.. ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [ 78]
Eqca-DRB*12    ... ... ... ... A.. ... .GG .T. C.. G.G ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*13    ... ... ... ... ..A ... .GG CT. C.. G.. ... TA. ...  [ 78]
Eqca-DRB*14    ... ... ... ... A.. ... .GG .T. C.. G.G ... TA. ...  [ 78]


               **          *       **   *                      *
Eqca-DRB*03    TAT AAC GGG AAG GAG TAC GTG CGC TTC GAC AGC GAC CTG  [117]
Eqca-DRB*02    ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [117]
Eqca-DRB*05    C.. ... ... G.. ... ... .C. ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*07    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [117]
Eqca-DRB*11    C.. ... ... G.. ... ... .C. ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*01    .C. ... ... G.. ... A.. ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*08    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [117]
Eqca-DRB*12    ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*13    .C. ... ... G.. ... A.. ... ... ... ... ... ... G..  [117]
Eqca-DRB*14    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... G..  [117]
```

```
                        **          *                          *  **
Eqca-DRB*03    GGC GAG TAC CGG GCG CTG ACC GAG CTG GGG CGG CCG GAC  [156]
Eqca-DRB*02    ..G ... .TT ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. AG.  [156]
Eqca-DRB*05    ..G ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. AG.  [156]
Eqca-DRB*07    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... --- --- ---  [156]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*11    ..G ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*01    ..G ... .T. ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*08    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... --- --- ---  [156]
Eqca-DRB*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*12    ..G ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*13    ..G ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... ...  [156]
Eqca-DRB*14    ..G ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... .A. AT.  [156]
```

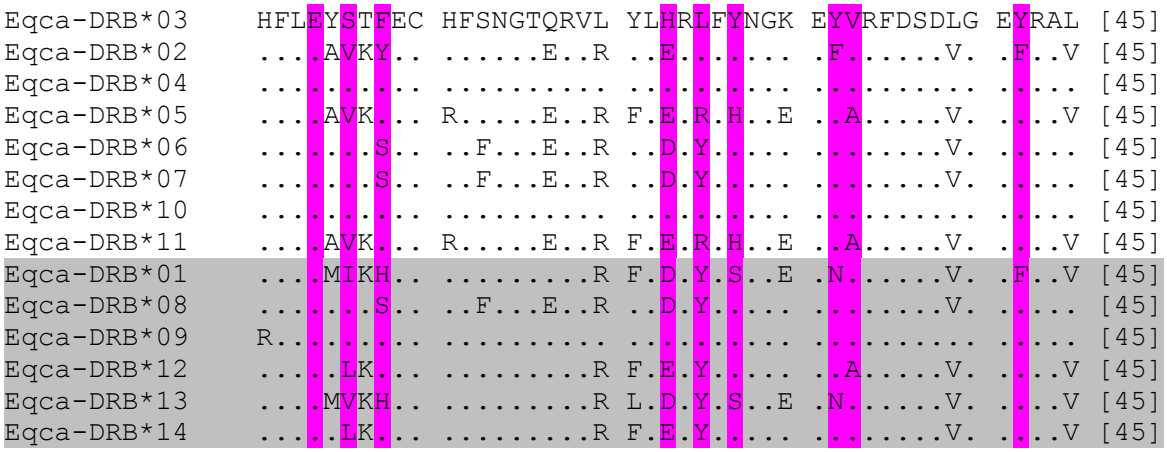
```
                    *  **          *      *       *         * * *
Eqca-DRB*03    GCC GAG TAC TGG AAC GGG CAG CAG GAC ATC CTG GAG CAG  [195]
Eqca-DRB*02    ... ... A.. ... ... ... ... A.. ... T.. ... ..T G.C  [195]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*05    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..T ..A  [195]
Eqca-DRB*06    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*07    --- --- ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*11    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..T G.A  [195]
Eqca-DRB*01    ... ... GC. ... ... ... ... A.. ... G.. ... ..T G.C  [195]
Eqca-DRB*08    --- --- ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*12    ... A.. ... ... ... ... ... A.. ... C.. ... ..T G.C  [195]
Eqca-DRB*13    ... ... ... ... ... ... ... A.. ... T.. ... ... ...  [195]
Eqca-DRB*14    ... ... A.. ... ... ... ... A.. ... C.. ... ..T G.C  [195]
```

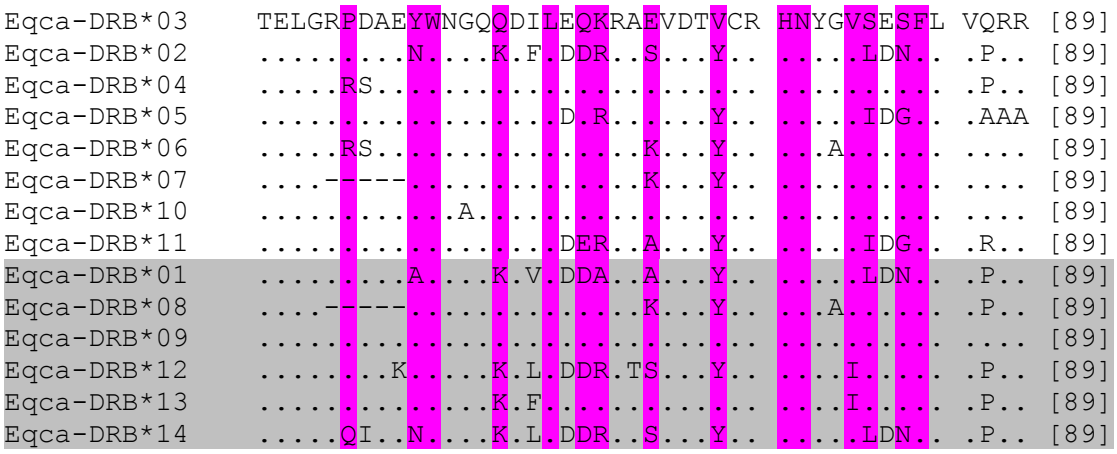
```
               **      * * **              ***
Eqca-DRB*03    AAG CGG GCG GAG GTG GAC ACG GTG TGC AGA CAC AAC TAC  [234]
Eqca-DRB*02    CG. ... ..C TC. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*04    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*05    CG. ... ..A ... ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*06    ... ... ..C A.. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*07    ... ... ..C A.. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*10    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*11    CG. ... ..A .C. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*01    GC. ... ..C .C. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*08    ... ... ..C A.. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*09    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*12    CG. ... A.C TC. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*13    ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...  [234]
Eqca-DRB*14    CG. ... ..C TC. ... ... ... TAC ... ... ... ... ...  [234]
```



Slika 20. Nukleotidni sljedovi alela DRB lokusa pronađenih u istraživanoj populaciji konja. Nesinonimna promjenjiva nukleotidna mjesta označena su *. Nukleotidi koji su identični onima u prvom alelu označeni su točkom. Crtica označava nukleotidna mjesta obuhvaćena delecijom. Novi, dosad neidentificirani aleli prikazani su na slici osjenčano.

Svaki od 14 DRB alela utvrđenih u istraživanoj populaciji konja translacijom daje jedinstven aminokiselinski slijed (slika 21). Aminokiseline koje čine vezno mjesto receptora označene su ružičastom bojom. Od ukupno 40 promjenjivih aminokiselinskih mjesta, čak njih 18 nalazi se u veznom mjestu receptora.





Slika 21. Aminokiselinski sljedovi za DBR alele prisutne u istraživanoj populaciji konja. Aminokiseline identične aminokiselinama alela u prvom redu prikazane su točkom. Ružičastom bojom označeni su aminokiselinski ostaci koji tvore vezna mjesta receptora (određeno na temelju analize ljudskog ortolognog DRB gena). Novi, dosad neidentificirani aleli prikazani su na slici osjenčano.

Novi alel DRB*01 najsličniji je alelu koji je u GenBank bazi zaveden pod pristupnim brojem AF170067, a u našoj populaciji nije pronađen. Razlikuju se međusobno u svega tri nukleotidna mjesta, na kojima su nesinonimne mutacije rezultirale promjenom aminokiselina na aminokiselinskim mjestima 5 i 87. Na mjestu 5 došlo je do promjene metionina (M) u glutaminsku kiselinu (E), dok je na mjestu 87 došlo do promjene prolina (P) u glutamat (Q). Kod novog alela DRB*08 i alela DRB*07 već pohranjenog u genskoj banci, zabilježena je delecija 15 nukleotida, koja rezultira translacijskim produktom kraćim za 5 aminokiselina. Deletirane su aminokiseline koje se nalaze na 50. do 55. aminokiselinskom mjestu. Novoutvrđeni alel DRB*08 i otprije poznati alel DRB*07 razlikuju se u svega dva nukleotidna mjesta, gdje su nesinonimne mutacije rezultirale promjenom aminokiselina. Tako je na 74. aminokiselinskom mjestu glicin (G) promijenjen u alanin (A), a na 82. aminokiselinskom mjestu mjestu došlo je do promjene glutamata (Q) u prolin (P). Sljedeći novi alel DRB*09 najsličniji je već otprije poznatom alelu DRB*03, od kojeg se razlikuje u samo jednom nukleotidnom mjestu, na kojem je nesinonimnom mutacijom došlo do promjene aminokiseline glicina (G) u alanin (A). Novi alel DRB*13 najsličniji je alelu HRSDRBA koji je identificiran u prethodnim istraživanjima i nalazi se u genskoj banci zaveden pod pristupnim brojem L76973.1, a u našoj populaciji nije pronađen. Razlikuje se od njega na čak 20 nukleotidnih mjesta što rezultira promjenom 14 aminokiselina od kojih je sedam u veznom mjestu receptora. DRB*12 je također novoutvrđeni alel koji je pronađen u

homozigotnom obliku u čak osam jedinki. On je najsličniji alelu HRSDRBG koji je već opisan u literaturi i pohranjen u banci gena zaveden pod pristupnim brojem L77079.1, no nije pronađen u ovom istraživanju. Aleli DRB*12 i HRSDRBG razlikuju se na 19 nukleotidnih mjesta što rezultira promjenom 13 aminokiselina od kojih je većina, njih čak osam, na veznim mjestima receptora. Sljedeći novoidentificirani alel DRB*14 također pokazuje najviše sličnosti sa HRSDRBG alelom. Međusobno se razlikuju u 26 nukleotidnih mjesta što uvjetuje 17 aminokiselinskih promjena od kojih se njih čak 12 nalazi na veznom mjestu receptora.

4.1.3 DRA/DRB haplotipovi

Dvolokusne DRA/DRB haplotipove utvrdila sam kod 187 jedinki. Za 13 jedinki nisam bila u mogućnosti odrediti pripadajuće dvolokusne haplotipove, budući da za te jedinke nisam uspjela dobiti kvalitetan PCR proizvod DRB lokusa. DRA/DRB haplotipove prisutne u istraživanoj populaciji konja utvrdila sam analizom rekonstrukcije haplotipova pomoću programa Arlequin 3.11. Program Arlequin 3.11 koristi se za procjenu gametnih faza u populaciji. U istraživanoj populaciji konja utvrđeno je postojanje ukupno 41 haplotipa (tablica 8). Ukupno 12 haplotipova utvrđeno je u homozigotnom obliku u istraživanoj populaciji konja i to njih čak osam u više od jedne jedinke. Najučestaliji haplotip u istraživanoj populaciji konja je Eqca-DRA*0101/DRB*03 haplotip s učestalosti 19,79%. On se pojavljuje u homozigotnom obliku u čak 19 jedinki. Nadalje po učestalosti slijedi haplotip Eqca-DRA*0101/DRB*01 (9,36%) koji se u homozigotnom obliku pojavljuje u 15 jedinki, te haplotip Eqca-DRA*0101/DRB*04 (8,82%) koji se u homozigotnom obliku pojavljuje u šest jedinki. Utvrđeno je 29 haplotipova koji se pojavljuju samo u heterozigotnom obliku, dok se njih 15 pojavljuje samo u po jednoj jedinci istraživane populacije konja (tablica 8).

Tablica 8. Dvolokusni DRA/DRB haplotipovi utvrđeni u istraživanoj populaciji konja, njihov apsolutan broj u populaciji, te broj jedinki kod kojih je utvrđen određeni homozigotni haplotip.

Dvolokusni DRA/DRB haplotip	Učestalost haplotipa u istraživanoj populaciji konja (%)	Apsolutan broj haplotipa u istraživanoj populaciji konja	Broj jedinki kod kojih je utvrđen homozigotni haplotip
Eqca-DRA*0301/ DRB*03	8,56	32	1
Eqca-DRA*0101/ DRB*04	8,82	33	6
Eqca-DRA*0101/ DRB*01	9,36	35	15
Eqca-DRA*0201/ DRB*04	5,88	22	1
Eqca-DRA*0101/ DRB*03	19,79	74	19
Eqca-DRA*0101/ DRB*02	5,88	22	9
Eqca-DRA*0101/ DRB*11	6,68	25	9
Eqca-DRA*0101/ DRB*06	7,22	27	4
Eqca-DRA*0401/ DRB*03	2,94	11	1
Eqca-DRA*0401/ DRB*02	0,53	2	1
Eqca-DRA*0101/ DRB*12	4,28	16	8
Eqca-DRA*0101/ DRB*14	2,41	9	3
Eqca-DRA*0101/ DRB*13	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*13	0,27	1	0
Eqca-DRA*0501/ DRB*01	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*03	3,21	12	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*06	1,34	5	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*04	0,80	3	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*01	0,53	2	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*02	0,53	2	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*02	0,53	2	0
Eqca-DRA*0501/ DRB*06	0,53	2	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*06	1,60	6	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*11	1,07	4	0
Eqca-DRA*0101/ DRB*10	0,53	2	0
Eqca-DRA*0401/ DRB*04	1,07	4	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*09	0,53	2	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*11	0,53	2	0
Eqca-DRA*0401/ DRB*06	0,27	1	0
Eqca-DRA*0101/ DRB*07	0,80	3	0
Eqca-DRA*0501/ DRB*11	0,27	1	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*01	0,27	1	0
Eqca-DRA*0101/ DRB*08	0,27	1	0
Eqca-DRA*0401/ DRB*14	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*14	0,27	1	0
Eqca-DRA*0301/ DRB*10	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*10	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*09	0,27	1	0
Eqca-DRA*0201/ DRB*05	0,27	1	0
Eqca-DRA*0101/ DRB*05	0,27	1	0
Eqca-DRA*0501/ DRB*04	0,27	1	0

4.2 Evolucijske udaljenosti među alelima DRA i DRB lokusa

Pomoću programa MEGA verzije 6.06 određene su nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti među DRA i DRB alelima koji su prisutni u istraženom uzorku. Evolucijsku udaljenost program određuje prema modelima koje odabire kao najprikladnije za pojedini skup alela. Kao najprikladniji model za računanje evolucijske udaljenosti nukleotidnih sljedova DRA alela odabran je Jukes-Cantor (JC) model, dok je za aminokislinske sljedove istog lokusa odabran Jones-Taylor-Thornton (JTT) model. Za alele DRB lokusa kao najprikladniji model nukleotidne supstitucije program je izabrao Tajima Nei distance (T92 model). Za najprikladniji model aminokiselinske supstitucije odabran je JTT model sa gama distribucijom (JTT+G) (tablica 9).

Aminokiselinske udaljenosti na oba lokusa veće su od njihovih nukleotidnih udaljenosti. Utvrđeno je, također, da su nukleotidna i aminokiselinska evolucijska udaljenost veće za DRB lokus, nego za DRA lokus (tablica 9).

Tablica 9. Srednje vrijednosti evolucijskih nukleotidnih i aminokiselinskih udaljenosti među alelima za pojedini lokus (d), standardne pogreške (S.E.), modeli supstitucije korišteni za određivanje nukleotidne i aminokiselinske evolucijske udaljenosti, broj varijabilnih nukleotidnih mjesta i broj aminokiselinskih sljedova za pojedini lokus.

LOKUS (broj analiziranih sekvenci - duljina analizirane sekvence)	Broj jedinstvenih aminokiseli-nskih sljedova	Broj varijabilnih nukleotidnih mjesta	Nukleotidna udaljenost			Aminokiselinska udaljenost		
			Model nukleoti-dne supstituci-je	d	S.E.	Model amino-kiselinske supstitucije	d	S.E.
DRA (5-243 pb)	5	8	JC	0,013	0,005	JTT	0.025	0,011
DRB (14-267 pb)	14	67	T92+G	0,199	0,037	JTT+G	0,323	0,064

JC - Jukes-Cantor model nukleotidne supstitucije, JTT - Jones-Taylor-Thornton model aminokiselinske supstitucije, G – parametar gama distribucije, T92 – Tamura 3 parametar model nukleotidne supstitucije, d - srednja vrijednost evolucijskih nukleotidnih i aminokiselinskih udaljenosti

4.3 Selekcija na DRA i DRB lokusima

Postojanje pozitivne selekcije na lokusima analizirala sam pomoću dva testa: dN/dS testom i PAML programom. Obje analize temelje se na omjeru sinonimnih i nesinonimnih mutacija među nukleotidnim sljedovima. Ako se sinonimne i nesinonimne supstitucije događaju se podjednakom učestalošću, riječ je o neutralnoj evoluciji. U slučaju pozitivne selekcije, nesinonimne supstitucije prevladavaju nad sinonimnim supstitucijama.

4.3.1 dN/dS test

Omjer sinonimnih i nesinonimnih mutacija odredila sam pomoću programa MEGA 6.06. Na temelju dobivenih dN i dS vrijednosti za pet utvrđenih alela DRA lokusa i 14 alela DRB lokusa, utvrdila sam da je unutar vezne regije (PBR regije) na oba lokusa broj nesinonimnih mutacija statistički značajno veći od broja sinonimnih mutacija (tablica 9). Vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze (neutralna evolucija) u korist alternativne hipoteze (dN>dS, pozitivna selekcija) za veznu regiju na oba lokusa statistički je značajna (P<0,05) što ukazuje na djelovanje pozitivne selekcije na veznim regijama DRA i DRB lokusa (tablica 10). Na dijelovima nukleotidnih sljedova koji se nalaze izvan vezne regije nije pronađena naznaka djelovanja pozitivne selekcije.

Tablica 10. Sinonimne (dS) i nesinonimne (dN) udaljenosti među alelima DRA i DRB lokusa, njihovi omjeri (dN/dS) i P vrijednosti testiranja neutralne evolucije u korist pozitivne selekcije.

Lokus	Broj alela	Položaj analiziranih kodona	dN	dS	dN/dS	P
DRA	5	Unutar vezne regije	0,032	0,000	∞	0,014*
		Izvan vezne regije	0,003	0,034	0,100	1,000
DRB	14	Unutar vezne regije	0,303	0,145	2,089	0,011*
		Izvan vezne regije	0,072	0,122	0,590	1,000

* statistički značajna P vrijednost (P<0.05)

4.3.2 PAML analiza

Osobitost programa PAML u odnosu na MEGA program je što PAML analizira pojedinačne kodone i među njima određuje one koji su pod djelovanjem pozitivne selekcije, dok MEGA program analizira cijeli nukleotidni slijed pojedinog alela. Razinu vjerojatnosti djelovanja pozitivne selekcije na određene kodone PAML procjenjuje pomoću dvije metode: NEB (Naïve empirical Bayesian) i BEB (Bayes empirical Bayesian).

Zbog relativno malog broja utvrđenih alela u istraženoj populaciji konja, za DRA alele (5 alela) nisam provodila PAML analizu.

PAML analiza nudi tri para modela. U svakom paru modela jedan model uključuje djelovanje pozitivne selekcije (M2a, M3 i M8 modeli), dok ga drugi ne uključuje (M1a, M0 i M7 modeli). Analizom nukleotidnih sljedova 14 DRB alela pronađenih u ovom istraživanju, utvrdila sam da iste bolje opisuju modeli koji uključuju parametre za pozitivnu selekciju (M2a, M3 i M8) od jednostavnijih modela koji im služe za usporedbu. Rezultati su prikazani u tablici 11 i kao takvi ukazuju na postojanje pozitivne selekcije na DRB lokusu.

Tablica 11. Usporedba modela M2a, M3 i M8 sa modelima M1a, M0 i M7 za alele DRB lokusa.

Lokus	Uspoređivani modeli	Stupnjevi slobode	2Δl	P
DRB	M2a vs M1a	2	24	0,0001*
	M3 vs M0	4	64	0,0001*
	M8 vs M7	2	24	0,0001*

2Δl = 2(Lb-La), La i Lb su log-likelihood vrijednosti za svaki uspoređeni model

* statistički značajna p-vrijednost (P<0.05)

U tablici 12 prikazani su kodoni na kojima je prema modelima M2a i M8 uz pomoć NEB i BEB statističke analize utvrđeno djelovanje pozitivne selekcije. BEB metoda je vjerodostojnija jer u obzir uzima pogrešku kod uzorkovanja. Brojevi kodona odgovaraju translatiranom egzonu 2. Prvi kodon egzona kodira prvu aminokiselinu. U istoj tablici su također navedene i razine statističke vjerojatnosti da je pojedini kodon pod djelovanjem pozitivne selekcije.

Tablica 12. Kodoni DRB lokusa kod kojih je utvrđeno djelovanje pozitivne selekcije NEB i BEB analizom.

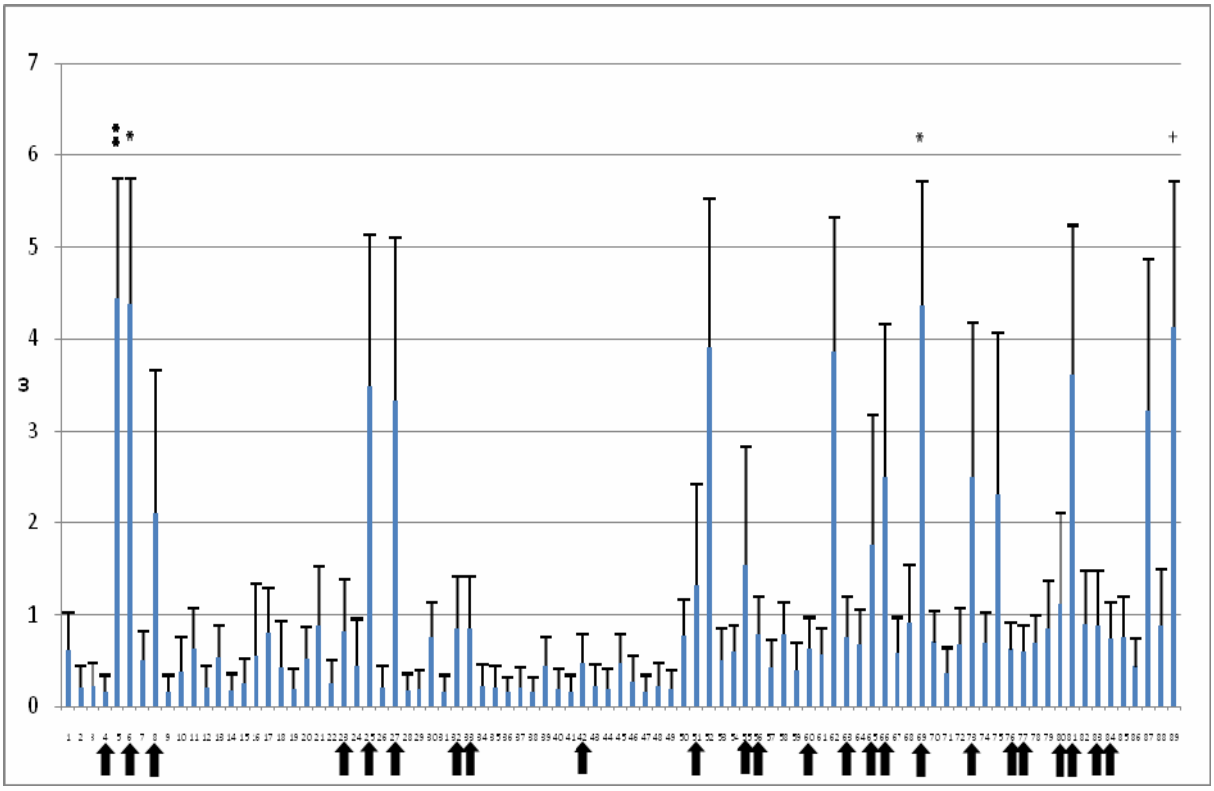
Lokus	Model	Kodoni pod pozitivnom selekcijom - NEB analiza	Kodoni pod pozitivnom selekcijom - BEB analiza
DRB	M2a	5**, 6*, 69*	5**, 6*, 69*
	M8	5**, 6*, 69*	5**, 6*, 69*, 89^{+}

** kodon odabran s vjerovjatnošću >99%

* kodoni odabrani s vjerojatnošću >95%

$^{+}$ kodon je odabran s vjerojatnošću >90%

Svi korišteni modeli NEB i BEB analizom pronalaze iste kodone DRB lokusa koji su pod pozitivnom selekcijom. To su kodoni 5, 6 i 69 (tablica 12). Različit je jedino rezultat BEB analize kod modela 8, koji uz navedene kodone pronalazi statističku podržanost od 93% za djelovanje pozitivne selekcije na kodonu 89. Značajno je da se kodoni 6 i 69 za koje je utvrđeno da se nalaze pod pozitivnom selekcijom, nalaze unutar vezne regije određene prema ljudskom orolognom DRB genu, dok je kodon 5 smješten između dva vezna mjesta (slika 22).



Slika 22. Srednje ω vrijednosti za pojedine kodone lokusa DRB dobivene modelom M8. Posteriorne vjerojatnosti izračunate su Bayes empirical Bayes (BEB) metodom u programu CODEML koji je dio programskog paketa PAML.

**označava mjesto za koje je vjerojatnost pozitivne selekcije veća od 99%, * označava mjesta za koje je vjerojatnost pozitivne selekcije veća od 95%, + označava mjesto za koje je vjerojatnost pozitivne selekcije 93%. Brojevi kodona odgovaraju aminokiselinskom slijedu dobivenom translacijom egzona 2. ↑ označava pretpostavljena aminokiselinska vezna mjesta prema ortolognom ljudskom ß lancu

4.4 Filogenijska analiza

Filogenijsku analizu alela DRA i DRB lokusa napravila sam u programu MEGA metodom *Maximum likelihood* (ML), koja se temelji na modelu nukleotidne supstitucuje odabranom prema Bayesovom informacijskom kriteriju. Za izradu filogenijskih stabala pojedinog lokusa rabila sam alele pronađene u ovom istraživanju, te alele koji su već ranije utvrđeni u rodu *Equus* i dostupni u bazi podataka GenBank. Vanjska grupa za analizu DRB lokusa bili su ljudski MHC aleli, dok su MHC aleli goveda i svinje bili izabrani kao vanjske grupe za izradu DRA stabla.

4.4.1 Filogenijsko stablo DRA alela

Na slici 23 prikazano je filogenijsko stablo za DRA alele. Za izradu stabla upotrijebila sam nukleotidne sljedove 5 alela DRA lokusa pronađenih u istraživanoj populaciji konja. Njima sam dodala nukleotidne sljedove već otprije poznatih 18 DRA alela koji pripadaju različitim vrstama roda *Equus:* magarac (*E. asinus*), Burchellii zebra (*E. burchelli*), Grevy zebra (*E. grevy),* kulan ili azijski magarac (*E. hemionus*), tibetanski magarac (*E. kiang*), planinska zebra (*E. zebra*). Duljina pojedine grane odgovara broju supstitucija po nukleotidnom mjestu. Aleli pronađeni u ovom istraživanju označeni su masnim tiskom. Iz filogenijskog stabla vidljivo je da se tri alela iz istraživane populacije konja, Eqca-DRA*0301, Eqca-DRA*0201 i Eqca-DRA*0101 smještaju u izdvojenu grupu alela. Alel Eqca-DRA*0501 smjestio se u grupu alela u kojoj se nalaze još aleli nađeni u magarca (Eqas-DRA*0301) i Bruchelii zebre (Eqbu-DRA*0101). Alel iz istraživane populacije konja Eqca-DRA*0401 posebno je zanimljiv jer je kod njega zabilježen trans-specijski polimorfizam, odnosno isti taj alel pronađen je još u Bruchelii zebre. Trans-specijski polimorfizam utvrđen je i kod alela Eqas- DRA*0401 kojeg nalazimo u magaraca i zebre, zatim kod alela Eqbu- DRA*0501 kojeg nalazimo u Bruchelli zebre i planinske zebre, alela Eqbu-DRA*0401 koji se može pojaviti kod Bruchelli zebre i tibetanskog magarca. Posebno su zanimljivi aleli koji se pojavljuju u čak tri ili više vrsta iz porodice Equidae: Eqas-DRA*0101 koji je utvrđen u magarca, planinske zebre i Bruchelii zebre, zatim alel Eqbu-DRA*0101 utvrđen kod Bruchelii zebre, Grevyi zebre i planinske zebre, te alel Eqas-DRA*0201 kojeg nalazimo kod magarca, tibetanskog magarca, azijskog magarca i Bruchelli zebre. Iz stabla je također vidljivo da je podržanost grana relativno slaba, ali grana koja odvaja alele roda *Equus* od DRA alela svinja i goveda dobro je statistički podržana.

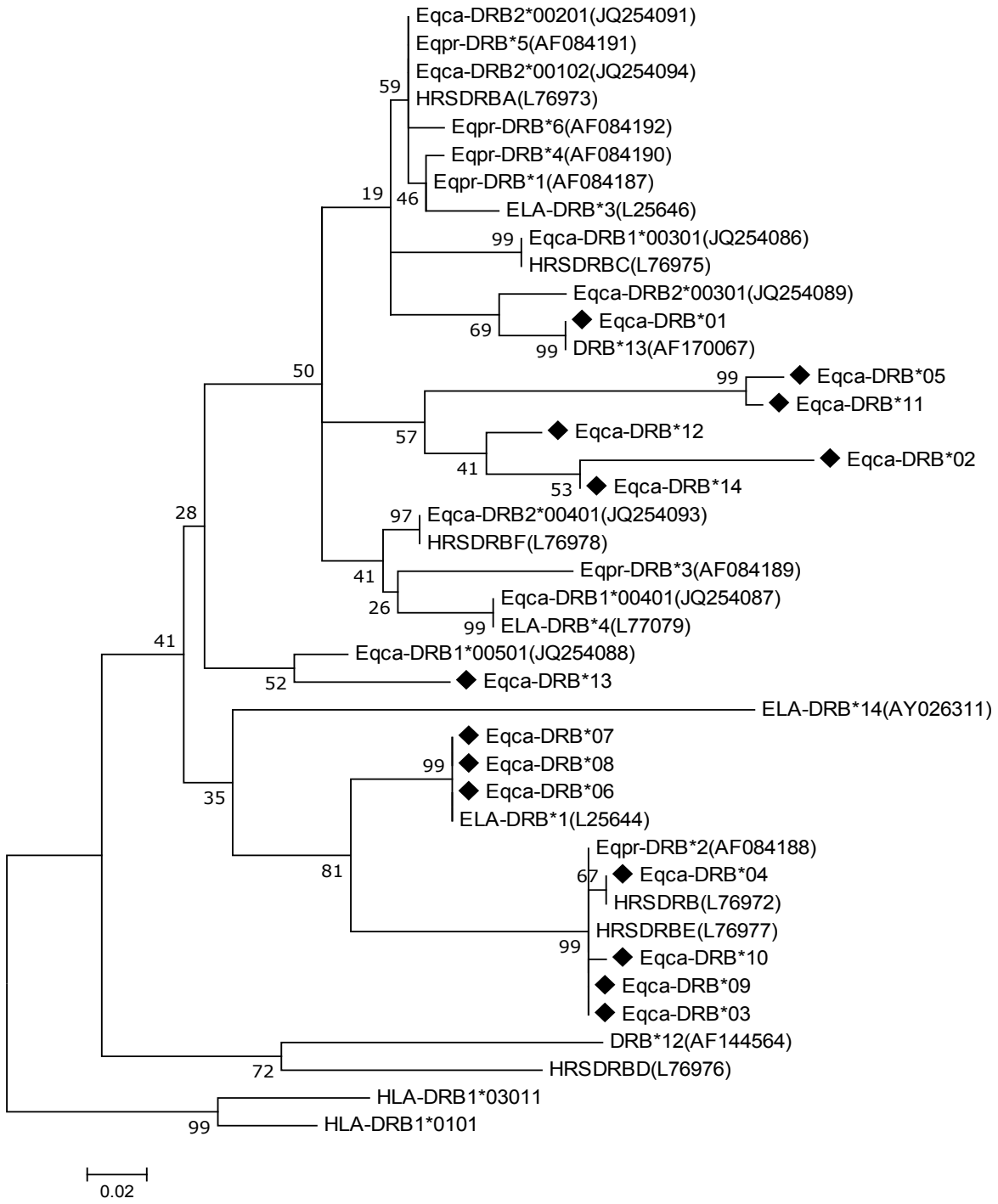


Slika 23. Filogenijsko stablo Eqca-DRA alela dobiveno ML metodom temeljenoj na Kimura 2- parametar modelu s gama distribucijom. Svinjski i goveđi DRA aleli korišteni su kao vanjska grupa. Bootstrap vrijednosti dobivene s 2 500 ponavljanja prikazane su pokraj pripadajućih čvorova, a odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano. Konjski DRA aleli pronađeni u istraživanom uzorku masno su otisnuti. Ostali aleli preuzeti su iz genske banke. Slova u zagradama označavaju vrstu kod koje je pronađen pojedini alel: A- magarac (*E. asinus*), B- Burchellii zebra *(E. burchelli*), G- Grevy zebra *(E. grevy*), H- kulan ili azijski polumagarac (*E. hemionus*), K- tibetanski magarac (*E. kiang*), Z- planinska zebra (*E. zebra*). Duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

4.4.2 Filogenijsko stablo DRB alela

Na slici 24 prikazano je filogenijsko stablo za DRB alele. Za izradu stabla upotrijebila sam nukleotidne sljedove 14 alela DRB lokusa pronađenih u istraživanoj populaciji konja. Od 14 alela, njih šest je identificirano po prvi put u ovom istraživanju, dok ih je osam već otprije poznato. Za izradu stabla, tim sam alelima dodala 25 DRB alela već otprije poznatih za rod *Equus*. Ukupno 19 od tih alela pronađeno je kod domaćeg konja (*Equus caballus*), dok je šest alela pronađeno u divljeg konja *(Equus ferus przewalski).* Aleli pronađeni u ovom istraživanju označeni su crnim rombom. Iz filogenijskog stabla može se uočiti da su se aleli pronađeni u istraživanoj populaciji konja rasporedili duž stabla, što potvrđuje njihovu međusobnu raznolikost. Novoutvrđeni aleli u istraživanoj populaciji konja smještaju se u grupu s alelima s kojima su međusobno najsličniji, za što je statistička podržanost relativno visoka. Tako se npr. novi alel Eqca-DRB*07 smjestio u grupu s alelom Eqca-DRB*08 kojemu je najsličniji, odnosno razlikuje se od njega u svega dvije aminokiseline.

Duljina grana odgovara broju supstitucija po mjestu. Grana koja odvaja alele roda *Equus* od ljudskih alela DRB alela dobro je statistički podržana.



Slika 24. Filogenijsko stablo Eqca-DRB alela dobiveno ML metodom temeljenoj na Kimura 2-parametar modelu s gama distribucijom. Ljudski aleli HLA-DRB korišteni su kao vanjska grupa. Bootstrap vrijednosti dobivene s 2 500 ponavljanja prikazane su pokraj pripadajućih čvorova, a odgovaraju postotku dobivenih stabala kod kojih su aleli grupirani kako je prikazano. Aleli pronađeni u istraživanom uzorku označeni su crnim rombom. Ostali aleli preuzeti su iz genske banke, a u zagradi je prikazan pridruženi broj pojedinog alela. Duljina grana odgovara broju supstitucija po nukleotidnom mjestu.

4.5 **Statističke analize podataka**

4.5.1 Analize grupiranja jedinki

Podatci o jedinkama koji su korišteni u statističkim analizama prikazani su u Prilogu 1.

Da bi prvotno istražila postoje li grupiranja među podatcima o istraženim jedinkama, napravila sam analize grupiranja podataka. Važno je napomenuti da su u analizama korišteni samo podatci za jedinke za koje su bile poznate sve vrijednosti, što znači spol, mjesto prebivalište životinje, rezultat serološke pretrage MAT na prisutnost specifičnih protutijela na leptospire, te pripadajući aleli DRA i DRB lokusa, odnosno DRA/DRB haplotipovi. Takvih jedinki bilo je 187.

Najprije sam napravila hijerarhijsku analizu grupiranja. U toj se analizi određuje broj razreda u koje se jedinke svrstavaju s obzirom na strukturu podataka. Hijerarhijsko grupiranje jedinki radila sam na osnovu DRA/DRB haplotipa jedinke, serovara na koji jedinka pokazuje serološki odgovor i kombinacije tih dvaju grupiranja, dakle prema haplotipu i serovaru. Iz rezultata te analize uočila sam da se svaka jedinka smješta u svoj razred (grupu) bez iznalaženja nekog pravila grupiranja. Hijerarhijsko grupiranje dostatno je i smisleno u slučaju jednoznačnih podataka s jasnim razlikama među jedinkama. No, obilježja naših jedinki nisu bila jednoznačna, već složena, te nam zato takvo grupiranje podataka nije dalo dovoljno dobre rezultate grupiranja jedinki. Zbog toga sam podatke analizirala *fuzzy clustering* analizom, (FCMCA, *eng*. fuzzy c-means cluster analysis). Kod te analize prvobitno sami predviđamo broj razreda, pri čemu je maksimalan broj razreda jednak broju kategorija ili rasponu podataka. Isto tako svaka jedinka može biti član svih razreda ili grupa. Na osnovu te analize kvantitativno sam odredila u kolikom udjelu pojedina jedinka pripada kojem razredu.

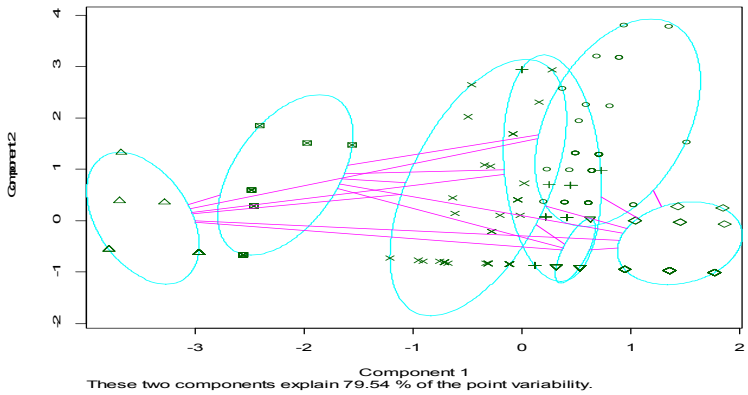
4.5.1.1 *Fuzzy clustering* grupiranje jedinki prema serološkom odgovoru jedinki na leptospirozu

Podaci su obrađeni binarno, odnosno umjesto vrijednosti titra upotrjebljene su vrijednosti 1 za pozitivan nalaz i 0 za negativan. Jedinke su se na osnovu seroloških podataka, odnosno serološkog odgovora kojeg su pokazivale prema rezultatima MAT metode grupirale u 12 razreda.

Razred 1: jedinke s negativnim serološkim nalazima na leptospirozu (ukupno 100 životinja)
Razred 2: jedinke pozitivne samo na serovare Canicola i Ictherohaemorrhagiae (ukupno 11 jedinki)
Razred 3: jedinke pozitivne samo na serovar Grippotyphosa (8 jedinki)
Razred 4: jedinke pozitivne samo na serovar Bratislava (7 jedinki)
Razred 5: jedinke pozitivne samo na serovare Grippotyphosa, Bratislava i Pomona (5 jedinki)
Razred 6: jedinke pozitivne samo na serovare Bratislava, Canicola i Ictherohaemorrhagiae (4 jedinke)
Razred 7: jedinke pozitivne samo na serovare Grippotyphosa i Bratislava (3 jedinke)
Razred 8: jedinke pozitivne samo na serovare Grippotyphosa, Sejroe, Pomona i Ictherohaemorrhagiae (1 jedinka)
Razred 9: Jedinke pozitivne samo na serovare Bratislava, Pomona, Canicola i Ictherohaemorrhagiae (1 jedinka)
Razred 10: jedinke pozitivne samo na serovare Sejroe, Bratislava, Australis, Icterohamorrhagiae i Saxkoebing (2 jedinke)
Analizom je utvrđeno da se ukupno 42 jedinke s karakterističnim serološkim odgovorima grupiraju u devet karakterističnih razreda. U zaseban su razred svrstane jedinke kod kojih je na osnovu rezultata MAT serološke pretrage ustanovljeno da nema specifičnih protutijela na leptospire (100 jedinki). 58 jedinki kod kojih je ustanovljen serološki odgovor na leptospire, međusobno se nedovoljno razlikuju da bi mogle formirati zasebne razlikovne razrede.

4.5.1.2 *Fuzzy clustering* analiza grupiranja jedinki prema DRA/DRB haplotipovima

Na osnovu *fuzzy clustering* analize grupiranja jedinki prema pripadajućim DRA/DRB haplotipovima jedinke su svrstane u ukupno sedam razreda. Grupirale su se prema pripadnosti jedinki određenom DRA/DRB haplotipu (slika 25). Rezultati *fuzzy clustering* analize prikazani su grafički sa sedam razreda i točnošću ovih dviju komponenti od 79,54%.

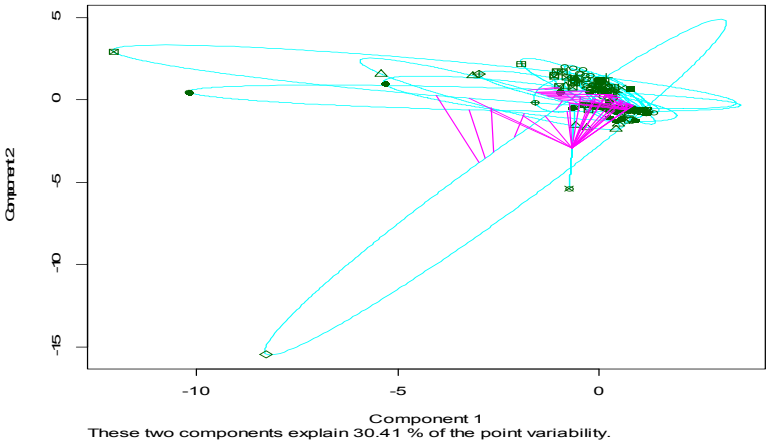


Slika 25. Grafički prikaz rezultata dobivenih *fuzzy clustering* analizom grupiranja prema haplotipovima u sedam razreda.

Fuzzy clustering provedene analize podataka poslužile su mi za bolje uočavanje strukture podataka i postojećih grupiranja jedinki na osnovu podataka korištenih u pojedinoj analizi.

4.5.1.3 *Fuzzy clustering* analiza grupiranja jedinki prema serovaru leptospira i DRA/DRB haplotipu

Nakon toga sam provela *fuzzy clustering* analizu grupiranja jedinki prema serovaru leptospira na kojeg pojedina jedinka pokazuje serološki odgovor i DRA/DRB haplotipu jedinke. Ta je analiza pokazala da se jedinke grupiraju u najviše 11 razreda, te da svega nekoliko jedinki pokazuje izuzetnu međusobnu sličnost, odnosno veliku različitost od ostalih jedinki (slika 26).

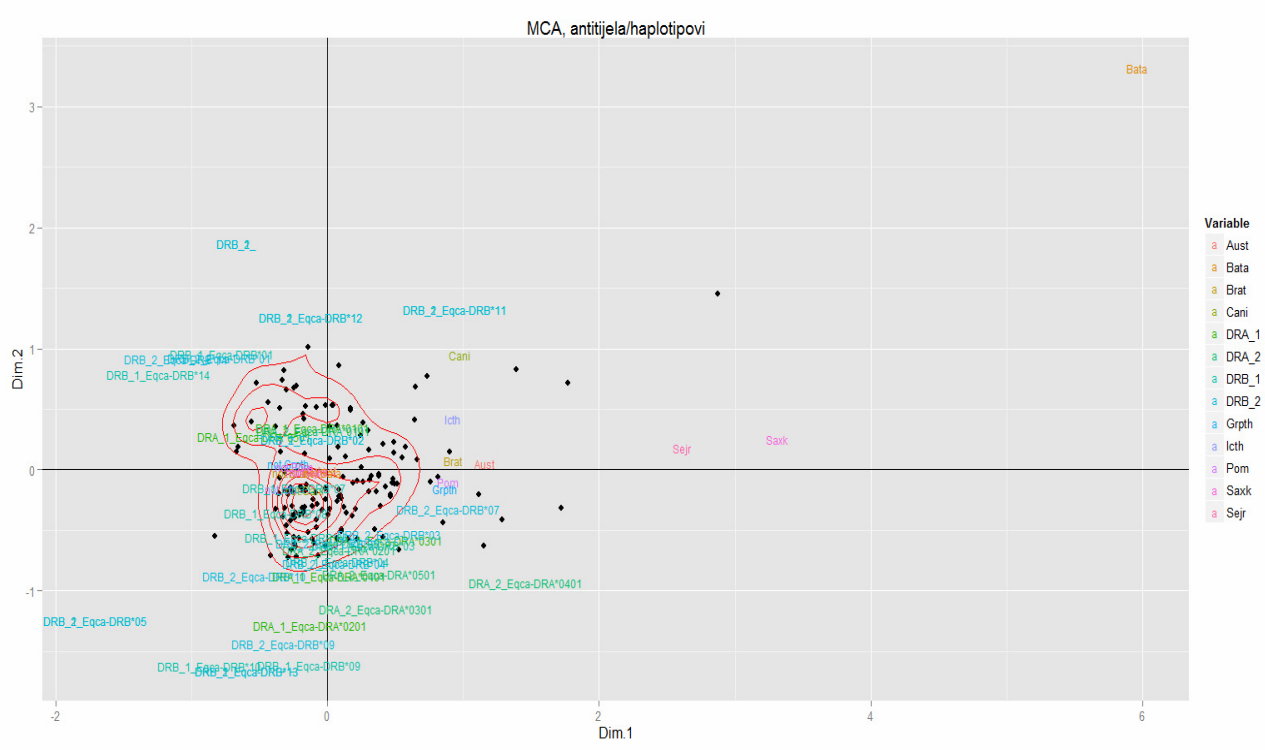


Slika 26. Rezultat *fuzzy clustering* analize grupiranja podataka na osnovu serovara leptospira i pripadajućeg DRA/DRB haplotipa.

4.5.2 Višestruka analiza povezanosti

Zatim je provedena višestruka analiza povezanosti (MCA, eng. *multiple correspondence analysis*) sa svrhom uočavanja i kvantifikacije značajnosti međusobnih povezivanja među varijablama, te iznalaženja podatkovnih struktura. Rezultati MCA analize pokazali su da nema značajnijih grupiranja jedinki prema haplotipovima i serovarima (slika 27). U analizi su izdvojene dvije osi koje čine korelirane varijable (u našem slučaju serovar i haplotip). Što je neka varijabla bliže tim osima, to ona više doprinosi varijaciji koju pojedina os objašnjava. Isto tako što je dalje od sjecišta dviju osi ta je varijabla specifičnija ili "svojstvena". Iz rezultata MCA analize može se tako uočiti da su npr. jedinke koje pokazuju serološki odgovor na serovare Bataviae, Sejroe i Saxkoebing specifične u odnosu na druge jedinke. Isto tako

vidljivo je da su jedinke pozitivne na Sejroe i Saxkoebing puno značajnije za objašnjenje varijance od jedinki pozitivnih na Bataviae, jer se nalaze neposredno uz prvu os.



Slika 27. Rezultati višestruke analize povezanosti MCA.

Kroz MCA analizu napravljena je analiza skupnih povezanosti s izlaznim parametrima vjerojatnosti statističke značajnosti povezanosti (p) i transformacije p vrijednosti u normalne kvantile tj. v - statistike. Tako sam dobila podatke o združenosti ili povezanosti pojedinih kategorija i varijabli u istraženoj populaciji jedinki (Prilog 2). Ukoliko p iznosi manje od 0,05 povezanost je statistički značajna. Pozitivna vrijednost v ukazuje na činjenicu da je neka varijabla zastupljenija od ostalih varijabli kod promatrane kategorije, dok negativna vrijednost v govori o većoj zastupljenosti neke varijable kod nekih drugih kategorija. Važno je naglasiti da ovi rezultati sadrže statistički značajne povezanosti između pojedinih varijabli i kategorija samo u našem uzorku analiziranih jedinki (200 jedinki). Ta se statistička značajnost, dakle, odnosi samo na ispitivani uzorak jedinki, te nije općenito pravilo koje bi se moglo primijeniti na cjelokupnu populaciju konja. Kroz analizu sam istražila međusobnu združenost varijabli

koje su uključivale pasminu, mjesto prebivališta jedinki, utvrđene alele DRA i DRB lokusa pojedine jedinke, odnosno homozigotni ili heterozigotni oblik alela lokusa, zatim status serološkog odgovora na infekciju leptospirama kod jedinki (pozitivan ili negativan) i serovar leptospira na koji je pojedina jedinka pokazala serološki odgovor u vidu titra protutijela specifičnih za leptospire.

Prema podacima iz Priloga 1 odredila sam učestalost pojedine pasmine u istraženoj populaciji konja. Najzastupljenija pasmina u istraživanju je hrvatski toplokrvnjak (43%), nakon njega slijedi hrvatski hladnokrvnjak (35,5%), zatim hrvatski posavac (10,5%), lipicanac (3,5%), poni (2,5%), araber (2%), shetlandski poni (1,5%), hrvatski sportski konj (1%), te križana pasmina (0,5%).

Što se tiče povezanosti kategorije - pasmine jedinke i varijable - alela DRB lokusa, statistički značajna povezanost uočena je kod pasmine araber i alela Eqca-DRB*10. Taj je alel pronađen samo u jedinkama navedene pasmine. On se pojavljuje u 75% jedinki pasmine araber u istraženoj populaciji konja. Alel Eqca-DRB*04 pronađen je u 51,28% jedinki pasmine hrvatskog hladnokrvnjaka. Nadalje, alel Eqca-DRB*12 je zastupljeniji kod pasmine hrvatski posavac nego kod ostalih pasmina, u 50% hrvatskih posavaca utvrđen je taj alel. Alel Eqca-DRB*09 statistički je najzastupljeniji DRB alel u pasmine hrvatski sportski konj. Alel Eqca-DRB*13 pojavljuje se u istraženom uzorku samo u pasmini lipicanac. Statistički značajna združenost alela DRA lokusa i pasmine araber, uočena je za alel Eqca-DRA*0301. Utvrđena je i statistički značajna povezanost alela Eqca-DRA*0101 i pasmine hrvatski posavac u kojoj se taj alel pojavljuje u čak 95,24% jedinki. Kod 50% jedinki u kojih smo utvrdili postojanje alela Eqca-DRA*0501 sa statistički značajnom podržanošću taj je alel povezan sa pasminom poni. Alel Eqca-DRB*11 se u istraženoj populaciji konja pojavljuje u 81,25% jedinki pasmine hrvatski toplokrvnjak i to u homozigotnom obliku.

Što se tiče pak združenosti kategorije pasmine i homozigotnog ili heterozigotnog oblika alela pojedinog lokusa, statistički značajna povezanost uočena je između homozigotnih alela DRB lokusa i pasmine hrvatski posavac, gdje je u čak 95,24% jedinki navedene pasmine utvrđen je homozigotni oblik alela. Statistički značajna povezanost utvrđena je i između kategorije lipicanac i varijable heterozigotnog DRB lokusa, naime 71,43% jedinki pasmine lipicanac je heterozigotno za DRB lokus.

Utvrđeno je da je čak 60,49% istraženih mužjaka serološki negativno na leptospirozu, dok je samo 32% ženki serološki negativno (odnosno 68% jedinki ženskog spola je pozitivno).

Statistički značajna povezanost utvrđena je za kategoriju ženskog spola i pojedinih serovara leptospira na koje su jedinke pokazale serološki odgovor. Tako je primjerice u 72% istraženih jedinki pozitivnih na serovar Grippotyphosa, te 75,93% jedinki pozitivnih na serovar Icterohaemorrhagiae i 68% jedinki pozitivnih na Pomonu utvrđena statistički značajna povezanost sa ženskim spolom jedinki. Statistički značajna povezanost alela Eqca-DRA*0301 i muškog spola utvrđena je kod 59,52% jedinki, dok je kod 73,95% ženki utvrđena statistički značajna povezanost s alelom Eqca-DRA*0101.

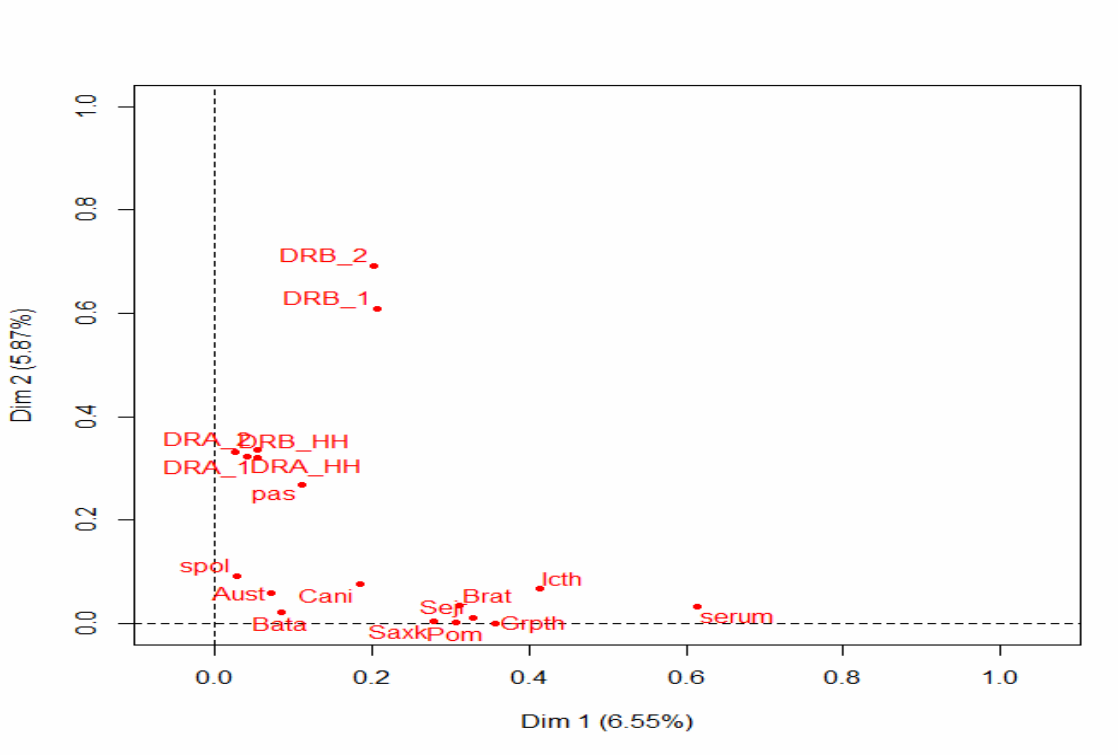
Na osnovu dobivenih statistički značajnih združivanja između kategorije serovara na koji jedinka pokazuje serološki odgovor i određenog alela DRA lokusa, utvrđena je povezanost serovara Sejroe i Saxkoebing s alelom Eqca-DRA*0401 (40% jedinki s tim alelom je pozitivno na oba serovara). Također je utvrđena statistički značajna povezanost serovara Pomona i alela Eqca-DRB*03 (60,47% jedinki pozitivnih na serovar Pomona imaju alel Eqca-DRB*03). Utvrđena je i značajna statistička povezanost jedinki pozitivnih na serovar Australis i pasmine hrvatski posavac. Naime, 54,55% jedinki pozitivnih na serovar Australis su pasmine hrvatski posavac. 52,38% jedinki iste pasmine pozitivne su na serovar Bratislava.

Prema statistički značajnoj povezanosti dobivenoj između kategorije - DRB homozigotnog haplotipa i varijable - alela DRB lokusa, utvrđeno je da su sve jedinke istražene populacije s pronađenim alelima Eqca-DRB*02, Eqca-DRB*05, Eqca-DRB*11, Eqca-DRB*12 i Eqca-DRB*13 homozigotne za DRB lokus. Unutar iste kategorije jedinki utvrđena je značajna statistička podržanost povezanosti s varijablom koja određuje pozitivan serološki odgovor na serovar Australis.

Kategorija DRB heterozigotnog haplotipa statistički je značajno povezana s određenim alelima DRA i DRB lokusa. 87,5% jedinki kod kojih je utvrđen alel Eqca-DRA*0201 su heterozigoti za DRB lokus. 80% jedinki koji imaju alel Eqca-DRA*0301 također su DRB heterozigotnog haplotipa.

Na osnovu statistički značajnih povezanosti između kategorije - DRA homozigotnog haplotipa i varijabli koje predstavljaju alele DRA lokusa, utvrđeno je da 92,17% homozigota za DRA lokus ima alel Eqca-DRA*0101. Isto tako pronađene su statistički značajno podržane poveznice između te kategorije i pojedinih alela DRB lokusa. 80% jedinki koje imaju alel Eqca-DRB*01 homozigotno je za DRA lokus. Sve jedinke koji imaju alel Eqca-DRB*12 pokazuju statistički značajnu povezanost s alelom DRA lokusa, Eqca-DRA*0101, u homozigotnom obliku.

MCA analizom podataka određene su dvije dimenzijske osi. Varijable koje označavaju serovar čine jednu, a varijable vezane za haplotipove čine drugu dimenziju (slika 28). Varijable pasmina i spol nemaju nikakvo značenje u objašnjavanju varijanci uzoraka. Obje dimenzije objašnjavaju vrlo mali dio ukupne varijance (12,42%). Zbog toga je gotovo nemoguće temeljem ovih rezultata potvrditi općenito pravilo. Međutim, s druge strane, podatci pokazuju naznake pravila, što je vidljivo iz „razdvajanja“ varijabli u dvije dimenzije, koje predstavljaju haplotipove i serovar.



Slika 28. Rezultati MCA analize za dvije dimenzijske osi koju čine varijabla serovara i varijabla haplotipa.

5. RASPRAVA

Utvrđena visoka seroprevalencija leptospiroze u konja u Republici Hrvatskoj potakla me na istraživanje raznolikosti glavnoga sustava tkivne podudarnosti skupine II koji ima izrazito važnu ulogu u prepoznavanju patogenih mikroorganizama i pokretanju imunosnog odgovora domaćina. Dio tog genskog sustava kodira stanične površinske glikoproteine, odnosno receptore, koji vežu antigene i prikazuju ih pomoćničkim T-limfocitima. Građa receptora stoga izravno utječe na pokretanje i učinkovitost imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odnosno njegovu prijemljivost ili otpornost na infekcije (Kindt i sur., 2007.).

Glavna postavka ove disertacije bila je utvrditi polimorfizam gena MHC skupine II u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda *Leptospira,* te ga usporediti s polimorfizmom istih gena u neinficiranih konja. Predmet istraživanja bili su DRA i DRB lokusi MHC skupine II.

U istraživanoj populaciji konja pronašla sam ukupno pet alela DRA lokusa. Svi su aleli već opisani u rodu *Equus* u ranijim istraživanjima. Budući da je u istraživanje uključen velik broj jedinki (200), te su uz autohtone pasmine analizirane i ostale pasmine konja zastupljene u Republici Hrvatskoj, poput hrvatskog toplokrvnjaka, lipicanca, ponija, te jedinke ostalih i križanih pasmina, očekivana je relativno visoka raznolikost alela DRA lokusa. Naime, važno je napomenuti da je DRA lokus kod većine dosad istraživanih vrsta monomorfan ili neznatno polimorfan (Takada i sur., 1998., Yuhki i sur., 2003.). Tako je npr. kod ljudi utvrđeno postojanje svega 3 HLA-DRA alela (Murphy i sur., 2008.). Međutim, iznimku čini upravo porodica Equidae koju odlikuje izraziti polimorfizam DRA lokusa. Naime, do danas je u toj porodici utvrđeno čak 23 alela DRA lokusa (Albright-Fraser i sur., 1996., Brown i sur., 2004., Arbanasić i sur., 2009.).

Najučestaliji alel DRA lokusa u istraživanoj populaciji bio je alel Eqca-DRA*0101 (68,25%). Upravo se taj alel pojavljuje s najvećom učestalosti u svim dosad istraživanim populacijama konja. Tako je kod arapskih konja zastupljen s učestalosti od 44%, kod punokrvnih konja 62%, a kod irskih hladnokrvnih konja 70% (Brown i sur., 2004.). Isti je alel pronađen s vrlo visokom učestalosti i u ranijem istraživanju hrvatskih autohtonih pasmina konja: hrv. hladnokrvnjaka (80%) i hrv. posavca (83%) (Arbanasić i sur., 2009.).

U istraživanoj populaciji konja pronađen je i alel DRA lokusa koji dosad nije zabilježen u populaciji konja R. Hrvatske. Riječ je o alelu Eqca-DRA*0301, drugom alelu po učestalosti u istraživanoj populaciji, utvrđenom u čak 52 jedinke. U tri jedinke se pojavio u homozigotnom

obliku, dok je u ostalim jedinkama utvrđen u heterozigotnom obliku. Spomenuti alel već je ranije opisan u konja i to s relativno visokom učestalosti kod pojedinih pasmina, poput arapskih i punokrvnih konja (>20%) (Brown i sur., 2004.).

Treći alel po učestalosti utvrđen u ovom istraživanju je Eqca-DRA*0201 (12,75%). U istraživanju Arbanasić i suradnika (2009.) taj se alel pojavio kod svega 3% hrv. hladnokrvnjaka i 2% hrv. posavca, što je moguće objasniti manjim ukupnim brojem analiziranih jedinki.

Alel s vrlo niskom učestalosti u istraživanoj populaciji bio je alel Eqca-DRA*0501 (1,25%). Spomenuti alel prvi je puta pronađen u uzorku hrvatskih konja u istraživanju Arbanasić i suradnika (2009.). Zabilježena učestalost mu je i u tom istraživanju bila vrlo niska, svega 0,05% u hrv. hladnokrvnjaka i 0,01% u hrv. posavca. Na osnovu rezultata obaju istraživanja može se zaključiti da je navedeni alel vrlo rijedak u populaciji hrvatskih konja.

Alel Eqca-DRA*0401 pronašla sam u 4,75% istraživane populacije konja. Osobitost tog alela jest da se on osim u konja, pojavljuje još i u zebre (*Equus burchelli*) (Kamath i Getz., 2011.). To nije neuobičajeno za MHC alele budući da vrlo često bliske vrste dijele iste MHC alele, a ta se pojava naziva trans-specijski polimorfizam (Klein, 1980.). Trans-specijski polimorfizam alela DRA lokusa još jedna je od osobitosti porodice Equidae. U istraživanju DRA lokusa više različitih vrsta iz roda *Equus,* ustanovljeno je da se pojedini aleli pronađeni u zebre mogu javiti u još nekih vrsta istog roda (Janova i sur., 2009.). U istraživanje je bilo uključeno 140 jedinki različitih vrsta zebri, šest magaraca, 12 kianga i šest azijskih polumagaraca. Od ukupno 17 pronađenih alela DRA lokusa, čak tri su utvrđena i u zebre i u magarca, dok su dva utvrđena u više vrsti zebri. Pojava trans-specijskog polimorfizma dokazana je kod tri od sedam utvrđenih alela DRA lokusa u magarca (*Equus africanus asinus*) s Balkanskog poluotoka. Tako se alel Eqas-DRA*0401 osim u magarca pojavljuje još i u zebre, alel Eqas-DRA*0101 u magarca, planinske zebre i Bruchelii zebre, a alel Eqas-DRA*0201 u magarca, tibetanskog magarca, azijskog magarca i Bruchelli zebre (Arbanasić i sur., 2013.). Pojava trans-specijskog polimorfizma objašnjena je teorijom da su pojedini aleli nastali znatno prije no što je došlo do razdvajanja vrste u dvije nove vrste. Tako su nastali aleli stariji od vrste kojoj pripadaju (Klein, 1980.). Održavanje nekog alela u populaciji kroz dugo evolucijsko razdoblje posljedica je djelovanja ravnotežne selekcije na pojedini lokus. Polimorfizam DRA lokusa porodice Equidae najvjerojatnije je rezultat djelovanja ravnotežne selekcije na taj lokus. Djelovanjem ravnotežne selekcije opstaje više funkcionalnih alela u populaciji.

Značajno je da se aleli zadržavaju u populaciji više milijuna ili čak više desetaka milijuna godina (Hughes i Nei, 1988., Richman, 2000.). Jedan od dokaza djelovanja ravnotežne selekcije na DRA lokus porodice Equidae jest upravo trans-specijski polimorfizam. Pojava trans-specijskog polimorfizma može se najbolje uočiti iz filogenijskih stabala MHC alela. Tako je iz filogenijskog stabla sačinjenog od pet DRA alela pronađenih u ovom istraživanju, te još 18 DRA alela koji pripadaju različitim vrstama iz roda *Equus,* vidljivo da se aleli ne grupiraju prema vrstama kojima pripadaju. Unutar iste grupe nalazimo alele različitih vrsta, dok su neki aleli koji pripadaju različitim vrstama potpuno identični. Primjer je alel Eqca-DRA*0401 koji se osim u konja pojavljuje još i u zebre. Ostala četiri DRA alela pronađena u ovom istraživanju najvjerojatnije su specifična samo za konje (budući da nisu nađeni kod drugih vrsta iz roda *Equus*), što može biti posljedica njihovog relativno nedavnog nastanka. Budući da su se konji od ostalih rodova iz porodice Equidae odvojili prije 2 milijuna godina (Oakenfull i Clegg, 1998., Oakenfull i sur., 2000.), možemo pretpostaviti da su ti aleli mlađi od navedenog razdoblja i da je polimorfizam alela DRA lokusa kod konja relativno mlad. Naime, za neke polimorfne lokuse MHC skupine II pretpostavljena je starost alela od više desetaka milijuna godina; npr. za DRB1 lokus kod ljudi pretpostavljena je starost alela 55 milijuna godina, a kod jedne vrste afričkog štakora (*Heterocephalus glaber*) starost polimorfizma DQA lokusa procijenjena je na 40 milijuna godina. Značajno je napomenuti da filogenijska stabla konstruirana za MHC alele ne služe za donošenje zaključaka o podrijetlu vrste čiji se MHC istražuje, jer se ta stabla najčešće ne poklapaju sa stablima koja prikazuju filogeniju vrste, već ona služe za određivanje razine srodnosti među alelima, a ujedno i za utvrđivanje trans-specijskog polimorfizma među njima.

Među alelima DRA lokusa pronađenim u istraženoj populaciji konja, utvrđeno je ukupno osam polimorfnih nukleotidnih mjesta. Na tri su nukleotidna mjesta utvrđene sinonimne supstitucije, koje ne donose promjenu aminokiseline, dok su na pet nukleotidnih mjesta utvrđene nesinonimne supstitucije koje rezultiraju promjenom aminokiseline. Pet alela utvrđenih u istraživanoj populaciji konja translacijom daje pet jedinstvenih aminokiselinskih sljedova. Taj jednakomjerni odnos nukleotidnih prema aminokiselinskim sljedovima odražava visoku razinu nesinonimnih supstitucija na DRA lokusu i ukazuje na funkcionalnu važnost postojećih alela. Značajno je napomenuti, da se čak četiri od pet aminokiselinskih promjena utvrđenih među DRA alelima nalazi u veznom mjestu receptora, ukoliko pretpostavimo analogiju sa α lancem DR receptora u ljudi (Brown i sur., 1993.). To govori u prilog funkcionalnosti polimorfizma DRA lokusa, te njegovog značaja za imunokompetentnost

jedinke (Hughes i Nei, 1988., Richman, 2000.). Visoki polimorfizam svojstven je upravo za one dijelove MHC gena koji kodiraju za funkcionalno važne regije proteina, odnosno receptora (Garrigan i Hedrick, 2003.). Funkcionalno važne regije receptora su one koje sudjeluju u vezanju antigenih peptida (*eng*. peptide binding region, PBR). Sukladno tome velik broj nukleotidnih supstitucija nalazi se upravo u MHC genskim regijama koje kodiraju za antigen vezujuća mjesta receptora (Hughes i Nei, 1989.).

Aminokiselinske udaljenosti na utvrđenim alelima DRA lokusa pokazale su se većima od nukleotidnih udaljenosti. To je izravan dokaz utjecaja ravnotežne selekcije na opstanak i zadržavanje nesinonimnih mutacija u istraživanoj populaciji konja. Evolucijske udaljenosti među alelima rezultat su nukleotidnih ili aminokiselinskih razlika među njima, te su tako ujedno i izravan pokazatelj njihove raznolikosti. Niska nukleotidna udaljenost među pronađenim alelima DRA lokusa u istraživanoj populaciji konja ukazuje na činjenicu da je polimorfizam DRA lokusa porodice Equidae relativno mlad, odnosno da se razvio relativno nedavno, što je u skladu s ranije iznesenom pretpostavkom o starosti DRA alela u konja.

Postojanje selekcije na određenim lokusima utvrđuje se različitim testovima koji istražuju djelovanje selekcije na tri vremenske razine: u sadašnjoj generaciji, kroz povijest populacije i tijekom evolucije vrste (Bernartchez i Landry, 2003., Garragan i Hedrick, 2003., Sommer, 2005.). Najdublji trag ostavlja selekcija koja se na nekom lokusu događala kroz evoluciju vrste. Jedan od najčešćih testova koji se rabi za dokazivanje djelovanja selekcije kroz evoluciju vrste na nekom lokusu je dN/dS test (Hughes i Nei, 1988.). Tim se testom utvrđuje omjer između nesinonimnih nukleotidnih supstitucija (dN) i sinonimnih ili „tihih“ mutacija (dS) koje ne rezultiraju proteinskom promjenom. Usmjerena selekcija djeluje u slučaju kada određeni alel pridonosi većoj sposobnosti preživljavanja („fitness„), te njegova učestalost raste dok ne postane fiksiran u populaciji, dok se ostali aleli koji nose nesinonimne mutacije ne održe u populaciji. Nasuprot tome, kad je veći broj nesinonimnih mutacija u odnosu na sinonimne, lokus je pod djelovanjem ravnotežne (balansirajuće) selekcije. Značajna nukleotidna, pa tako i aminokiselinska varijabilnost MHC lokusa znatno je učestalija na kodonima koji kodiraju za aminokiseline za koje se pretpostavlja da tvore vezno mjesto antigena. Međutim, sinonimne mutacije koje se događaju na kodonima koji kodiraju za mjesta izvan vezne regije smanjuju dN/dS omjer. Zbog toga se dN/dS test provodi odvojeno za vezna i nevezna mjesta. Na osnovu dobivenog rezultata dN/dS testa za vezna mjesta DRA alela istraživane populacije konja (beskonačna vrijednost, sinonimne mutacije na veznim kodonima nisu prisutne, tablica 10) može se zaključiti da je DRA lokus pod utjecajem ravnotežne selekcije koja održava opstanak novih proteinskih proizvoda u populaciji. Ravnotežna

selekcija ne rezultira fiksacijom samo jednog alela u populaciji, nego održava postojanje više funkcionalnih alela. Kad je broj sinonimnih mutacija veći od broja nesinonimnih mutacija, lokus je pod utjecajem purificirajuće selekcije. Purificirajuća selekcija djeluje na one dijelove proteina koji su neophodni za građu proteina, a time i za njegovu funkcionalnost. U skladu s tim veći dijelovi proteinskog receptora su pod djelovanjem purificirajuće selekcije, a samo neki od kodona u MHC genima su pod djelovanjem pozitivne selekcije. Za testiranje djelovanja pozitivne selekcije na pojedinačne kodone razvijeni su mnogi računalni programi. Najčešće se za istraživanje djelovanja pozitivne selekcije na pojedinačnim kodonima određenog lokusa upotrebljava PAML program. U prijašnjim istraživanjima djelovanja pozitivne selekcije na alelima DRA lokusa porodice Equidae pomoću PAML programa, kodoni 14, 47 i 49 odabrani su s 99% -tnom vjerojatnošću kao kodoni pod djelovanjem pozitivne selekcije (Janova i sur., 2009., Kamath i Getz 2011.). Kodoni 19 i 63, odabrani su s 90%- tnom vjerojatnošću djelovanja pozitivne selekcije. Od pet navedenih kodona, prema analogiji s ljudskim α lancem DR receptora (Brown i sur., 1993.) samo kodon 19 nalazi se u veznom mjestu receptora, dok su kodoni 47, 49 i 63 susjedni onima koji kodiraju za vezna aminokiselinska mjesta. Visoka varijabilnost susjednih kodona ukazuje na njihov doprinos u strukturi vezne regije, a uz to i na moguće specifičnosti DR receptora kod porodice Equidae u odnosu na ljudski receptor. Manji broj kodona DRA lokusa pod djelovanjem pozitivne selekcije, u odnosu na ostale lokuse MHC gena skupine II (Kiemnec-Tyburczy i sur., 2010., Arbanasić i sur., 2013.) u skladu je s nižim polimorfizmom DRA lokusa u odnosu na ostale polimorfne lokuse te genske regije.

U istraživanoj populaciji konja utvrdila sam visoku raznolikost alela DRB lokusa. Utvrdila sam ukupno 14 DRB alela. Osam alela poznato je otprije, dok je šest alela utvrđeno po prvi put u ovom istraživanju. Poznato je da se DRB lokusi MHC gena odlikuju puno većim polimorfizmom u odnosu na DRA lokus. U ljudi su dosad utvrđena čak 503 različita alela DRB1 lokusa (Murphy i sur., 2008.).

Ukupan broj promjenjivih nukleotidnih mjesta među pronađenim alelima DRB lokusa je 78, od čega je na čak 71 mjestu zabilježena nesinonimna nukleotidna promjena koja uvjetuje aminokiselinsku promjenu.

Nukleotidne promjene među DRB alelima pronađenim u istraživanoj populaciji konja uvjetovale su nastajanje 40 promjenjivih aminokiselinskih mjesta. Čak njih 18 nalazi se u veznom mjestu receptora, prema analogiji s ljudskim β lancem DR recepora (Brown i sur.,

1993.). Budući da građa receptora izravno utječe na pokretanje i učinkovitost imunosnog odgovora domaćina na patogeni mikroorganizam, odnosno njegovu prijemljivost ili otpornost na infekcije (Kindt i sur., 2007.), svaka aminokiselinska promjena unutar te regije doprinosi funkcionalnom polimorfizmu DRB lokusa (Richman, 2000.), te je ujedno i dokaz djelovanja ravnotežne selekcije na DRB lokus.

Aminokiselinska udaljenost među pronađenim alelima DRB lokusa veća je od nukleotidne udaljenosti, što je posljedica postojanja većeg broja nesinonimnih supstitucija od sinonimnih i ukazuje na selektivno održavanje nesinonimnih supstitucija na lokusu kroz dulji evolucijski period (Leutkemeier i sur., 2009.). Djelovanje ravnotežne selekcije na DRB lokus kroz evoluciju vrste utvrdila sam dN/dS testom, kojim sam analizirala zasebno vezna i nevezna mjesta. Na osnovu dobivenog rezultata omjera nesinonimnih i sinonimnih mutacija u veznim mjestima (dN/dS>1), vidljivo je da je DRB lokus pod utjecajem ravnotežne selekcije koja održava opstanak novih proteinskih proizvoda u populaciji. Djelovanje ravnotežne selekcije na MHC lokusima pomoću dN/dS testa utvrđeno je i u drugih vrsta iz porodice konja (Janova i sur., 2009.), ali i u drugih vrsta sisavaca, poput voluharice (Bryja i sur., 2006.), psa (Kennedy i sur., 2007.), svinje (Leutkemeier i sur., 2009.) i vodene voluharice (Oliver i Piertney, 2006.).

Pojedinačnom analizom kodona pomoću PAML programa utvrdila sam djelovanje pozitivne selekcije na kodone 5, 6, 69 te na kodon 89. Značajno je istaknuti da su kodoni 6 i 69 kodoni koji kodiraju aminokiseline koje se nalaze unutar veznih mjesta (prema analogiji sa ljudskim β lancima), a kodon 5 je smješten između dva pretpostavljena vezna mjesta (Brown i sur., 1993.).

Ako usporedimo nukleotidnu i aminokiselinsku evolucijsku udaljenost za DRB lokus u odnosu na te udaljenosti DRA lokusa, možemo uočiti da je ona u skladu s ostalim pokazateljima većeg polimorfizma DRB lokusa u odnosu na DRA lokus, kao što su veći broj DRB alela pronađenih u istraženoj populaciji konja i veći broj polimorfnih mjesta utvrđenih kod alela DRB lokusa. Sve su to pokazatelji da je djelovanje selekcije jače izraženo na DRB lokusu.

U istraživanoj populaciji konja utvrdila sam 41 dvolokusni DRA/DRB haplotip. Osam haplotipova pojavljuje se u homozigotnom obliku u više od jedne jedinke. 15 se haplotipova pojavljuje u samo jednoj jedinci, te za njih možemo reći da predstavljaju rijetke haplotipove. Treba napomenuti da se novoutvrđeni DRB aleli u istraženoj populaciji konja javljaju u istim

haplotipovima kao i aleli s kojima su međusobno najsličniji, pa se pretpostavlja da su novi aleli unutar haplotipova nastali nakon što su utvrđeni djelotvorni haplotipovi. Pretpostavlja se da u populaciji opstaju oni haplotipovi koji su djelotvorni u imunosnom odgovoru (Klitz i Thomson, 1987.). Stoga se pojava neuravnoteženog vezanja alela smatra posljedicom, a ujedno i dokazom djelovanja selekcije. No, da bi se u populaciji fiksirale određene alelne kombinacije potrebno je djelovanje selekcije tijekom više desetaka ili čak stotina generacija (Hedrick i Kim, 2000., Hedrick, 2004.).

Značajno je napomenuti da je u genskoj banci pohranjeno relativno malo alela DRB lokusa porodice Equidae, utvrđenih u svega dvije vrste: *Equus caballus* i *Equus ferus przewalski*. Za genske i filogenijske analize DRB lokusa, iz genske banke sam preuzela dostupnih šest DRB alela utvrđenih u vrste *Equus ferus przewalski* (Hedrick i sur., 1999.) i dostupnih 27 DRB alela utvrđenih u vrste *Equus caballus* (Gustafsson i Andersson, 1994., Fraser i Bailey, 1996., Diaz i sur., 2001., Andersson i sur., 2012.). Iz filogenijskog stabla DRB alela vidljivo je da se aleli pronađeni u istraživanoj populaciji konja raspršuju duž filogenijskog stabla, što je dokaz njihove međusobne raznolikosti i posljedica njihovog visokog polimorfizma i divergencije. Za očekivati je da će buduća istraživanja polimorfizma DRB lokusa, u kojima će biti zastupljeni i DRB aleli ostalih vrsta iz porodice Equidae, pružiti bolji uvid u polimorfizam, a vrlo vjerojatno i trans-specijski polimorfizam DRB lokusa porodice Equidae.

Utjecaj raznolikosti gena MHC skupine II na molekularnu epizootiologiju leptospiroze u konja, još uvijek je potpuno neistraženo područje, stoga ovo istraživanje predstavlja tek početak u rasvjetljavanju odgovora na pitanje da li polimorfizam gena MHC skupine II ima i u kolikoj mjeri, utjecaj na patogenezu leptospiroze u konja. Raznolikost alela DRA i DRB lokusa u konja prirodno inficiranih patogenim bakterijama iz roda *Leptospira,* pokušala sam dovesti u vezu s raznolikošću istih u neinficiranih jedinki testiranjem navedene hipoteze primjenom određenih statističkih metoda. Za uvid u grupiranje jedinki koristila sam *fuzzy clustering* metodu. Cilj je bio uvidjeti postoji li bilo ikakvo grupiranje među jedinkama na osnovu njihovog DRA/DRB haplotipa, odnosno serološkog odgovora na leptospirozu. U analizi grupiranja jedinki prema serovaru leptospira na koji pokazuju serološki odgovor utvrđen MAT metodom, jedinke su se grupirale u najviše 12 razreda. Zaseban su razred formirale jedinke s negativnim serološkim nalazima. Ostali razredi formirani su prema serološkom odgovoru jedinki na pojedine serovare leptospira. Dva su razreda formirale jedinke pozitivne samo na jedan serovar, no većina pozitivnih jedinki svrstavale su se u razrede prema pozitivnoj reakciji na više serovara istovremeno. Pozitivna reakcija na više serovara naziva se kooaglutinacijska ili križna reakcija. Ona je rezultat postojanja vrlo sličnih

površinskih antigena kod određenih serovara leptospira. Vjerojatno infektivni serovar je onaj s najvišom vrijednošću titra, odnosno razrijeđenjem seruma u kojem je još uvijek prisutna pozitivna reakcija (Levett, 2001.).
Na osnovu grupiranja jedinki prema DRA/DRB haplotipovima utvrđeno je postojanje najviše sedam razreda. Jedinke su se grupirale s obzirom na homozigotno/heterozigotni oblik DRA/ DRB haplotipa. Provedene analize grupiranja jedinki poslužile su za uočavanje strukture podataka i postojećih grupiranja na osnovu varijabli korištenih u pojedinoj analizi i bile su neophodne za nastavak statističkih analiza koje su uslijedile.

Fuzzy clustering grupiranjem jedinki prema obje varijable, dakle DRA/DRB haplotipu i serološkom odgovoru na leptospire utvrđeno je postojanje 11 razreda, ali značajno je istaknuti da je samo mali broj jedinki, svega 31 jedinka, pokazala izuzetnu međusobnu sličnost, odnosno veliku različitost od ostalih jedinki.

U svrhu jasnog pregleda svih varijabli, korisnih za interpretaciju rezultata, provedena je višestruka analiza povezanosti (MCA, *eng.* multiple correspondence analysis). Tom sam analizom uočila i kvantificirala značajnost međusobnih povezanosti među varijablama. Rezultati MCA analize pokazali su da nema značajnijih grupiranja jedinki prema haplotipovima i serovarima.

Analizom skupnih povezanosti dobila sam podatke o združenosti ili povezanosti pojedinih kategorija i varijabli u istraženoj populaciji jedinki. Važno je naglasiti da rezultati združenosti nisu primijenivi u vidu općenitog pravila koje bi vrijedilo za cjelokupnu populaciju konja, jer se statistička značajnost njihove međusobne povezanosti odnosi samo na ispitivani uzorak jedinki. Utvrđen je niz statistički značajnih povezanosti određenih alela DRA i DRB lokusa s kategorijom pasmine konja, no te se povezanosti moraju promatrati s obzirom na učestalost pojedine pasmine konja u istraživanju. Statistički značajna povezanost utvrđena je za kategoriju spola i pojedinih serovara na koje su jedinke pokazale serološki odgovor. Tako je primjerice kod jedinki pozitivnih na serovar Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae i Pomona utvrđena statistički značajna povezanost sa ženskim spolom. Također je utvrđena povezanost određenih DRA/DRB alela sa kategorijom spola jedinki. Od statistički značajnih povezanosti serovara leptospira na koji jedinke pokazuju serološki odgovor i DRA/DRB alela, utvrđena je povezanost jedinki sa serološkim odgovorom na serovar Pomona s alelom Eqca-DRB*03. No, treba uzeti u obzir činjenicu da je upravo alel Eqca-DRB*03 najzastupljeniji alel u istraživanoj populaciji konja, te je stoga to očekivani rezultat. Postoje i naznake povezanosti

serovara na koji je utvrđen serološki odgovor jedinke s određenom pasminom konja. Uočena je tako značajna statistička povezanost jedinki pozitivnih na serovar Australis i Bratislavu s pasminom hrvatski posavac. Ovdje opet treba uzeti u obzir nejednak udio pojedinih pasmina konja u provedenom istraživanju.

Posebno su zanimljivi rezultati povezanosti DRA/DRB haplotipa s određenim alelima DRB lokusa. Utvrđeno je, naime, da su sve jedinke koje imaju alele Eqca-DRB*02, Eqca-DRB*05, Eqca-DRB*11, Eqca-DRB*12 i Eqca-DRB*13 homozigotne za DRB lokus. Kod tih rezultata treba uzeti u obzir da se većina navedenih alela u istraženoj populaciji pojavljuje s učestalošću manjom od 10%, a aleli Eqca-DRB*05 i Eqca-DRB*13 i manjom od 1%. DRA/DRB haplotip heterozigotnog oblika DRB lokusa statistički je pak značajno povezan s alelima Eqca-DRA*0201 i Eqca-DRA*0301. Kod ovog rezultata također treba imati na umu da je alel Eqca-DRA*0201 zastupljen u ispitivanoj populaciji u manje od 10% jedinki. DRA/DRB haplotip homozigotnog oblika DRA lokusa statistički je značajno povezan s alelom Eqca-DRA*0101 što je i očekivano budući da je to najzastupljeniji alel DRA lokusa u istraženoj populaciji konja.

Višestrukom analizom povezanosti, MCA, ukupni podatci o istraživanim jedinkama formirali su dvije dimenzijske osi. Varijable koje označavaju serovar činile su jednu, a varijable vezane za DRA/DRB haplotipove drugu dimenziju. Značajno je da varijable pasmine i spola nisu imale nikakvo značenje u objašnjavanju varijanci uzoraka.
Temeljem rezultata dobivenih navedenim statističkim analizama nije moguće, dakle, utvrditi općenito pravilo koje bi vrijedilo za cjelokupnu populaciju konja, iz razloga što se iz formiranih dviju dimenzija analiziranih podataka može objasnti samo mali dio ukupne varijance (svega 12,42%). Međutim, s druge strane, rezultati statističkih analiza ukazuju na naznake pravila, što je vidljivo iz „razdvajanja“ varijabli u dvije dimenzije, te ukazuju na potrebu za dodatnim statističkim analizama i nastavkom ovog istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Raznolikost alela DRA lokusa utvrđenih u istraživanoj populaciji konja potvrđuje funkcionalni polimorfizam DRA lokusa karakterističan za porodicu Equidae. Pronađeno je ukupno pet DRA alela koji su svi već opisani u ranijim istraživanjima. Svaki alel rezultira jedinstvenim proteinskim proizvodom.

Postojanje trans-specijskog polimorfizma DRA lokusa dokaz je djelovanja ravnotežne selekcije na taj lokus tijekom evolucije vrste.

Niska nukleotidna udaljenost među pronađenim alelima DRA lokusa dokaz je da se polimorfizam DRA lokusa porodice Equidae razvio relativno nedavno. Većina aminokiselinskih promjena utvrđenih među DRA alelima nalazi se u veznom mjestu receptora što ukazuje na funkcionalnost polimorfizma i njegov značaj za imunokompetentnost jedinki.

Utvrđen je visoki polimorfizam alela DRB lokusa. Pronađeno je ukupno 14 DRB alela, od čega njih šest po prvi put u ovom istraživanju. Svaki alel rezultira jedinstvenim proteinskim proizvodom.

Veći broj nesinonimnih u odnosu na sinonimne mutacije u veznim mjestima DRB lokusa, dokaz je djelovanja ravnotežne selekcije koja održava opstanak novih proteinskih proizvoda u populaciji.

Utvrđen je 41 dvolokusni DRA/DRB haplotip u istraživanoj populaciji konja.

Utvrđena je statistički značajna povezanost pojedinih serovara leptospira na koji jedinke pokazuju serološki odgovor i alela DRA i DRB lokusa, kao i pasmine konja, te povezanost određenih alela DRA i DRB lokusa i kategorija spola i pasmine konja.

Iz rezultata višestruke analize povezanosti među podatcima nije moguće utvrditi općenito pravilo koje bi vrijedilo za cjelokupnu populaciju konja zbog malog broja jedinki koje pripadaju pojedinoj kategoriji, a iz analiziranih podataka formirane dvije dimenzije, serovar leptospira i haplotip jedinke, objašnjavaju samo mali dio ukupne varijance (svega 12, 42%), no postoje naznake pravila grupiranja podataka, vidljive upravo iz „razdvajanja“ spomenutih varijabli u dvije dimenzije.

7. LITERATURA

Abdoel TH, Houwers DJ, Van Dongen AM, Adesiyun AA, Jiménez-Coelloe M, Cardoso L, Suepaul SM, Ortega-Pacheco A, Smits HL (2011) Rapid test for the serodiagnosis of acute canine leptospirosis. Veterinary Microbiology 12: 211-213.

Adler B i Faine S (1977) Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. Infection and Immunity 17: 67-72.

Adler B i De la Peña Moctuezuma A (2010) Leptospira and leptospirosis. Veterinary Microbiology 140: 287–296.

Ahmad S i Sarwari AR (2010) Leptospirosis induced pulmonary alveolar hemorrhage. West Virginia Medical Journal 106 (7): 20-22.

Albert KI, Goarant C, Picardeau M (2009) Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Reviews Microbiology 7: 736-747.

Albright D, Bailey E, Woodward JG (1991) Nucleotide sequence of a cDNA clone of the horse (*Equus caballus*) DRA gene. Immunogenetics 34: 136–138.

Albright-Fraser DG, Reid R, Gerber V, Bailey E (1996) Polymorphism of DRA among equids. Immunogenetics 43(5): 315–317.

Amilasan AT, Ujiie M, Suzuki M, Salva E, Belo MCP, Koizumi N, Yoshimatsu K, Schmidt WP, Marte S, Dimaano EM, Villarama JB, Ariyoshi K (2012) Outbreak of leptospirosis after flood the Philippines 2009. Emergency Infectious Diseases 1: 91-94.

Anasari HA, Hediger R, Fries R, Stranzinger G (1988) Chromosomal localization of the major histocompatibility complexof the horse (ELA) by in situ hybridization. Imnunogenetics 28: 362-364.

Andersson LS, Swinbune JE, Meadows JRS, Brostrom H, Eriksson S, Fikse WF, Frey R, Sundquist M, Tseng CT, Mikko S, Lindgren G (2012) The same ELA class II risk factors confer equine insect bite hypersensitivity in two distinct populations. Immunogenetics 64: 201-208.

Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2004) Imunologija. Medicinska naklada, Zagreb

Antunović-Mikačić S (1935) O prvom slučaju Weilove bolesti na našem Primorju. (The first case of Weil's disease on our coastal region). Liječnički vjesnik 57: 377-377.

Apanius V, Penn D, Slev PR, Ruff LR, Potts WK (1997) The nature of selection on the major histocompatibility complex. Critical Reviews in Immunology 17: 179–224.

Arbanasić H, Galov A, Salajpal K, Curik I (2009) Diversity of equine major histocompatibility complex class II DRA locus in Posavina and Croatian Coldblood horse: a new polymorphism detected. Italian Journal of Animal Science (Supplement 3) 8: 77-79.

Arbanasić H, Galov A , Ambriović-Ristov A, Grizelj J, Arsenos G, Marković B, Dovenski T, Vince S, Čurik I (2013) Extensive polymorphism of the major histocompatibility complex DRA gene in Balkan donkeys: perspectives on selection and genealogy. Animal Genetics, Volume 44, Issue 6: 711–716.

Babić I (1927) Typhus canum u Zagrebu (Typhus canum in Zagreb). Jugoslavenski veterinarski glasnik 7: 21-21.

Bailey E (1994) Variation within the antigen binding site of the major histocompatibility complex DRA gene of domestic horses. Equine Infectious Diseases VII: 123–126.

Bailey E, Marti E, Fraser DG, Antzac DF, Lazary S (2000) Immunogenetics of the horse. U: Bowling AT, Rusinsky A (ed.) The genetics of the horse. CABI, Wallingford (UK), 123–155.

Balen-Topic M, Habus J, Milas Z, Celjuska Tosev E, Stritof Z, Turk N (2010) Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104: 202–206.

Baranton G i Postic D (2006) Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. International Journal of Infectious Diseases 10 (2): 162-70.

Barwick RS, Mohammed HO, Mcdonough PL, White ME (1997) Risk factors associated with the likelihood of leptospiral seropositivity in horses in the state of New York. American Journal of Veterinary Research 58: 1097-103.

Barwick RS, Mohammed HO, Atwill ER, Mcdonough PL, White ME (1998) The Prevalence of Equine Leptospirosis in New York State. Journal of Equine Science 9: 119-124.

Baseman JB i Cox CD (1969) Intermediate Energy Metabolism of Leptospira. Journal of Bacteriology 97 (3): 992–1000.

Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, Mcdonald KL, Riley LW (2002) Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. Infection and Immunity 70: 6926-6932.

Baverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzeb P, Egenvall A (2009) Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. Acta Veterinaria Scandinavica 15: 51-51.

Bernard WV (1993) Leptospirosis. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 9: 435-44.

Bernard WV, Bolin C, Riddle T, Durando M, Smith BJ, Tramontin RR (1993) Leptospiral abortion and leptospiruria in horses from the same farm. Journal of the American Veterinary Medical Association 202: 1285-1286.

Bernatchez L i Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? Journal of Evolutionary Biology 16: 363-377.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases 3: 757-771.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329 (6139): 506–512.

Blatti S, Overesch G, Gerber V, Frey J, Hussy D (2011) Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy horses in Switzerland. SAT, Schweizer Archiv fur Tierheilkunde 153: 449-456.

Borčić B, Kovačić H, Šebek Z, Aleraj B, Tvrtković N (1982) Small terrestrial mammals as reservoir of leptospires in the Sava valley (Croatia). Folia Parasitology 29: 177-182.

Borčić B, Kovačić H, Šebek Z, Aleraj B, Tvrtković N (1983) Small terrestrial mammals as reservoir of leptospires in the Drava valley (Croatia). Vetrinarski arhiv 53: 41-49.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS (1999) Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies International journal of systematic bacteriology 49: 839–858.

Brown JA, Lefebvre RB, Pan MJ (1991) Protein and antigen profiles of prevalent serovars of *Leptospira interrogans*. Infection and Immunity 59: 1772-1777.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley CD (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibilitiy antigen HLA-DR1. Nature 364: 33-39.

Brown PD, Gravekamp C, Carrington DG, Van De Kemp H, Hartskeerl RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. Journal of Medical Microbiology 43: 110–114.

Brown JJ, Thomson W, Clegg P, Eyre S, Kennedy LJ, Matthews J, Carter S, Ollier WE (2004) Polymorphisms of the equine major histocompatibility complex class II DRA locus. Tissue Antigens 64 (2): 173–179.

Brudnjak Z, Zelenika P, Šibalin M (1956) Prilog poznavanju leptospiroze u konja. Vetrinarski arhiv 26: 165-165.

Bryja J, Galan M, Charbonnel N, Cosson JF (2006) Duplication, balancing selection and trans-species evolution explain the high levels of polymorphism of the DQA MHC class II gene in voles (Arvicolinae). Immunogenetics 58: 191-202.

Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, Seemann T, Mcgrath A, Cullen PA, Davis J, Johnson M, Kuczek E, Alt DP, Peterson-Burch B, Coppel RL, Rood JI, Davies JK, Adler B (2006) Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 14560–14565.

Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ (1999) HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. Science 283: 1748–1752.

Cerqueira GM., Mcbride AJA, Picardeau M, Ribeiro SG, Morel V, Reis MG, Ko AI, Dellagostin OA (2009) Distribution of the Leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. and application of *ligB* to typing leptospiral isolates. Journal of Medical Microbiology 9: 1173-1181.

Chalayon P, Chanket P, Boonchawalit T, Chattanadee S, Srimanote P, Kalambaheti T (2011) Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 105: 289-97.

Charon NW i Goldstein SF (2002) Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. Annual Review of Genetics 36: 47–73.

Chardon P, Renard C, Vaiman M (1999) The major histocompatibility complex in swine. Immunological Reviews 167: 179–192.

Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, Strominger JL (1992) Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. Nature 358: 764-768.

Ciceroni L, Erminia S, Pinto A, Pizzocaro P, Dettori G, Franzin L, Lupidi R, Mansueto S, Manera A, Loli A, Marcuccio L, Grillo R, Ciarrocchi S, Cinco M (2000) Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. European Journal of Epidemiology 16: 79-86.

Clarke B i Kirby DR (1966) Maintenance of histocompatibility polymorphisms. Nature 211: 999-1000.

Cutrera AP, Zenuto AR, Lacey EA (2011) MHC variation, multiple simultaneous infections and physiological condition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. Infection, Genetics and Evolution 11: 1023- 1036.

Cvetnić Ž, Jukić B, Špičić S (2004) Rasprostranjenost leptospiroze konja u Republici Hrvatskoj od 1994. do 2003. godine (Distribution of equine leptospirosis in the Republic of Croatia from 1994 to 2003). Veterinarska stanica 35. 67-75.

Danchin EGJ, Abi-Rached L, Gilles A, Pontarotti P (2003) Conservation of the MHC-like region throughout evolution. Immunogenetics 55: 141–148.

Danchin EGJ, Vitiello V, Vienne A, Richard O, Gouret P, McDermott MF, Pontarotti P (2004) The major histocompatibility complex origin. Immunological Review 198: 216–232.

Darbo E, Danchin EGJ, McDermott MEP, Pontarotti P (2008) Evolution of major histocompatibility complex by «en bloc» duplication before mammalian radiation. Immunogenetics 60: 423-438.

Day MJ i Schultz RD (2013): Veterinarska imunologija, načela i primjena. Medicinska naklada, Zagreb

Deter J., Bryja J., Chaval Y., Galan M., Henttonen H., Laakkonen J., Voutilainen L., Vapalahti O., Vaheri A., Ribas Salvador A., Morand S., Cosson J.-F., Charbonnel N. (2008): Assocation between the DQA MHC class II gene and Puumala virus infection in *Myodes glareolus*, the bank vole. Infection, Genetics and Evolution 8: 450-458.

Diament D, Brunialti MKC, Romero EC, Kallas EG, Salomao R (2002) Peripheral blood mononuclear cell activation induced by *Leptospira interrogans* glycolipoprotein. Infection and Immunity 70: 1677–1683.

Díaz S, Giovambattista G, Dulout FN, Peral-García P (2001) Genetic variation of the second exon of ELA-DRB genes in Argentine Creole horses. Animal Genetics: 32(5): 257-63.

Dikken H i Kmety E (1978) Serological typing methods of leptospires. U: Bergan T, Norris JR (ed.) Methods in Microbiology. New York, Academic Press 259-307.

Doherty PC, Zinkernagel RM (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. Nature 256: 50-52.

Donahue JM, Smith BJ, Redmon KJ, Donahue JK (1991) Diagnosis and Prevalence of Leptospira Infection in Aborted and Stillborn Horses. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 3: 148-151.

Donahue M (2001) Equine Leptospirosis. Equine Disease Quarterly Kentucky 9: 5.

Ellis WA (1986) The diagnosis of leptospirosis in farm animals. U: Ellis WA, Little TWA (ed.) The present State of Leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoffpublishers, Dordrecht, 13-31.

Ellis WA (1994) Leptospirosis as a cause of reproductive failure. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 10: 463-478.

Ellis WA (1999) Equine leptospirosis. Equine infectious diseases VIII: Proceedings of the Eighth International Conference, Dubai, 23rd- 26th March 1998., R&W Publications (Newmarket) Ltd, Newmarket, UK, 155-158.

Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Montgomery J (1983) Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings. Equine Veterinary Journal 15: 317-320.

Ellis WA, Hovind-Hougen K, Moller S, Birch-Andresen A (1983b) Morphological changes upon subculturing of freshly isolated strains of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A 255: 323-335.

Ellis WA i O'Brien JJ (1988) Leptospirosis in horses. U: Powell DG (ed.) Equine infectious diseases V: Proceedings of the fifth International Conference. Lexington, USA. Published by The University Press of Kentucky, 168-171.

Ellinghausen Jr. HC i McCullough WG (1965) Nutrition of Leptospira pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex (OAC) and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. American Journal of Veterinary Research 26: 45-51.

Excoffier L, Laval G, Balding D (2003) Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. Henry Stewart Publications 1473-9542, Human Genomics volume 1. 1: 7–19.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.

Egid K i Brown JL (1989) The major histocompatibility complex and female mating preferences in mice. Nature 351: 548-550.

Faber NA, Crawford M, Lefebvre RB, Buyukmihci NC, Madigan JE, Willits NH (2000) Detection of *Leptospira* spp in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. Journal of Clinical Microbiology 38: 2731–2773.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) Leptospira and leptospirosis. Second Edition, Medicine Science, Melbourne, Australia.

Fearnley C, Wakeley P, Gallego-Beltran J, Dalley C, Williamson S, Gaudie C, Woodward M (2007) The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue. Research in Veterinary Science 85: 8-16.

Feresu SB, Bolin AC, Korver H (1993) A new leptospiral serovar in the Icterohaemorrhagiae serogroup isolated frm an ox in Zimbabwe. International journal of systematic bacteriology 43: 179-182.

Fernandez-de-Mera IG, Vicente J, Naranjo V, Fierro Y, Garde JJ, Fuente J, Goartazar C (2009) Impact of major histocompatibility complex class II polymorphism on Iberian red deer parasitism and life history traits. Infection, Genetics and Evolution 9: 1232-1239.

Frankham R (2003) Comptes Rendus Biologies 326 (2003) S22–S29 Genetics and conservation biology.

Fraser DG i Bailey E (1996) Demonstration of three DRB loci in a domestic horse family. Immunogenetics 44(6):441–445.

Fraser DF i Bailey E (1998) Polymorphism and multiple loci for the horse DQA gene. Immunogenetics 47: 487–490.

Froeschke G i Sommer S (2005) MHC Class II DRB constitution and parasite load in the striped mouse, *Rhabdomys pumilio*, in the Southern Kalahari. Molecular Biology and Evolution 22: 1254-1259.

Garrigan D i Hedrick PW (2003) Perspective: detecting adaptive molecular polymorphism: lessons from the MHC. Evolution 57(8): 1707-1722.

Godišnji izvještaj Hrvatskog stočarskog centra za 2003. godinu

Golub ES i Green DR (1991) Immunology: A synthesis. 2nd ed. Sinauer Associates.

Gorer PA (1936) The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. Journal of Experimental Biology 17: 42-6.

Gorer PA (1937) The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. Journal of Pathology & Bacteriology 44: 691-697.

Gravekamp C, Van De Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA, Terpstra WJ (1993) Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. Journal of general microbiology 139: 1691-1700.

Guillemot F, Turmel P, Charron D, Le Douarin N, Auffray C (1986) Structure, biosynthesis, and polymorphism of chicken MHC class II (B-L) antigens and associated molecules. J Immunology 137(4): 1251–1257.

Gustafson AL, Tallmadge RL, Pamlachan N, Miller D, Bird H, Antczak DF, Raudsepp T, Chowdhary BP, Skow LC (2003) An order BAC contig map of the equine major histocompatibility complex. Cytogenetic and Genome Research 102: 189–195.

Gustafsson K i Andersson L (1994) Structure and polymorphism of horse MHC class II DRB genes: convergent evolution in the antigen binding site. Immunogenetics. 1994: 39(5):355–358.

Gyllensten U, Bergstrom T, Josefsson A, Sundvall M, Erlich HA (1996) Rapid allelic diversification and intensified selection at antigen recognition sites of the MHC class II DPBl locus during hominoid evolution. Tissue Antigens 47: 212-221.

Haake DA i Levett MA (1994) Interjunctional invasion of endothelial cell monolayers. Methods in Enzymology 236: 447-463.

Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA (2000) The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. Infection and Immunity 68: 2276-2285.

Haapala DK, Rogul M, Evans LB, Alexander AD (1969) Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of Leptospira. Journal of Bacteriology 98: 421-428.

Habuš J, Cvetnić Ž, Milas Z, Štritof Z, Balen-Topic M, Margaletić J, Turk N (2008) Serološko i epidemiološko istraživanje leptospiroze u Hrvatskoj tijekom 2007. Infektološki glasnik 28: 183-188.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Hamond C, Gabriel M, Reis J, Kraus E, Pinna A, Lilenbaum W (2011) Pulmonary hemorrhagie in horses seropositive to leptospirosis. Pesquisa Veterinaria Brasileira 31: 413-415.

Hamond C, Martins G, Lawson-Ferreira R, Medeiros MA, Lilenbaum W (2012) The role of horses in the transmission of leptospirosis in an urban tropical area. Epidemiology and Infection: 1-3.

Hamond C, Martins G, Lilenbaum W (2012b) Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. Tropical Animal Health and Production 44(8): 1927-1930.

Hedrick PW (2004) Comment on "parasite selection for immunogenetic optimality". Science 303: 957.

Hedrick PW i Thomson G (1983) Evidence for balancing selection at HLA. Genetics 104: 449-459.

Hedrick PW, Parker KM, Miller EL, Miller PS (1999) Major histocompatibility complex variation in the endangered Przewalski` s horse. Genetics. August; 1524: 1701-1710.

Hedrick PW i Kim KJ (2000) Genetics of complex polymorphisms: parasites and maintenance of the major histocompatibilitycomplex variation. U: Singh RS, Krimbas CB (ed.) Evolutionary genetics: from molecules to morphology. Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 204–234.

Helmerhorst HJF, Van Tol EN, Tuinman PR, De Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, Hovius JW (2012) Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. The Netherlands Journal of Medicine 5: 215-221.

Hickford JGH, Forrest RH, Zhou HT, Fang Q, Frampton CM (2011) Association between variation in faecal egg count for mixed field-challenge nematode parasites and ovine MHC-DQA2 polymorphism. Veterinary Immunology and Immunopathology 144: 312-20.

Hines MT (2007) Leptospirosis. Equine Infectious Diseases. Saunders Elsevier.

Hookey JV (1993) Characterization of Leptospiraceae by 16S restriction fragment length polymorphisms. Journal of general microbiology 139: 1681-1689.

Horin P i Matiasovic J (2002) A second locus and new alleles in the major histocompatibility complex class II (ELA-DQB) region in the horse. Animal Genetics 33(3): 196–200.

Hovind - Hougen K (1986) Morphology of leptospires: electron microscopic studies in relation to the classification of Leptospira. U: Ellis WA, Little TWA (ed.) The present state of leptospirosis diagnosis andcontrol Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht, the Netherlands, 1-11.

Hübener EA, Reiter H (1915) Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. Deutsche Medizinische Wochenschrift 41: 1275-1277.

Hughes AL i Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. Nature 335: 167-170.

Hughes AL i Nei M (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 86: 948-962.

Hughes AL i Yeager M (1998) Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. Annual Review of Genetics 32: 415-434.

Huttley GA, Smith MW, Carrington M, O'Brien SJ (1999) A scan for linkage disequilibrium across the human genome. Genetics 152: 1711–1722.

Ido Y i Wani H (1916) Uber der Bazeihung der atypischen Form der Spirochaetosis icterohaemorrhagica Inada (Weilsche Krankheit) zu der sog. Nanukayami (Siebentagfiaber).Verhandtlung der japanischer patologisher Gasellschaft, Tokyo. 6: 44-48 (Citirano iz Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) Leptospira and leptospirosis. Second Edition, Medicine Science, Melbourne, Australia)

Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H (1917) The rat as a carrier of Spirocheta icterohaemorrhagia, the causative agent of Weil's disease (spirochaetosis icterhaemorrhagica). The Journal of Experimental Medicine 26: 341-353.

Inada R i Ido Y (1915) A report on the discovery of the causal organism (a new species of Spirochaeta) of Weil's disease (in Japanese). Tokyo Ijishinshi (Tokyo Medical Journal) 1908: 351-360.

Inada R, Ido Y, Kaneko R, Hoki R, Ito H (1915) Spirochaetosis icterohaemorrhagica. The ethiology, morbid anatomy, pathology, symptoms, diagnosis, prophylaxis and treatment (in Japanese). Nisshin Igaku (Nisshin Med) 5: 1-277.

Inada R, Ido Y, Hoki R, Kaneko R, Ito H (1916) The etiology, mode of infectionand specific therapy of Weil`s disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagiae). Journal of Experimental Medicine 23: 377-402.

Ivanković A (2004) Konjogojstvo. Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.

Janova E, Matiasovic J, Vahala J, Vodicka R, Van Dyk E, Horin P (2009) Polymorphism and selection in the major histocompatibility complex DRA and DQA genes in the family Equidae. Immunogenetics 61: 513-527.

Jansen A, Schoneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K (2005) Leptospirosis in Germany, 1962-2003. Emerging Infectious Diseases Journal – CDC 7: 1048-1054.

Jeffery KJ i Bangham CR (2000) Review: do infectious diseases drive MHC diversity? Microbes and Infection 2: 1335–1341.

Johnson RC i Harris VG (1967) Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. Growth at low temperatures. Journal Bacteriology 94: 27-31.

Jordan WC i Bruford MW (1998) New perspectives on mate choice and the MHC. Heredity 81: 239–245.

Kalemkerian PB, Metz GE, Peral Garcia G, Echeverría MG, Giovambattista G, Diaz S (2012) ELA-DRA polymorphisms are not associated to Equine Arteritis Virus infection in horses from Argentina. Tissue antigens 93: 1271 – 1273.

Kamath P i WM Getz (2011) Adaptive molecular evolution of the Major Histocompatibility Complex genes, DRA and DQA, in the genus *Equus*. BMC Evolutionary Biology. 11:128.

Kelley J, Walter L, Trowsdale J (2005) Comparative genomics of major histocompatibility complex. Immunogenetics 56: 683-695.

Kennedy LJ, Barnes A, Haap GM (2002) Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. Tissue Antigens 60: 43–52.

Kennedy LJ, Angles JM, Barnes A, Carmichael LE, Radford AD, Ollier WER, Happ M (2007) DLA-DRBI, DQAI, and DQBI alleles and haplotypes in North American Gray Wolves. Journal of Heredety 98 (5): 491-499.

Kent G. C. i Carr R. K. (2000): Comparative Anatomy of the Vertebrates. 9th ed. McGraw-Hill Companies

Kiemnec-Tyburczy KM, Richmond JQ, Savage AE, Zamudio KR (2010) Selection, trans-species polymorphism and locus identification of major histocompatibility complex class IIB alleles of New World ranid frogs. Immunogenetics 62: 741-752.

Kinde H, Hietala SK, Bolin CA, Dowe JT (1996) Leptospiral abortion in horses following a flooding incident. Equine Veterinary Journal 28: 327-330.

Kindt JT, Goldsby RA, Osborne BA (2007) Kuby Immunology. 6th edition, WH Freeman and Company, New York

Klarenbeek A i Winsser J (1938) De leptospirosen bij de kleine huisdieren. Tschr. V. Diergen. 65: 666.

Klein J (1980) Generation of diversity at MHC loci: implications for T-cell repertoires. U: Fougereau M, Dausset J (ed.) Immunology 80. Academic press, London, 239-253.

Klein J (1986) Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley & Sons, New York

Klein J (1987b) Origin of major histocompatibility complex polymorphism: The trans-species hypothesis. Human Immunology 19: 155.

Klein J, Sato A, Mayer WE (2000) Jaws and AIS. U: Kasahara M (ed.) Major Histocompatibility Complex: Evolution, Structure and Function. Springer, Tokyo, 3–26.

Klitz W i Thomson G (1987) Disequilibrium pattern analysis. II. Application to Danish HLA A and B locus data. Genetics 116: 633–643.

Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson Jr. WD, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet 354: 820–825.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M (2009) Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nature Reviews Microbiology 7: 736-747.

Landry C i Bernatchez L (2001) Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (Salmo salar). Mol. Ecol., 10, 2525–2539.

Langefors A, Lohm J, Grahn M, Andersen O, Von Schantz T (2001) Association between major histocompatibility complex class IIB alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268: 479–485.

Lazzaro BP i Little TJ (2009) Immunity in a variable world. Philosophical transactions of the Royal Society Series B 364: 15–26.

Lee SH, Kim S, Park SC, Kim MJ (2002) Cytotoxic activities of Leptospira interrogans hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. Infection and Immunity 70(1): 315–322.

Lees VW i Gale SP (1994) Titers to Leptospira species in horses in Alberta. The Canadian Veterinary Journal 35: 636-640.

Leonard FC, Quinn PJ, Ellis WA, O'Farrell K (1992) Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with Leptospira interrogans serovar hardjo. Veterinary Record 131(19): 435-439.

Leutkemeier ES, Malhi RS, Beever JE, Schook LB (2009) Diversification of porcine MHC class II genes: evidence for selective advantage. Immunogenetics 61: 119-129.

Levett PN (2001) Leptospirosis. Clinical Microbiology Reviews 14: 296-326.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW (2005) Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of Medical Microbiology vol. 54 1: 45-49.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Steigerwalt AG (2006) *Leptospira broomii* sp. nov., isolated from humans with leptospirosis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 671–673.

Levett PN (2007) Sequence - Based Typing of Leptospira: Epidemiology in the Genomic Era. PLOS Neglected Tropical Diseases 1(2).

Lindgren G, Backström N, Swinburne J, Hellborg L, Einarsson A, Sandberg K, Cothran G, Vilà C, Binns M, Ellegren H (2004) Limited number of patrilines in horse domestication. Nature Genetics 36: 335–336.

Lingappa J, Kuffner T, Tappero J, Whitworth W, Mize A, Kaiser R, McNicholl J (2004) HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water: possible gene- environment interaction in an outbreak of Leptospirosis. Genes and Immunity 5: 197–202.

Little CC, Tyzzer EE (1916) Further experimental studies on the inheritance of susceptibility to a Transplantable tumor, Carcinoma (J. W. A.) of the Japanese waltzing Mouse. Journal of Medical Reearch 33(3): 393–453.

Ludovic L, Morineau A, Piron M (1997) Statistique Exploratoire Multidimensionnelle. Dunod. Paris, Francuska, ISBN-13: 978-2100053513.

Luís C, Cothran EG, Oom MM, Bailey E (2005) Major histocompatibility complex locus DRA polymorphism in the endangered Sorraia horse and related breeds. Journal of Animal Breeding and Genetics 122: 69–72.

Lukeš J (1924) Sur la presence des spirochetes chez les chiens atteints de Gastroenterite et sur le role pathogene possible des microorganismes. Annales del Institutetut Pasteur 38: 523.

Ljubašenko SJ i Novikova LS (1947) Leptospirozlošadjei. Sovjeti Veterina 24: 11-15. (citirano iz Zaharija I, Fališevac J, Borčić Bi Modrić Z (1982) Leptospiroze. 30- godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj, Jumena, JAZU, Zagreb)

Male D, Cook A, Owen M, Trowsdale J, Champion B (1996) Advanced Immunology. 3rd ed. C.V. Mosby, London

Male D, Brostoff J, Roth DB, Roitt I (2006) Immunology. 7th edn. Elsevier

Makinen A, Chowdhary B, Mahdy E, Andersson L, Gustafsson I (1989) Localization of the equine major histocompatibility complex (ELA) to chromosome 20 by in situ hybridization. Hereditas 110: 93–96.

Mashima S (2003) Comparative sequence analysis of equine and human MHC class II DOB genes.Cytogenetic and Genome Research 102(1–4): 196–200.

Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M, Diaz MM, Galloway RL, Saito M, Steigerwalt AG, Patra KP, Ore CV, Gotuzzo E, Gilman RH, Levett PN, Vinetz JM (2008) Human Leptospirosis Caused by a New, Antigenically Unique Leptospira Associated with a Rattus Species Reservoir in the Peruvian Amazon. PLOS Neglected Tropical Diseases 2(4): 213-213.

Medawar PB (1946) Behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits (report to the War Wounds Committee of the medical Research Council). J Anat 1946; 78: 176-199.

Medina E i North RJ (1998) Resistance ranking of some common inbred mouse strains to Mycobacterium tuberculosis and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. Immunology 93: 270-274.

Mérien F, Baranton G, Pérolat P (1995) Comparison of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. The Journal of Infectious Diseases 172: 281-285.

Mérien F, Truccolo J, Rougier Y, Baranton G, Pérolat P (2000) Identification of a 36- k Da fibronectin- binding protein expressed by a virulent variant of Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae. FEMS Microbiology Letters 185: 17-22.

Mérien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G (2005) A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis. FEMS Microbiology Letters 249:139–147.

Mgode GF, Machang'u RS, Goris MG, Engelbert M, Sondij S, Hartskeerl RA (2006) New Leptospira serovar Sokoine of serogroup Icterohaemorrhagiae from cattle in Tanzania. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 593–597.

Milas Z, Turk N, Starešina V, Margaletić J, Slavica A, Živković D, Modrić Z (2002) The role of myomorphous mammals as reservoirs of leptospira in the pedunculate oak forests of Croatia. Veterinarski arhiv 72: 119-129.

Modrić Z (1978) Prirodna i eksperimentalna leptospiroza u mačke, Doktorska disertacija, Zagreb, 1976, Izvadak disertacije. Veterinarski arhiv 48: 147-156.

Modrić Z, Herceg M, Ramadan P, Potočić M (1979) Leptospiroza u kooperativnom tovu teladi u okolici Zagreba. Veterinarski arhiv 49: 291-298.

Modrić Z, Bambir S, Sabočanec R (1981) Leptospiroza u domaće mačke (*Felis domestica* Briss.) u Baranji. Veterinarski arhiv 51: 167-173.

Modrić Z, Herceg M, Župančić Ž, Bambir S, Hahn V, Ramadan P (1985) Leptospiroza pasa u Zagrebu i okolici uzrokovana serološkim tipom icterohaemorrhagiae. Veterinarski arhiv 55: 93-102.

Modrić Z, Turk N, Artuković B, Matanović K, Starešina V, Baranton G (2006) Leptospiroza u prasadi uzrokovana s Leptospira interrogans sensu stricto serovar icterohaemorrhagiae. Hrvatski veterinarski vjesnik 29: 223-230.

Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2008) Proteomic Analysis of Leptospira interrogans Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. Infection and Immunity 76: 4952-4958.

Murphy K, Travers P, Walport M (2008) Janeway's immunobiology. 7th edn. Garland Science, New York

Murray B, Michaud R, White BN (1999) Allelic and haplotype variation of major histocompatibility complex class II DRB1 and DQB loci in the St Lawrence beluga (*Delphinapterus leucas*). Molecular Ecology 8: 1127-1139.

Naiman BM, Blumerman S, Alt D, Bolin CA, Brown R, Zuerner R, Baldwin CL (2002) Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1(+) gammadelta and CD4 T cells. Infection and Immunity 70: 6147–6157.

Nally JE, Timoney JF, Stevenson B (2001) Temperature-regulated protein synthesis by *Leptospira interrogans*. Infection and Immunity 69: 400–404.

Nally JE, Whitelegge JP, Aguilera R, Pereira MM, Blanco DR, Lovett MA (2005) Purification and proteomic analysis of outer membrane vesicles from a clinical isolate of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. Proteomics 5: 144-152.

Nascimento A, Ko AI, Martins EAL, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CFM, Leite LCC, Carrer H, Coutinho LL, Degrave WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MIT, Furlan LR, Gamberini M, Giglioti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MHS, Harakava R, Jerônimo SMB, Junqueira-de-Azevedo ILM, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EGM, Lemos MVF, Marino CL, Nunes LR, De Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJG, Ferro JA, Camargo LEA, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA (2004) Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insight into physiology and pathogenesis. Journal of Bacteriology 186: 2164-2172.

Nei M i Gojobori T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Molecular Biology and Evolution3: 418-426.

Newman D i Donahue M (2007) Equine Leptospirosis. Equine Disease Quarterly Kentucky 16: 4-5.

Nielsen JN, Armstrong CH, Nielsen NC (1989) Relationship among selected Leptospira interrogans serogroups as determined by nucleic acid hybridisation. Journal of Clinical Microbiology 27: 2724-2729.

Nikoljski, SN, Desjatov FM, Marčenko GF (1935) Raboti X plenuma Vashinil, Moskva. Sovjet. Veter. 10 (citirano iz Zaharija I, Fališevac J, Borčić B i Modrić Z(1982) Leptospiroze. 30- godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj, Jumena, JAZU, Zagreb)

Noguchi H (1918) Morphological characteristics and nomenclature of Leptospira (Spirochaeta) icterohaemorrhagiae (Inada i Ido). Journal of Experimental Medicine 27: 575-592 (citirano iz Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) Leptospira and leptospirosis. Second Edition, Medicine Science, Melbourne, Australia)

Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world, vol II. The Johns Hopkins University Press, Baltimore

Oakenfull EA i Clegg JB (1998) Phylogenetic relationships within the genus *Equus* and the evolution of α and β globin genes. Journal of Molecular Evolution 47:772–783.

Oakenfull EA, Lim HN, Ryder OA (2000) A survey of equid mitochondrial DNA: Implications for the evolution, genetic diversity and conservation of *Equus*. Conservation Genetics 1 (4): 341-355.

Ober C, Elias S, Kostyu DD, Hauck WW (1992) Decreased fecundability in Hutterite couples sharing HLA-DR. The American Journal of Human Genetics 50: 6–14.

Oliver MK, Piertney SB (2006) Isolation and characterization of a MHC class II DRB locus in the European water vole (*Arvicola Terrestris*). Immunigenetisc 58: 390-395**.**

Oliver MK, Lambin X, Cornulier T, Piertney SB (2009) Spatiotemporal variation in the strength and mode of selection acting on major histocompatibility complex diversity in water vole (*Arvicola terrestris*) metapopulations. Molecular Ecology 18: 80–92.

Orr HT, Lopez de Castro JA, Parham P, Ploegh HL, Strominger JL (1979) Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: location of putative alloantigenic sites. Proceedings of the National Academy of Sciences 76(9): 4395-4399.

Ozimec R, Marković D, Jeremić J (2011) Zelena knjiga izvornih pasmina Hrvatske. Kerschoffset d.o.o., Zagreb

Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N (2008) The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. International Journal of Infectious Diseases 12: 351-357.

Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CR (1991) Phylogenetic analysis of the spirochetes. Journal of Bacteriology 173: 6101–6109.

Penn DJ i Potts WK (1999) The evolution of mating preference and major histocompatibility complex genes. The American Naturalist 153: 145–164.

Pérolat P, Grimont F, Regnault B, Grimont PAD, Fournie E, Thevenet H, Baranton G (1990) rRNA gene restriction patterns of Leptospira: a molecular typing system. Research in Microbiology 141: 159-171.

Pérolat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billinghurst ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS (1998) *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. International journal of systematic bacteriology 48: 851–858.

Piertney SB i Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the majorhistocompatibility complex. Heredity 96: 7–21.

Pillot J i Ryter A (1965) Structures des spirohetes. Etude des genres Treponema, Borrelia et Leptospira au microscope électronique. Analles de l`Institut Pasteur (Paris) 108: 791-804.

Piontkivska H i Nei M (2003) Birth-and-death evolution in primate MHC class I genes: divergence time estimates. Molecular Biology and Evolution 20: 601–609.

Potts WK i Wakeland EK (1990) Evolution of diversity at the major histocompatibility complex. Trends in Ecology and Evolution 5: 181–186.

Potts WK, Manning CJ, Wakeland EK (1991) Mating patterns in seminatural populations of mice influenced by MHC genotype. Nature 352: 619–621.

Radl C, Müller M, Revilla-Fernandez S, Karner-Zuser S, De Martin A, Schauer U, Karner F, Stanek G, Balcke P, Hallas A, Frank H, Fürnschlief A, Erhart F, Allerberger F (2011) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. Wiener klinische Wochenschrift. Volume 123:751-755.

Radović J, Čivić K, Topić R, Posavec-Vukelić V (2009) Biološka raznolikost Hrvatske. Drugo izmjenjeno izdanje, mtg-topgraf d.o.o., Velika Gorica

Reed DH i Frankham R (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity. Conservation Biology 17: 230–237.

Reilly GAC, Baillie NC, Morrow WT, McDowell J, Ellis WA (1994) Feline stillbirths associated with mixed *Salmonella typhimurium* and leptospira infection. Veterinary Record 135: 608.

Ren SX, Fu G, Jiang XG, Zeng R, Miao YG, Xu H, Zhang YX, Xiong H, Lu G, Lu LF, Jiang HQ , Jia J, Tu YF, Jiang JX, Gu WY, Zhang YQ, Cai Z, Sheng HH, Yin HF, Zhang Y, Zhu GF, Wan M, Huang HL, Qian Z, Wang SY, Ma W, Yao ZJ, Shen Y, Qiang BQ, Xia QC, Guo XK, Danchin A, Saint Girons I,Somerville RL, Wen YM, Shi MH, Chen Z, Xu JG, Zhao GP (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. Nature 422: 888–893.

Reusch TBH, Haberli MA, Aeschlimann B, Milinski M (2001) Female sticklebacks count alleles in a strategy of sexual selection explaining MHC polymorphism. Nature 414: 300–302.

Richman A (2000) Evolution of balanced genetic polymorphism. Molecular Ecology 9: 1953-1963.

Ristow P, Bourhy P, Kerneis S, Schmitt C, Prevost MC, Lilenbaum W, Picardeau M (2008) Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. Microbiology 154: 1309–1317.

R Development Core Team (2014) R: A Languageand Environment for Statistical Comput-Ing Ver. 3.0.3 (Window 64 bit). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, (http://www.R-project.org).

Schwensow N, Dausmann K, Eberle M, Fietz J, Sommer S (2010) Functional associations of similar MHC alleles and shared parasite species in two sympatric lemurs. Infection, Genetics and Evolution 10: 662-668.

Shekatkar S, Acharya NS, Harish BN, Parija SC (2010) Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of leptospirosis. Indian Journal of Medical Microbiology 28: 238-40.

Slack A, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2006) Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. BMC Microbiology 6: 95-95.

Slack AT, Galloway RL, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2009) Reclassification of *Leptospira meyeri* serovar Perameles to *Leptospira interrogans* serovar Perameles through serological and molecular analysis: evidence of a need for changes to current procedures in Leptospira taxonomy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 1199–1203.

Snell GD (1951) A fifth allele at the histocompatibility-2 locus of the mouse as determined by tumor transplantation. Journal of the National Cancer Institute 11: 1299-305.

Snell GD i Higgins GF (1951) Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. Genetics 36: 306-310.

Sommer S (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. Frontiers in Zoology 2: 1-18.

Spurgin LG i Richardson DS (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 277(1684): 979-988.

Stimson AM (1907) Note on an organism found in yellow-fever tissue. Public Health Reports 22: 541-541.

Stites DP, Stobo JD, Wells JV (1989) Osnovna i klinička imunologija. Savremena administracija, Beograd

Štritof Majetić Z, Habuš J, Milas Z, Mojčec Perko V, Starešina V, Turk N (2012) A serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease. Veterinarski arhiv 82: 183-191.

Takada T, Kikkawa Y, Yonekawa H, Amano T (1998) Analysis of goat MHC class II DRA and DRB genes: identification of the expressed gene and new DRB alleles. Immunogenetics. 48(6): 408-12.

Takahata N i Nei M (1990) Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. Genetics 124: 967-978.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaiboon R, Apiwatanaport A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White N, Feil EJ, Day NPJ, Peacock SJ (2007) A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. PLOS Neglected Tropical Diseases 1: 56-56.

Thomas DD i Higbie LM (1990) In vitro association of leptospires with host cells. Infection and Immunity 58: 581–585.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

Trowsdale J (2002) The gentle art of gene arrangement: the meaning of gene clusters. Genome Biology 3: 2002.1–2002.5.

Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D (2004) Cell aggregation: a mechanism of pathogenic Leptospira to survive in fresh water. International Microbiology 7: 35–40.

Tseng CT, Miller D, Cassano J, Bailey E, Antczak DF (2010) Identification of equine major histocompatibility complex haplotypes using polymorphic microsatellites. Animal Genetics 41(Supplement 2): 150–153.

Turk N, Milas Z, Margaletić J, Starešina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, Bellenger E, Baranton G, Postic D (2003) Molecular characterisation of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. Epidemiology & Infection 130: 159-166.

Turk N, Milas Z, Habuš J, Štritof Majetić Z, Mojčec Perko V, Barbić LJ, Stevanović V, Perharić M, Starešina V (2013) Equine leptospirosis in Croatia - occurrence of subclinical infections and abortions. Veterinarski Arhiv 83: 253-262.

Uhlenhuth P i Fromme W (1915) Experimentelle Untersuchungen über die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht). Medizinische Klinik 44: 1202-1203.

Van Der Hoeden J (1953) Leptospirosis among goats in Israel. Journal of Comparative Pathology 63-101.

Verma A, Matsunaga J, Artiushin S, Pinne M, Houwers DJ, Haake DA, Stevenson B, Timoney JF (2012) Antibodies to a novel leptospiral protein, LruC, in the eye fluids and sera of horses with Leptospira-associated uveitis. Clinical and Vaccine Immunology 19: 452-456.

Wagner JL, Burnett RC, Storb R (1999): Organization of the canine major histocompatibility complex: current perspectives. Journal of Heredity 90: 35-38.

Weil A (1886) Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende akute Infektionskrankheit. Deutsches Archiv Klinik Medizinische 39: 209-232.

Wild CJ, Greenlee JJ, Bolin CA, Barnett JK, Haake AD, Cheville NF (2002) An Improved Immunohistochemical Diagnostic Technique for Canine Leptospirosis using antileptospiral Antibodies on Renal Tissue. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 14: 20-20.

Williams D, Smith B, Donahue J, Poonacha K (1994) Serological and microbiological findings on 3 farms with equine leptospiral abortions. Equine Veterinary Journal 26: 105-108.

Williamson P, Nicholas FW, Stewart GJ (1989) Restriction fragment length polymorphism analysis of dog class II major histocompatibility complex genes. Transplantation Proceedings 21: 3751–3752.

Wirth D (1937) Die Leptospirose bei Tieren. Wiener klinische Wochenschrift 1115.

Woese CR (1987) Bacterial evolution. Microbiological Reviews 51: 221-271.

Wolanke B, Gerhards H, Brem S, Kopp H, Meyer P (1998) Intraokulare und Serumantikörpertiter gegen Leptospiren bei 150 wegen equiner rezidivierender Uveitis (ERU) vitrektomierten Pferden. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 111: 134–139.

Wood JLN (1994) How important are leptospiral infections as a cause of equine disease? Equine Veterinary Journal 26(2): 88-88.

Zaharija I (1953) Leptospira pomona u konja ustanovljena godine 1951. u Hrvatskoj. Veterinarski Arhiv 23: 297-297.

Zaharija I (1954) Sojevi L. canicola izolirani iz pasa u Zagrebu (Hrvatska). Veterinarski arhiv 24: 13-24.

Zaharija I (1955) Leptospiroza u teladi utvrđena u Hrvatskoj Veterinarski arhiv 25: 273-274.

Zaharija I (1968) Mikromamalija Hrvatske - rezervoari leptospira. Zbornik radova III naučnog sastanka infektologa Jugoslavije, Portorož,1968, Partizanska knjiga, Ljubljana (citirano iz Zaharija I, Fališevac J, Borčić B, Modrić Z (1982) Leptospiroze - 30 - godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. Jumena, JAZU, Zagreb, Hrvatska)

Zaharija I i Modrić Z (1971) Istraživanje leptospiroze životinja u Hrvatskoj. XI Kliconoštvo leptospira u klinički zdravih goveda. Veterinarski arhiv 41: 305-311.

Zaharija I, Fališevac J, Borčić B, Modrić Z (1982) Leptospiroze. 30 - godišnje istraživanje i izučavanje u SR Hrvatskoj. Jumena, JAZU, Zagreb

Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA (1976) Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. Journal of Experimental Medicine 144: 1324–1335.

Yang, Z (2007) PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Molecular Biology and Evolution 24: 1586-1591.

Yasuda PH, Steigerwalt AG, Sulzer KR, Kaufmann AF, Rogers F, Brenner DJ (1987) Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with proposals for seven new *Leptospira* species. International journal of systematic bacteriology 37: 407-415.

Yuhki N, Beck T, Stephens RM, Nishigaki Y, Newmann K, O'Brien SJ (2003) Comparative genome organization of human, murine, and feline MHC class II region. Genome Research 13(6): 1169–1179.

8. PRILOZI

Prilog 1. Podatci o istraživanim jedinkama.

DNA_broj	*Ime životinje*	*Pasmina*	*Starost*	*Spol*	*Mjesto*	*Rezultat serološke pretrage (MAT)*	*DRA_1*	*DRA_2*	*DRB_1*	*DRB_2*
3.	Sokol	HT	1,5	M	Đakovo	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
4.	Elza	lipicanac	14	F	Đakovo	Grpth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*13	Eqca-DRB*13
6.	Zorka	poni	8	F	Požega	Can 1:100, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0501	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
7.	Apolo Krabe	HT		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
8.	Munja 32	HH		M	Županja	Grpth 1:3200, Bra 1:200, Icth 1:100	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
9.	Sokol	HH		M	Đakovo	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
10.	Rubin	HH	7	M	Vrbovsko	Can 1:100, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*07	Eqca-DRB*04
11.	Pluto Montenegra	HH		M	Županja	Can 1:200, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
12.	Liza 56	HH		F	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
14.	Tayson	shetl_poni	3	M	Vrbovsko	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
15.	Kosan	HT	3	M	Požega	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
16.	Trofeta	lipicanac	11	M	Požega	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
17.	Pluto Mara	HH		M	Županja	Can 1:200, Icth 1:51200	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
18.	Cony	HT	5	F	Varaždin	Grpth 1:800, Pom 1:3200, Can 1:100, Icth 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
19.	Rapsi	HT	7	M	Ludbreg	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
20.	Duksi	poni	5	M	Pleternica	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
21.	Vilma	HT		F	Koprivnica	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0501	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
22.	Roki	HT	2	M	Ludbreg	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
23.	Zora	HH	2,5	F	Požega	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
24.	Luna	HT		F	Koprivnica	Bra 1:50, Can 1:400, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
25.	Sokol	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
26.	Cvitko	HH		M	Županja	Grpth 1:1600, Icth 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04

27.	Vilma Krabe	HH		F	Županja	Can 1:200, Icth 1:1600	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
30.	Napolitana Gaetana	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
31.	Beba	HH	6	F	Ozalj	Grpth 1:400, Bra 1:100, Pom 1:6400, Icth 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
32.	Dona	HT	8	F	Koprivnica	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
35.	Zenta 959	HH		M	Županja	Grpth 1:800, Pom 1:1600, Can 1:50, Icth 1:400	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
37.	Elza	HH		F	Županja	Grpth 1:400, Sej 1:100, Can 1:200, Icth 1:6400, Pom 1:200	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
39.	Bela_omica	HH	3	F	Ozalj	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
40.	Munja 447	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
41.	Siglavi Zenta	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
42.	Munja 752	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
43.	Pastuh 410	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
44.	Alegra	HH		F	Županja	Bra 1:6400, Pom 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
45.	Amor	HT		M	Križevci	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
46.	Karla	HT		F	Duga Resa	Bra 1:1600, Icth 1:100	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
47.	Rubin	križani	2	M	Požega	Grpth 1:200, Pom 1:800, Icth 1:6400	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
48.	Mila	HT	4	F	Ludbreg	Grpth 1:800, Pom 1:3200, Can 1:100, Icth 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
51.	Munja 137	HH	3	F	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
52.	Munja 555	HH		M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
53.	Gilda	poni	16	F	Požega	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0501	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
54.	Vihor	HT	7	M	Požega	Grpth 1:800, Bra 1:400, Pom 1:12800	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
56.	Converzano Elza	HH	3	M	Županja	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
57.	Zora	HH		F	Križevci	Bra 1:400, Pom 1:1600, Icth 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
58.	Gajtan	HH	2	F	Županja	Bra 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
59.	Kefir	HT	14	M	Ludbreg	Pom 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11

60.	Zuja	HH	3	F	Veliki Grdevac	Pom 1:1600	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
62.	Flayer	HT		M	Duga Resa	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
64.	Zenta	HH	7	F	Požega	Pom 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
66.	Inka	arapski konj	9	F	Vrbovsko	Grpth 1:100, Bra 1:100, Pom 1:12800	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
67.	Lisa	HT	3	F	Veliki Grdevac	Pom 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
68.	Dora	poni	6	F	Ludbreg	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
69.	Mirza	HP	10	F	Ludbreg	Grpth 1:6400, Bra 1:400, Pom 1:200, Can 1:100, Icth 1:800	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
70.	Fred	HT	17	M	Varaždin	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
71.	Brnjo	HH	3	M	Veliki Pašijan	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
72.	Zeka	HH	3	F	Veliki Pašijan	Grpth 1:400, Pom 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
73.	Marina	HT	15	F	Daruvar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
74.	Olympia	HH	13	F	Daruvar	Grpth 1:400, Pom 1:1600, Icht 1:400	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
75.	Lana	HH	3	F	Veliki Pašijan	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*10
76.	Faraon	HT	2	M	Bjelovar	Grpth 1:3200, Bra 1:100, Pom 1:800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
77.	Madhavi	HT	2,5	M	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
78.	Maja	HH	5	F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
79.	Karla	HT	2	F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
80.	Maza	HH		F	Velika Pisanica	Grpth 1:200, Pom 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
81.	Zoran	HH		M	Velika Pisanica	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
82.	Cvetko	HH	2	M	Bjelovar	Pom 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
83.	Rina	HH	4	F	Bjelovar	Grpth 1:1600, Bra 1:800, Pom 1:400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*07
85.	Mimi	HH	7	F	Ivanska	Pom 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*08	Eqca-DRB*04
86.	Kraljica Kunti	HT	11	F	Bjelovar	Grpth 1:50, Sej 1:100, Pom 1:1600, Sax 1:50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
87.	Suza	HH		F	Koprivnica	Grpth 1:1600, Bra 1:400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*10

88.	G 2480	HH		F	Rovišče	Bra 1:200, Pom 1:800, Grpth 1:3200, Icth 1:50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
89.	Princeza	HH		F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
90.	Sultan	HH	3	M	Veliki Pašijan	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
95.	Mrka	HH	1,5	F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
97.	Astra	HT	6	F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
98.	Lasta	HP	3	F	Ivanska	Grpth 1:200, Bra 1:400, Pom 1:3200, Icth 1:51200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
100.	Reiffeisen	HT	7	M	Bjelovar	Grpth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
101.	Toplica 918	HH	10	F	Babina Greda	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
103.	Gilda	HT	14	F	Bjelovar	Grpth 1:200, Pom 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
104.	Pastuh	HH	2	M	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
106.	Hungaro	HH		F	Velika Pisanica	Grpth 1:1600, Bra 1:100, Icth 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
107.	Azra	HH	2	F	Ivanska	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
109.	Princ Casper	HT		M	Koprivnica	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
110.	Hana	HT		F	Koprivnica	Can 1:200, Icth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*14	Eqca-DRB*14
111.	Cvetko	HH	5	M	Orahovica	Grpth 1:100, Sej 1:800, Bra 1: 400, Pom 1:800, Can 1:400, Icth 1:12800, Sax 1:200, Bat 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
112.	Roki	HH		M	Orahovica	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
113.	Ida	lipicanac	5,5	F	Konjščina	Grpth 1:51200, Bra 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
114.	Alhambra	HT	10	F	Koprivnica	Grpth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
115.	Wolf	HT	14	M	Pula	Bra 1:3200	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
116.	Niki	HT	12	F	Pula	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
121.	Bambi	poni	15	M	Zagreb	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*14	Eqca-DRB*14
122.	Zuja	HH	4	F	Sesvete	Grpth 1:50, Sej 1:200, Pom 1:100, Can 1:200, Icth 1:1600, Sax 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
123.	Ivica	poni	4	M	Sesvete	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*14	Eqca-DRB*14
126.	Rubis	HH	3	M	Sesvete	Grpth 1: 1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04

129.	Batosta 792	HT		M	Đakovo	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
131.	Lala	HH		F	Pakrac	Grpth 1:3200, Sej 1:100, Icth 1:400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
132.	Elton	HT		M	Lipik	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
134.	Santa 900	HT		M	Đakovo	Grpth 1:6400, Icth 1:400	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
135.	Meli	HT	7	F	Karlovac	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
137.	Chasmir	HT	23	M	Dubrava	Bra 1:400, Pom 1:100, Can 1:800, Icth 1:12800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
138.	Bela	HT	2	F	Duga Resa	Grpth 1:1600, Bra 1:800, Pom 1:12800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
139.	Fabian	HT	16	M	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
140.	Tarzan	HH		M	Sesvete	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
141.	Ruthe Kids Hot	HT		M	Slatina	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*14	Eqca-DRB*14
142.	Negrita	HT	12	F	Slatina	Bra 1:3200, Can 1:100, Icth 1:800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201		
144.	Anastasia	HT	4	F	Oroslavje	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
146.	Ambra	arapski konj	5	M	Vinkovci	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*10	Eqca-DRB*10
149.	Rafael	HT	2	M	Oroslavje	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
150.	Amona	HT	3	F	Oroslavje	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
152.	K_276	HT		M	Lipik	Grpth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
153.	K_18	HT		M	Lipik	Grpth 1:1600	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
154.	K_250	HT		M	Lipik	Grpth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
155.	K_399	HT		M	Lipik	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
157.	Antonino	HT	12	M	Zagreb	Pom 1:100, Can 1:800, Icth 1:12800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
158.	K_411	HT		M	Lipik	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
159.	K_404	HT		M	Lipik	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
160.	Axel	HT	3	M	Oroslavje	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
161.	Finesa	HSK		F	Bjelovar	Titar protutijela;< 50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04

162.	Gabna	HT	6	F	Križevci	Grpth 1:1600, Icth 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
163.	Cuca	HH	7	F	Bjelovar	Grtph 1:400, Sej 1:200, Pom 1:3200, Icth 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
164.	Azra	HT	4	F	Bjelovar	Grpth 1:800, Pom 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
166.	Cincila	HT		F	Karlovac	Grpth 1:3200, Pom 1:800, Can 1:400, Icth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
167.	Fantazija	HT		F	Karlovac	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
169.	Pluto Munja	lipicanac	4	M	Lužani	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
170.	Munja 321	lipicanac	7	F	Lužani	Grpth 1:1600, Pom 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
171.	Mima	HH		F	Lužani	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
172.	Maestoso Trofeta	HH		M	Lužani	Sej 1:1600, Sax 1:400	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
173.	Sabra	HT	15	F	Čakovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
174.	Astra	HT	7	F	Čakovec	Grpth 1:12800, Icth 1:400	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
175.	Ribica	HH	4	F	Oroslavje	Grpth 1:25600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
176.	Vinet	HH	7	F	Krapina	Grpth 1:100, Pom 1:6400, Icth 1:100	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
178.	Charry B	HSK	1,5	F	Vinkovci	Icth 1:1600	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*09	Eqca-DRB*09
179.	Krabe 365	lipicanac	23	M	Vinkovci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*09
181.	Vilma	HP		F	Tordinci	Bra 1:3200, Pom 1:200, Icth 1:800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
182.	Vita	HH		F	Tordinci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
183.	Lara	HP		F	Tordinci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
184.	Mirn IV H560	HH		M	Vinkovci	Grpth 1:1600, Sej 1:400, Bra 1:200, Sax 1:100	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
185.	Atila	HT		M	Samobor	Bra 1:1600	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
186.	Zeus	HT	6	M	Samobor	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
187.	Marjana	HH	2	F	Oborovo	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*14	Eqca-DRB*14
188.	Stefina	HP	3,5	F	Oborovo	Bra 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
192.	Mica	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12

193.	Vidra	HH		F	Vrbovec	Aus 1:400, Bra 1:1600, Icth 1:800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
194.	Ciba	HH		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
195.	Ricka	HH		F	Vrbovec	Grpth 1:800, Aus 1:200, Bra 1:3200, Icth 1:400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
196.	Rida	HP	13	F	Vrbovec	Aus 1:400, Bra 1:3200, Can 1:200, Icth 1:400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
197.	Mrka	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
198.	Šara	HH		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
199.	Zora	HH	20	F	Vrbovec	Sej 1:200, Aus 1:400, Bra 1:3200, Icth 1:100, Sax 1:100	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
200.	Tinda	HH		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
201.	Vidra	HH	4	F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
202.	Masa	HH		F	Vrbovec	Aus 1:800, Bra 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
203.	Ricko	HP	1	M	Vrbovec	Sej 1:100, Aus 1:800, Bra 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
204.	Linda	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
207.	Vranka	HP		F	Vrbovec	Aus 1:3200, Bra 1:12800	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
208.	Iskra	HH		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
209.	Cenda	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
211.	Shadow	HT	4	F	Beli Manastir	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
212.	Wishky	HT	9	M	Beli Manastir	Bra 1:3200, Can 1:200, Icth 1:800	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
213.	Lila	HP	10	F	Vrbovec	Sej 1:800, Aus 1:400, Bra 1:3200, Icth 1:100, Sax 1:100	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
214.	Rosita	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
215.	Miša	HH	4	F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
216.	Panco	HP	1	M	Vrbovec	Aus 1:100, Bra 1:3200	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
218.	7 Drina VIII	lipicanac	15	F	Vinkovci	Bra 1:1600	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
219.	Ruža	HP		F	Vrbovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
220.	Cvetko	HP	1	M	Vrbovec	Aus 1:800, Bra 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12

221.	834 Mira VI	HT	13	F	Vinkovci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101		
222.	Ponita	HT	11	F	Vinkovci	Grpth 1:400, Bra 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0501	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
223.	Nera	HT	13	F	Split	Grpth 1:400, Sej 1:400, Bra 1:3200, Can 1:100, Icth 1:400, Sax 1:200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
224.	Rain	HT	4	F	Split	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*05	Eqca-DRB*05
225.	Gimmli	shetl_poni	6	M	Vukovar	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0501	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
226.	Picollo	shetl_poni	6	M	Vukovar	Bra 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*12	Eqca-DRB*12
229.	Farka	HP	7	F	Pleternica	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
230.	Lara	HP	2	F	Pleternica	Can 1:400, Icth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
231.	Jack	HT	24	M	Zagreb	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*07	Eqca-DRB*06
232.	Anonimo	HT	11	M	Zagreb	Bra 1:400, Can 1:400, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
233.	Delarosse	HT	9	F	Čakovec	Can 1:800, Icth 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
234.	El Cador Pasa	HT	2	M	Čakovec	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
235.	Rambo	HT	7	M	Dugo Selo	Pom 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
237.	Lasta	HH	1,5	F	Konjščina	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0401	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
238.	Linda	HP		F	Mali Zdenci	Sej 1:400, Bra 1:3200, Pom 1:400, Can 1:409600, Icth 1:819200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*06
239.	Lisa	HP		F	Mali Zdenci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
241.	Lakrima	HSK	7	F	Križevci	Can 1:400, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
244.	Bony	HT	8	F	Labin	Bra 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*06	Eqca-DRB*06
247.	Vihor	HT		M	Bjelovar	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
250.	Etolile	HT	9	F	Zagreb	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11
251.	Saratoga	HT	7	F	Zagreb	Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
253.	Ines	HH	7	F	Lužani	Grpth 1:1600, Aus 1:200, Bra 1:800, Can 1:800, Icth 1:6400	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*04	Eqca-DRB*04
254.	Marta	HT	13	F	Bjelovar	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
255.	Tigra	HT	14	F	Bjelovar	Can 1:800, Icth 1:3200	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		

256.	Latino	HT	2	M	Križevci	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*01
257.	Ledy	HT	3	F	Križevci	Can 1:400, Icth 1:1600	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*01	Eqca-DRB*14
258.	Veco	arapski konj	1,5	M	Pleternica	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
259.	Iskra	HT	15	F	Požega	Grpth 1:1600, Pom 1:12800	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*04
260.	LeilAH	arapski konj	4	F	Pleternica	Bra 1:1600, Pom 1:800, Icth 1:50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
261.	Lila	HT	2	F	Požega	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*06
262.	Duki	HT	12	M	Labin	Pom 1:1600	Eqca-DRA*0301	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*03	Eqca-DRB*03
263.	Megi	HT	8	F	Labin	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0101		
264.	Gina	HT		F	Daruvar	Grpth 1:1600, Pom 1:800, Icth 1:50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*02	Eqca-DRB*02
265.	Dorea	HT	12	F	Daruvar	Titar protutijela;<50	Eqca-DRA*0101	Eqca-DRA*0201	Eqca-DRB*11	Eqca-DRB*11

Skraćenice:

Pasmine konja: HP- hrvatski posavac, HH- hrvatski hladnokrvnjak, HSK- hrvatski sportski konj, HT- hrvatski toplokrvnjak, shetl. poni- shetlandski poni

Serovari leptospira: Grpth- Grippotyphosa, Sej- Sejroe, Sax- Saxkoebing, Icth- Icterohaemorrhagiae, Can- Canicola, Bra- Bratislava, Aus- Australis, Pom- Pomona

Prilog 2. Rezultati združenosti među pojedinim kategorijama i varijablama.

pasmina	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
araber					
mje=Pleternica	40.00	50.00	2.50	**0.0029846**	2.969
DRB_1=Eqca-DRB*10	100.00	25.00	0.50	**0.02**	2.326
DRA_1=Eqca-DRA*0301	7.14	75.00	21.00	**0.0315019**	2.151
HH					
mje=Županja	95.00	26.39	10.00	**9.728E-09**	5.735
mje=Veliki Pašijan	100.00	5.56	2.00	**0.0159046**	2.411
DRB_2=Eqca-DRB*04	51.28	27.78	19.50	**0.0312539**	2.154
mje=Velika Pisanica	100.00	4.17	1.50	**0.0454089**	2.001
mje=Lipik	0.00	0.00	3.50	**0.041388**	-2.040
DRB_2=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0023969**	-3.036
DRB_1=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0023969**	-3.036
HP					
mje=Vrbovec	52.17	57.14	11.50	**4.084E-08**	5.487
Aust=Aust	54.55	28.57	5.50	**0.0002284**	3.685
Brat=Brat	23.91	52.38	23.00	**0.0021847**	3.064
DRA_2=Eqca-DRA*0101	14.18	95.24	70.50	**0.0049149**	2.813
DRB_2=Eqca-DRB*12	50.00	19.05	4.00	**0.0052187**	2.793
DRB_1=Eqca-DRB*12	50.00	19.05	4.00	**0.0052187**	2.793
spol=F	15.13	85.71	59.50	**0.0083033**	2.639
DRB_HH=Hom	13.79	95.24	72.50	**0.0084995**	2.632
mje=Mali Zdenci	100.00	9.52	1.00	**0.0105528**	2.557
mje=Tordinci	66.67	9.52	1.50	**0.0306457**	2.162
DRA_1=Eqca-DRA*0301	2.38	4.76	21.00	**0.0439027**	-2.015
DRB_HH=Het	1.82	4.76	27.50	**0.0084995**	-2.632
spol=M	3.70	14.29	40.50	**0.0083033**	-2.639
DRB_2=Eqca-DRB*04	0.00	0.00	19.50	**0.0079796**	-2.653
DRA_2=Eqca-DRA*0201	0.00	0.00	21.50	**0.0045365**	-2.838
Brat=not.Brat	6.49	47.62	77.00	**0.0021847**	-3.064
Aust=not.Aust	7.94	71.43	94.50	**0.0002284**	-3.685
HSK					
DRB_1=Eqca-DRB*09	100.00	33.33	0.50	**0.015**	2.432
DRB_2=Eqca-DRB*09	50.00	33.33	1.00	**0.03**	2.170
HT					
DRB_2=Eqca-DRB*11	81.25	15.66	8.00	**0.0010431**	3.279
DRB_1=Eqca-DRB*11	81.25	15.66	8.00	**0.0010431**	3.279
mje=Lipik	100.00	8.43	3.50	**0.0018179**	3.118
Aust=not.Aust	43.92	100.00	94.50	**0.0022374**	3.057

mje=Koprivnica	85.71	7.23	3.50	**0.0229718**	2.274
mje=Čakovec	100.00	4.82	2.00	**0.0284088**	2.192
Sejr=not.Sejr	43.32	97.59	93.50	**0.0492333**	1.967
Sejr=Sejr	15.38	2.41	6.50	**0.0492333**	-1.967
DRB_2=Eqca-DRB*12	0.00	0.00	4.00	**0.0123764**	-2.501
DRB_1=Eqca-DRB*12	0.00	0.00	4.00	**0.0123764**	-2.501
Aust=Aust	0.00	0.00	5.50	**0.0022374**	-3.057
mje=Županja	5.00	1.20	10.00	**0.0001991**	-3.720
mje=Vrbovec lipicanac	4.35	1.20	11.50	**3.583E-05**	-4.133
mje=Lužani	40.00	28.57	2.50	**0.0102863**	2.566
DRB_HH=Het	9.09	71.43	27.50	**0.0197606**	2.331
mje=Vinkovci	28.57	28.57	3.50	**0.0212285**	2.304
DRB_2=Eqca-DRB*13	100.00	14.29	0.50	**0.035**	2.108
DRB_1=Eqca-DRB*13	100.00	14.29	0.50	**0.035**	2.108
DRB_HH=Hom	1.38	28.57	72.50	**0.0197606**	-2.331
poni					
DRA_1=Eqca-DRA*0501	50.00	33.33	2.00	**0.0044617**	2.844
DRB_1=Eqca-DRB*14	40.00	33.33	2.50	**0.0073854**	2.679
DRB_2=Eqca-DRB*14	33.33	33.33	3.00	**0.011002**	2.543
mje=Požega	20.00	33.33	5.00	**0.0320935**	2.143
shetl_poni					
mje=Vukovar	100.00	66.67	1.00	**0.0001508**	3.790
mje=Vrbovsko	33.33	33.33	1.50	**0.0449992**	2.005

spol	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
MUŽJACI					
mje=Lipik	100.00	8.64	3.50	**0.0015225**	3.1704
Icth=not.Icth	46.58	83.95	73.00	**0.0037779**	2.8961
DRA_1=Eqca-DRA*0301	59.52	30.86	21.00	**0.0056972**	2.7647
mje=Zupanja	70.00	17.28	10.00	**0.0061431**	2.7400
serum=NEG	49.00	60.49	50.00	**0.015119**	2.4295
Pom=not.Pom	44.59	86.42	78.50	**0.0242751**	2.2527
Grpth=not.Grpth	44.97	82.72	74.50	**0.0279614**	2.1978
Grpth=Grpth	28.00	17.28	25.00	**0.0379715**	-2.0752
DRA_2=Eqca-DRA*0101	35.46	61.73	70.50	**0.0272343**	-2.2081
Pom=Pom	25.58	13.58	21.50	**0.0242751**	-2.2527
mje=Vrbovec	17.39	4.94	11.50	**0.0151533**	-2.4287
serum=POZ	32.00	39.51	50.00	**0.015119**	-2.4295
DRB_2=NN	7.69	1.23	6.50	**0.0104699**	-2.5599
DRB_1=NN	7.69	1.23	6.50	**0.0104699**	-2.5599
pas=HP	14.29	3.70	10.50	**0.0083033**	-2.6395

DRA_1=Eqca-DRA*0101	33.33	54.32	66.00	**0.0045688**	-2.8360
Icth=Icth	24.07	16.05	27.00	**0.0037779**	-2.8961
ŽENKE					
Icth=Icth	75.93	34.45	27.00	**0.0037779**	2.8961
DRA_1=Eqca-DRA*0101	66.67	73.95	66.00	**0.0045688**	2.8360
pas=HP	85.71	15.13	10.50	**0.0083033**	2.6395
DRB_2=NN	92.31	10.08	6.50	**0.0104699**	2.5599
DRB_1=NN	92.31	10.08	6.50	**0.0104699**	2.5599
serum=POZ	68.00	57.14	50.00	**0.015119**	2.4295
mje=Vrbovec	82.61	15.97	11.50	**0.0151533**	2.4287
Pom=Pom	74.42	26.89	21.50	**0.0242751**	2.2527
DRA_2=Eqca-DRA*0101	64.54	76.47	70.50	**0.0272343**	2.2081
Grpth=Grpth	72.00	30.25	25.00	**0.0379715**	2.0752
Grpth=not.Grpth	55.03	68.91	74.50	**0.0279614**	-2.1978
Pom=not.Pom	55.41	73.11	78.50	**0.0242751**	-2.2527
serum=NEG	51.00	42.86	50.00	**0.015119**	-2.4295
mje=Zupanja	30.00	5.04	10.00	**0.0061431**	-2.7400
DRA_1=Eqca-DRA*0301	40.48	14.29	21.00	**0.0056972**	-2.7647
Icth=not.Icth	53.42	65.55	73.00	**0.0037779**	-2.8961
mje=Lipik	0.00	0.00	3.50	**0.0015225**	-3.1704

serum	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
POZ					
Icth=Icth	100.00	54.00	27.00	**2.527E-21**	9.5E+00
Grpth=Grpth	100.00	50.00	25.00	**2.223E-19**	9.0E+00
Brat=Brat	100.00	46.00	23.00	**1.584E-17**	8.5E+00
Pom=Pom	100.00	43.00	21.50	**3.425E-16**	8.2E+00
Cani=Cani	100.00	29.00	14.50	**1.727E-10**	6.4E+00
Sejr=Sejr	100.00	13.00	6.50	**8.05E-05**	3.9E+00
Aust=Aust	100.00	11.00	5.50	**0.0003652**	3.6E+00
Saxk=Saxk	100.00	8.00	4.00	**0.0033773**	2.9E+00
spol=F	57.14	68.00	59.50	**0.015119**	2.4E+00
spol=M	39.51	32.00	40.50	**0.015119**	-2.4E+00
Saxk=not.Saxk	47.92	92.00	96.00	**0.0033773**	-2.9E+00
Aust=not.Aust	47.09	89.00	94.50	**0.0003652**	-3.6E+00
Sejr=not.Sejr	46.52	87.00	93.50	**8.05E-05**	-3.9E+00
Cani=not.Cani	41.52	71.00	85.50	**1.727E-10**	-6.4E+00
Pom=not.Pom	36.31	57.00	78.50	**3.425E-16**	-8.2E+00
Brat=not.Brat	35.06	54.00	77.00	**1.584E-17**	-8.5E+00

Grpth=not.Grpth	33.56	50.00	74.50	**7.706E-18**	-8.6E+00
Icth=not.Icth	31.51	46.00	73.00	**2.527E-21**	-9.5E+00
NEG					
Icth=not.Icth	68.49	100.00	73.00	**2.527E-21**	9.48E+00
Grpth=not.Grpth	66.44	99.00	74.50	**7.706E-18**	8.60E+00
Brat=not.Brat	64.94	100.00	77.00	**1.584E-17**	8.52E+00
Pom=not.Pom	63.69	100.00	78.50	**3.425E-16**	8.16E+00
Cani=not.Cani	58.48	100.00	85.50	**1.727E-10**	6.38E+00
Sejr=not.Sejr	53.48	100.00	93.50	**8.05E-05**	3.94E+00
Aust=not.Aust	52.91	100.00	94.50	**0.0003652**	3.56E+00
Saxk=not.Saxk	52.08	100.00	96.00	**0.0033773**	2.93E+00
spol=M	60.49	49.00	40.50	**0.015119**	2.43E+00
spol=F	42.86	51.00	59.50	**0.015119**	-2.43E+00
Saxk=Saxk	0.00	0.00	4.00	**0.0033773**	-2.93E+00
Aust=Aust	0.00	0.00	5.50	**0.0003652**	-3.56E+00
Sejr=Sejr	0.00	0.00	6.50	**8.05E-05**	-3.94E+00
Cani=Cani	0.00	0.00	14.50	**1.727E-10**	-6.38E+00
Pom=Pom	0.00	0.00	21.50	**3.425E-16**	-8.16E+00
Brat=Brat	0.00	0.00	23.00	**1.584E-17**	-8.52E+00
Grpth=Grpth	0.00	0.00	25.00	**2.223E-19**	-9.00E+00
Icth=Icth	0.00	0.00	27.00	**2.527E-21**	-9.48E+00

Grpth	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Grpth pozitivno					
serum=POZ	50.00	100.00	50.00	**2.223E-19**	9.0016764
Pom=Pom	65.12	56.00	21.50	**1.528E-10**	6.4025317
Icth=Icth	48.15	52.00	27.00	**1.182E-05**	4.3808377
Sejr=Sejr	61.54	16.00	6.50	**0.0048834**	2.8146241
Brat=Brat	41.30	38.00	23.00	**0.0055019**	2.7760759
Saxk=Saxk	62.50	10.00	4.00	**0.0282087**	2.1943723
spol=F	30.25	72.00	59.50	**0.0379715**	2.0751626
spol=M	17.28	28.00	40.50	**0.0379715**	-2.075163
Saxk=not.Saxk	23.44	90.00	96.00	**0.0282087**	-2.194372
DRB_2=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0207221**	-2.31301
DRB_1=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0207221**	-2.31301
mje=Vrbovec	4.35	2.00	11.50	**0.0092524**	-2.602583
Brat=not.Brat	20.13	62.00	77.00	**0.0055019**	-2.776076
Sejr=not.Sejr	22.46	84.00	93.50	**0.0048834**	-2.814624
Icth=not.Icth	16.44	48.00	73.00	**1.182E-05**	-4.380838
Pom=not.Pom	14.01	44.00	78.50	**1.528E-10**	-6.402532
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**2.223E-19**	-9.001676

Grpth negativno					
serum=NEG	100.00	66.67	50.00	**2.223E-19**	9.0016764
Pom=not.Pom	85.99	90.00	78.50	**1.528E-10**	6.4025317
Icth=not.Icth	83.56	81.33	73.00	**1.182E-05**	4.3808377
Sejr=not.Sejr	77.54	96.67	93.50	**0.0048834**	2.8146241
Brat=not.Brat	79.87	82.00	77.00	**0.0055019**	2.7760759
mje=Vrbovec	95.65	14.67	11.50	**0.0092524**	2.6025834
DRB_2=NN	100.00	8.67	6.50	**0.0207221**	2.3130102
DRB_1=NN	100.00	8.67	6.50	**0.0207221**	2.3130102
Saxk=not.Saxk	76.56	98.00	96.00	**0.0282087**	2.1943723
spol=M	82.72	44.67	40.50	**0.0379715**	2.0751626
spol=F	69.75	55.33	59.50	**0.0379715**	-2.075163
Saxk=Saxk	37.50	2.00	4.00	**0.0282087**	-2.194372
Brat=Brat	58.70	18.00	23.00	**0.0055019**	-2.776076
Sejr=Sejr	38.46	3.33	6.50	**0.0048834**	-2.814624
Icth=Icth	51.85	18.67	27.00	**1.182E-05**	-4.380838
Pom=Pom	34.88	10.00	21.50	**1.528E-10**	-6.402532
serum=POZ	50.00	33.33	50.00	**2.223E-19**	-9.001676

Sejr	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
Sejr pozitivno					
Saxk=Saxk	100.00	61.54	4.00	**2.336E-11**	6.68E+00
serum=POZ	13.00	100.00	50.00	**8.05E-05**	3.94E+00
Icth=Icth	16.67	69.23	27.00	**0.001393**	3.20E+00
Grpth=Grpth	16.00	61.54	25.00	**0.0048834**	2.81E+00
Brat=Brat	15.22	53.85	23.00	**0.0147877**	2.44E+00
Aust=Aust	27.27	23.08	5.50	**0.0291021**	2.18E+00
Cani=Cani	17.24	38.46	14.50	**0.0299457**	2.17E+00
DRA_2=Eqca-DRA*0401	40.00	15.38	2.50	**0.0370194**	2.09E+00
Pom=Pom	13.95	46.15	21.50	**0.0446814**	2.01E+00
pas=HT	2.41	15.38	41.50	**0.0492333**	-1.97E+00
Pom=not.Pom	4.46	53.85	78.50	**0.0446814**	-2.01E+00
Cani=not.Cani	4.68	61.54	85.50	**0.0299457**	-2.17E+00
Aust=not.Aust	5.29	76.92	94.50	**0.0291021**	-2.18E+00
DRA_2=Eqca-DRA*0101	3.55	38.46	70.50	**0.0160588**	-2.41E+00
Brat=not.Brat	3.90	46.15	77.00	**0.0147877**	-2.44E+00
Grpth=not.Grpth	3.33	38.46	75.00	**0.0048834**	-2.81E+00
Icth=not.Icth	2.74	30.77	73.00	**0.001393**	-3.20E+00
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**8.05E-05**	-3.94E+00
Saxk=not.Saxk	2.60	38.46	96.00	**2.336E-11**	-6.68E+00

Sejr negativno					
Saxk=not.Saxk	97.40	100.00	96.00	**2.336E-11**	6.683E+00
serum=NEG	100.00	53.48	50.00	**8.05E-05**	3.943E+00
Icth=not.Icth	97.26	75.94	73.00	**0.001393**	3.196E+00
Grpth=not.Grpth	96.67	77.54	75.00	**0.0048834**	2.815E+00
Brat=not.Brat	96.10	79.14	77.00	**0.0147877**	2.438E+00
DRA_2=Eqca-DRA*0101	96.45	72.73	70.50	**0.0160588**	2.408E+00
Aust=not.Aust	94.71	95.72	94.50	**0.0291021**	2.182E+00
Cani=not.Cani	95.32	87.17	85.50	**0.0299457**	2.171E+00
Pom=not.Pom	95.54	80.21	78.50	**0.0446814**	2.008E+00
pas=HT	97.59	43.32	41.50	**0.0492333**	1.967E+00
Pom=Pom	86.05	19.79	21.50	**0.0446814**	#########
DRA_2=Eqca-DRA*0401	60.00	1.60	2.50	**0.0370194**	#########
Cani=Cani	82.76	12.83	14.50	**0.0299457**	#########
Aust=Aust	72.73	4.28	5.50	**0.0291021**	#########
Brat=Brat	84.78	20.86	23.00	**0.0147877**	#########
Grpth=Grpth	84.00	22.46	25.00	**0.0048834**	#########
Icth=Icth	83.33	24.06	27.00	**0.001393**	#########
serum=POZ	87.00	46.52	50.00	**8.05E-05**	#########
Saxk=Saxk	0.00	0.00	4.00	**2.336E-11**	#########

Aust	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
Aust pozitivno					
mje=Vrbovec	43.48	90.91	11.50	**5.292E-10**	6.2102
Brat=Brat	23.91	100.00	23.00	**3.44E-08**	5.5174
pas=HP	28.57	54.55	10.50	**0.0002284**	3.6854
serum=POZ	11.00	100.00	50.00	**0.0003652**	3.5640
DRB_HH=Hom	7.59	100.00	72.50	**0.0260878**	2.2249
DRA_2=Eqca-DRA*0401	40.00	18.18	2.50	**0.0263823**	2.2205
Sejr=Sejr	23.08	27.27	6.50	**0.0291021**	2.1821
Sejr=not.Sejr	4.28	72.73	93.50	**0.0291021**	-2.1821
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0260878**	-2.2249
pas=HT	0.00	0.00	41.50	**0.0022374**	-3.0568
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**0.0003652**	-3.5640
Brat=not.Brat	0.00	0.00	77.00	**3.44E-08**	-5.5174
Aust negativno					
Brat=not.Brat	100.00	81.48	77.00	**3.44E-08**	5.5174
serum=NEG	100.00	52.91	50.00	**0.0003652**	3.5640
pas=HT	100.00	43.92	41.50	**0.0022374**	3.0568
DRB_HH=Het	100.00	29.10	27.50	**0.0260878**	2.2249
Sejr=not.Sejr	95.72	94.71	93.50	**0.0291021**	2.1821

Sejr=Sejr	76.92	5.29	6.50	**0.0291021**	-2.1821
DRA_2=Eqca-DRA*0401	60.00	1.59	2.50	**0.0263823**	-2.2205
DRB_HH=Hom	92.41	70.90	72.50	**0.0260878**	-2.2249
serum=POZ	89.00	47.09	50.00	**0.0003652**	-3.5640
pas=HP	71.43	7.94	10.50	**0.0002284**	-3.6854
Brat=Brat	76.09	18.52	23.00	**3.44E-08**	-5.5174
mje=Vrbovec	56.52	6.88	11.50	**5.292E-10**	-6.2102

Brat	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Brat pozitivno					
serum=POZ	46.00	100.00	50.00	**1.584E-17**	8.52E+00
Aust=Aust	100.00	23.91	5.50	**3.44E-08**	5.52E+00
Icth=Icth	44.44	52.17	27.00	**3.181E-05**	4.16E+00
pas=HP	52.38	23.91	10.50	**0.0021847**	3.06E+00
Grpth=Grpth	38.00	41.30	25.00	**0.0055019**	2.78E+00
Sejr=Sejr	53.85	15.22	6.50	**0.0147877**	2.44E+00
Pom=Pom	37.21	34.78	21.50	**0.0174215**	2.38E+00
Saxk=Saxk	62.50	10.87	4.00	**0.019164**	2.34E+00
mje=Vrbovec	43.48	21.74	11.50	**0.0217872**	2.29E+00
Saxk=not.Saxk	21.35	89.13	96.00	**0.019164**	-2.34E+00
Pom=not.Pom	19.11	65.22	78.50	**0.0174215**	-2.38E+00
Sejr=not.Sejr	20.86	84.78	93.50	**0.0147877**	-2.44E+00
Grpth=not.Grpth	18.00	58.70	75.00	**0.0055019**	-2.78E+00
Icth=not.Icth	15.07	47.83	73.00	**3.181E-05**	-4.16E+00
Aust=not.Aust	18.52	76.09	94.50	**3.44E-08**	-5.52E+00
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**1.584E-17**	-8.52E+00
Brat negativno					
serum=NEG	100.00	64.94	50.00	**1.584E-17**	8.52E+00
Aust=not.Aust	81.48	100.00	94.50	**3.44E-08**	5.52E+00
Icth=not.Icth	84.93	80.52	73.00	**3.181E-05**	4.16E+00
Grpth=not.Grpth	82.00	79.87	75.00	**0.0055019**	2.78E+00
Sejr=not.Sejr	79.14	96.10	93.50	**0.0147877**	2.44E+00
Pom=not.Pom	80.89	82.47	78.50	**0.0174215**	2.38E+00
Saxk=not.Saxk	78.65	98.05	96.00	**0.019164**	2.34E+00
mje=Vrbovec	56.52	8.44	11.50	**0.0217872**	-2.29E+00
Saxk=Saxk	37.50	1.95	4.00	**0.019164**	-2.34E+00
Pom=Pom	62.79	17.53	21.50	**0.0174215**	-2.38E+00
Sejr=Sejr	46.15	3.90	6.50	**0.0147877**	-2.44E+00
Grpth=Grpth	62.00	20.13	25.00	**0.0055019**	-2.78E+00
pas=HP	47.62	6.49	10.50	**0.0021847**	-3.06E+00

Icth=Icth	55.56	19.48	27.00	**3.181E-05**	-4.16E+00
Aust=Aust	0.00	0.00	5.50	**3.44E-08**	-5.52E+00
serum=POZ	54.00	35.06	50.00	**1.584E-17**	-8.52E+00

Pom	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Pom pozitivno					
serum=POZ	43.00	100.00	50.00	**3.425E-16**	8.1573361
Grpth=Grpth	56.00	65.12	25.00	**1.528E-10**	6.4025317
Icth=Icth	40.74	51.16	27.00	**0.0001352**	3.816819
DRB_1=Eqca-DRB*03	30.59	60.47	42.50	**0.0082737**	2.6406926
Brat=Brat	34.78	37.21	23.00	**0.0174215**	2.3776897
spol=F	26.89	74.42	59.50	**0.0242751**	2.2527471
Cani=Cani	37.93	25.58	14.50	**0.0296115**	2.175248
Sejr=Sejr	46.15	13.95	6.50	**0.0446814**	2.0076416
mje=Veliki Grdevac	100.00	4.65	1.00	**0.0453769**	2.0011439
DRB_1=Eqca-DRB*01	5.00	2.33	10.00	**0.0490655**	-1.968022
Sejr=not.Sejr	19.79	86.05	93.50	**0.0446814**	-2.007642
DRB_2=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0384232**	-2.070311
DRB_1=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0384232**	-2.070311
Cani=not.Cani	18.71	74.42	85.50	**0.0296115**	-2.175248
spol=M	13.58	25.58	40.50	**0.0242751**	-2.252747
Brat=not.Brat	17.53	62.79	77.00	**0.0174215**	-2.37769
mje=Vrbovec	0.00	0.00	11.50	**0.0026141**	-3.00981
Icth=not.Icth	14.38	48.84	73.00	**0.0001352**	-3.816819
Grpth=not.Grpth	10.00	34.88	75.00	**1.528E-10**	-6.402532
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**3.425E-16**	-8.157336
Pom negativno					
serum=NEG	100.00	63.69	50.00	**3.425E-16**	8.1573361
Grpth=not.Grpth	90.00	85.99	75.00	**1.528E-10**	6.4025317
Icth=not.Icth	85.62	79.62	73.00	**0.0001352**	3.816819
mje=Vrbovec	100.00	14.65	11.50	**0.0026141**	3.0098098
Brat=not.Brat	82.47	80.89	77.00	**0.0174215**	2.3776897
spol=M	86.42	44.59	40.50	**0.0242751**	2.2527471
Cani=not.Cani	81.29	88.54	85.50	**0.0296115**	2.175248
DRB_2=NN	100.00	8.28	6.50	**0.0384232**	2.0703109
DRB_1=NN	100.00	8.28	6.50	**0.0384232**	2.0703109
Sejr=not.Sejr	80.21	95.54	93.50	**0.0446814**	2.0076416
DRB_1=Eqca-DRB*01	95.00	12.10	10.00	**0.0490655**	1.9680223
mje=Veliki Grdevac	0.00	0.00	1.00	**0.0453769**	-2.001144
Sejr=Sejr	53.85	4.46	6.50	**0.0446814**	-2.007642
Cani=Cani	62.07	11.46	14.50	**0.0296115**	-2.175248

spol=F	73.11	55.41	59.50	**0.0242751**	-2.252747
Brat=Brat	65.22	19.11	23.00	**0.0174215**	-2.37769
DRB_1=Eqca-DRB*03	69.41	37.58	42.50	**0.0082737**	-2.640693
Icth=Icth	59.26	20.38	27.00	**0.0001352**	-3.816819
Grpth=Grpth	44.00	14.01	25.00	**1.528E-10**	-6.402532
serum=POZ	57.00	36.31	50.00	**3.425E-16**	-8.157336

Cani	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Cani pozitivno					
Icth=Icth	53.70	100.00	27.00	**2.342E-20**	9.2454803
serum=POZ	29.00	100.00	50.00	**1.727E-10**	6.3838634
Pom=Pom	25.58	37.93	21.50	**0.0296115**	2.175248
DRB_2=NN	38.46	17.24	6.50	**0.0299457**	2.1708081
DRB_1=NN	38.46	17.24	6.50	**0.0299457**	2.1708081
Sejr=Sejr	38.46	17.24	6.50	**0.0299457**	2.1708081
Sejr=not.Sejr	12.83	82.76	93.50	**0.0299457**	-2.170808
Pom=not.Pom	11.46	62.07	78.50	**0.0296115**	-2.175248
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**1.727E-10**	-6.383863
Icth=not.Icth	0.00	0.00	73.00	**2.342E-20**	-9.24548
Cani negativno					
Icth=not.Icth	100.00	85.38	73.00	**2.342E-20**	9.2454803
serum=NEG	100.00	58.48	50.00	**1.727E-10**	6.3838634
Pom=not.Pom	88.54	81.29	78.50	**0.0296115**	2.175248
Sejr=not.Sejr	87.17	95.32	93.50	**0.0299457**	2.1708081
DRB_2=NN	61.54	4.68	6.50	**0.0299457**	-2.170808
DRB_1=NN	61.54	4.68	6.50	**0.0299457**	-2.170808
Sejr=Sejr	61.54	4.68	6.50	**0.0299457**	-2.170808
Pom=Pom	74.42	18.71	21.50	**0.0296115**	-2.175248
serum=POZ	71.00	41.52	50.00	**1.727E-10**	-6.383863
Icth=Icth	46.30	14.62	27.00	**2.342E-20**	-9.24548

Icth	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Icthpozitvno					
serum=POZ	54.00	100.00	50.00	**2.527E-21**	9.4806572
Cani=Cani	100.00	53.70	14.50	**2.342E-20**	9.2454803
Grpth=Grpth	52.00	48.15	25.00	**1.182E-05**	4.3808377
Brat=Brat	52.17	44.44	23.00	**3.181E-05**	4.1600778
Pom=Pom	51.16	40.74	21.50	**0.0001352**	3.816819
Sejr=Sejr	69.23	16.67	6.50	**0.001393**	3.1960941
spol=F	34.45	75.93	59.50	**0.0037779**	2.8961335

Saxk=Saxk	62.50	9.26	4.00	**0.0400618**	2.0531114
Saxk=not.Saxk	25.52	90.74	96.00	**0.0400618**	-2.053111
spol=M	16.05	24.07	40.50	**0.0037779**	-2.896133
Sejr=not.Sejr	24.06	83.33	93.50	**0.001393**	-3.196094
Pom=not.Pom	20.38	59.26	78.50	**0.0001352**	-3.816819
Brat=not.Brat	19.48	55.56	77.00	**3.181E-05**	-4.160078
Grpth=not.Grpth	18.67	51.85	75.00	**1.182E-05**	-4.380838
Cani=not.Cani	14.62	46.30	85.50	**2.342E-20**	-9.24548
serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**2.527E-21**	-9.480657
Icth negativno					
serum=NEG	100.00	68.49	50.00	**2.527E-21**	9.4806572
Cani=not.Cani	85.38	100.00	85.50	**2.342E-20**	9.2454803
Grpth=not.Grpth	81.33	83.56	75.00	**1.182E-05**	4.3808377
Brat=not.Brat	80.52	84.93	77.00	**3.181E-05**	4.1600778
Pom=not.Pom	79.62	85.62	78.50	**0.0001352**	3.816819
Sejr=not.Sejr	75.94	97.26	93.50	**0.001393**	3.1960941
spol=M	83.95	46.58	40.50	**0.0037779**	2.8961335
Saxk=not.Saxk	74.48	97.95	96.00	**0.0400618**	2.0531114
Saxk=Saxk	37.50	2.05	4.00	**0.0400618**	-2.053111
spol=F	65.55	53.42	59.50	**0.0037779**	-2.896133
Sejr=Sejr	30.77	2.74	6.50	**0.001393**	-3.196094
Pom=Pom	48.84	14.38	21.50	**0.0001352**	-3.816819
Brat=Brat	47.83	15.07	23.00	**3.181E-05**	-4.160078
Grpth=Grpth	48.00	16.44	25.00	**1.182E-05**	-4.380838
Cani=Cani	0.00	0.00	14.50	**2.342E-20**	-9.24548
serum=POZ	46.00	31.51	50.00	**2.527E-21**	-9.480657

Saxk	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Saxk pozitivno					
Sejr=Sejr	61.54	100.00	6.50	**2.336E-11**	6.6833257
serum=POZ	8.00	100.00	50.00	**0.0033773**	2.9311279
DRA_2=Eqca-DRA*0401	40.00	25.00	2.50	**0.013644**	2.4665013
Brat=Brat	10.87	62.50	23.00	**0.019164**	2.3423254
Grpth=Grpth	10.00	62.50	25.00	**0.0282087**	2.1943723
Bata=Bata	100.00	12.50	0.50	**0.04**	2.0537489
Icth=Icth	9.26	62.50	27.00	**0.0400618**	2.0531114
Icth=not.Icth	2.05	37.50	73.00	**0.0400618**	-2.053111
Bata=not.Bata	3.52	87.50	99.50	**0.04**	-2.053749
Grpth=not.Grpth	2.00	37.50	75.00	**0.0282087**	-2.194372
Brat=not.Brat	1.95	37.50	77.00	**0.019164**	-2.342325
DRA_2=Eqca-DRA*0101	1.42	25.00	70.50	**0.0098978**	-2.579381

serum=NEG	0.00	0.00	50.00	**0.0033773**	-2.931128
Sejr=not.Sejr	0.00	0.00	93.50	**2.336E-11**	-6.683326
Saxk negativno					
Sejr=not.Sejr	100.00	97.40	93.50	**2.336E-11**	6.6833257
serum=NEG	100.00	52.08	50.00	**0.0033773**	2.9311279
DRA_2=Eqca-DRA*0101	98.58	72.40	70.50	**0.0098978**	2.579381
Brat=not.Brat	98.05	78.65	77.00	**0.019164**	2.3423254
Grpth=not.Grpth	98.00	76.56	75.00	**0.0282087**	2.1943723
Bata=not.Bata	96.48	100.00	99.50	**0.04**	2.0537489
Icth=not.Icth	97.95	74.48	73.00	**0.0400618**	2.0531114
Icth=Icth	90.74	25.52	27.00	**0.0400618**	-2.053111
Bata=Bata	0.00	0.00	0.50	**0.04**	-2.053749
Grpth=Grpth	90.00	23.44	25.00	**0.0282087**	-2.194372
Brat=Brat	89.13	21.35	23.00	**0.019164**	-2.342325
DRA_2=Eqca-DRA*0401	60.00	1.56	2.50	**0.013644**	-2.466501
serum=POZ	92.00	47.92	50.00	**0.0033773**	-2.931128
Sejr=Sejr	38.46	2.60	6.50	**2.336E-11**	-6.683326

Bata	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Bata pozitivno					
mje=Orahovica	50	100	1	**0.01**	2.5758293
Saxk=Saxk	12.5	100	4	**0.04**	2.0537489
Saxk=not.Saxk	0	0	96	**0.04**	-2.053749
Bata negativno					
Saxk=not.Saxk	100	96.48241	96	**0.04**	2.0537489
Saxk=Saxk	87.5	3.517588	4	**0.04**	-2.053749
mje=Orahovica	50	0.502513	1	**0.01**	-2.575829

DRA_1	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Eqca_DRAx0101					
DRA_HH=Hom	92.17	80.30	57.50	**1.339E-20**	9.3050613
DRA_2=Eqca_DRAx0101	75.18	80.30	70.50	**3.661E-05**	4.1279102
spol=F	73.95	66.67	59.50	**0.0045688**	2.8359645
DRB_1=Eqca_DRBx01	90.00	13.64	10.00	**0.0134554**	2.4714824
DRB_2=Eqca_DRBx01	89.47	12.88	9.50	**0.0194322**	2.337135
DRB_2=Eqca_DRBx12	100.00	6.06	4.00	**0.0334201**	2.1269993
DRB_1=Eqca_DRBx12	100.00	6.06	4.00	**0.0334201**	2.1269993
DRB_2=NN	92.31	9.09	6.50	**0.0341616**	2.1181585
DRB_1=NN	92.31	9.09	6.50	**0.0341616**	2.1181585
DRB_HH=Hom	70.34	77.27	72.50	**0.039492**	2.0590231
mje=Zupanja	45.00	6.82	10.00	**0.0465014**	-1.990814

DRB_HH=Het	54.55	22.73	27.50	**0.039492**	-2.059023
DRA_2=Eqca_DRAx0201	51.16	16.67	21.50	**0.0244139**	-2.250552
DRA_2=Eqca_DRAx0301	30.00	2.27	5.00	**0.0224768**	-2.282213
mje=Pozega	30.00	2.27	5.00	**0.0224768**	-2.282213
DRB_2=Eqca_DRBx03	50.00	16.67	22.00	**0.0138496**	-2.46114
spol=M	54.32	33.33	40.50	**0.0045688**	-2.835964
DRA_2=Eqca_DRAx0401	0.00	0.00	2.50	**0.004111**	-2.869514
DRB_1=Eqca_DRBx03	51.76	33.33	42.50	**0.0003036**	-3.61219
DRA_HH=Het	30.59	19.70	42.50	**1.339E-20**	-9.305061
Eqca_DRAx0201					
DRB_HH=Het	12.73	87.50	27.50	**0.0005782**	3.4416276
DRB_1=Eqca_DRBx04	20.83	62.50	12.00	**0.0007665**	3.3646166
DRB_2=Eqca_DRBx06	15.15	62.50	16.50	**0.0038675**	2.8887751
mje=Zupanja	15.00	37.50	10.00	**0.0388039**	2.0662599
mje=Rovisce	100.00	12.50	0.50	**0.04**	2.0537489
DRA_2=Eqca_DRAx0101	1.42	25.00	70.50	**0.0098978**	-2.579381
DRB_HH=Hom	0.69	12.50	72.50	**0.0005782**	-3.441628
Eqca_DRAx0301					
DRA_HH=Het	45.88	92.86	42.50	**2.173E-14**	7.639932
DRB_1=Eqca_DRBx03	35.29	71.43	42.50	**2.545E-05**	4.210773
mje=Vinkovci	71.43	11.90	3.50	**0.0053691**	2.7840125
spol=M	30.86	59.52	40.50	**0.0056972**	2.7647189
DRB_2=Eqca_DRBx03	36.36	38.10	22.00	**0.0074782**	2.6747616
pas=araber	75.00	7.14	2.00	**0.0315019**	2.1506743
mje=Lipik	57.14	9.52	3.50	**0.041597**	2.0375296
mje=Pozega	50.00	11.90	5.00	**0.0425319**	2.0282782
mje=Beli Manastir	100.00	4.76	1.00	**0.0432663**	2.0211298
mje=Zupanja	40.00	19.05	10.00	**0.0434221**	2.0196271
pas=HP	4.76	2.38	10.50	**0.0439027**	-2.015019
DRB_1=Eqca_DRBx04	4.17	2.38	12.00	**0.0220905**	-2.288808
DRA_2=Eqca_DRAx0101	16.31	54.76	70.50	**0.0154886**	-2.420747
spol=F	14.29	40.48	59.50	**0.0056972**	-2.764719
DRA_HH=Hom	2.61	7.14	57.50	**2.173E-14**	-7.639932
Eqca_DRAx0401					
DRA_HH=Het	14.12	85.71	42.50	**0.0008815**	3.325859
DRA_2=Eqca_DRAx0401	40.00	14.29	2.50	**0.0429588**	2.0241104
DRA_HH=Hom	1.74	14.29	57.50	**0.0008815**	-3.325859
Eqca_DRAx0501					
pas=poni	33.33	50.00	3.00	**0.0044617**	2.8435285
mje=Pozega	20.00	50.00	5.00	**0.0132024**	2.4782631
DRA_HH=Het	4.71	100.00	42.50	**0.0313023**	2.153209
mje=Vukovar	50.00	25.00	1.00	**0.04**	2.0537489

DRA_HH=Hom	0.00	0.00	57.50	**0.0313023**	-2.153209

DRA_2	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
Eqca_DRAx0101					
DRA_HH=Hom	92.17	75.18	57.50	**2.359E-15**	7.920838
DRA_1=Eqca_DRAx0101	80.30	75.18	66.00	**3.661E-05**	4.1279102
pas=HP	95.24	14.18	10.50	**0.0049149**	2.8125586
Saxk=not.Saxk	72.40	98.58	96.00	**0.0098978**	2.579381
mje=Vrbovec	91.30	14.89	11.50	**0.0153757**	2.4234071
Sejr=not.Sejr	72.73	96.45	93.50	**0.0160588**	2.4075773
DRB_HH=Hom	75.17	77.30	72.50	**0.0222622**	2.285865
spol=F	76.47	64.54	59.50	**0.0272343**	2.2081435
DRB_1=Eqca_DRBx01	90.00	12.77	10.00	**0.0386323**	2.068082
DRB_1=Eqca_DRBx03	62.35	37.59	42.50	**0.0323056**	-2.140609
mje=Djakovo	20.00	0.71	2.50	**0.029257**	-2.180006
mje=Vinkovci	28.57	1.42	3.50	**0.0274975**	-2.204381
spol=M	61.73	35.46	40.50	**0.0272343**	-2.208144
DRB_HH=Het	58.18	22.70	27.50	**0.0222622**	-2.285865
Sejr=Sejr	38.46	3.55	6.50	**0.0160588**	-2.407577
DRA_1=Eqca_DRAx0301	54.76	16.31	21.00	**0.0154886**	-2.420747
DRA_1=Eqca_DRAx0201	25.00	1.42	4.00	**0.0098978**	-2.579381
Saxk=Saxk	25.00	1.42	4.00	**0.0098978**	-2.579381
DRB_2=Eqca_DRBx04	48.72	13.48	19.50	**0.0015225**	-3.170352
mje=Zupanja	35.00	4.96	10.00	**0.0006592**	-3.406006
DRA_HH=Het	41.18	24.82	42.50	**2.359E-15**	-7.920838
Eqca_DRAx0201					
DRA_HH=Het	45.88	90.70	42.50	**1.691E-13**	7.3712009
DRB_2=Eqca_DRBx04	43.59	39.53	19.50	**0.000507**	3.477039
mje=Zupanja	50.00	23.26	10.00	**0.0032908**	2.9391806
mje=Split	100.00	4.65	1.00	**0.0453769**	2.0011439
mje=Slatina	100.00	4.65	1.00	**0.0453769**	2.0011439
DRA_1=Eqca_DRAx0101	16.67	51.16	66.00	**0.0244139**	-2.250552
pas=HP	0.00	0.00	10.50	**0.0045365**	-2.838223
mje=Vrbovec	0.00	0.00	11.50	**0.0026141**	-3.00981
DRA_HH=Hom	3.48	9.30	57.50	**1.691E-13**	-7.371201
Eqca_DRAx0301					
DRB_HH=Het	14.55	80.00	27.50	**0.0006509**	3.4094581
DRB_2=Eqca_DRBx06	15.15	50.00	16.50	**0.0141635**	2.4530885
DRB_1=Eqca_DRBx04	16.67	40.00	12.00	**0.023449**	2.2660385
mje=Rovisce	100.00	10.00	0.50	0.05	1.959964
DRA_1=Eqca_DRAx0101	2.27	30.00	66.00	**0.0224768**	-2.282213

DRB_HH=Hom	1.38	20.00	72.50	**0.0006509**	-3.409458
Eqca_DRAx0401					
Saxk=Saxk	25.00	40.00	4.00	**0.013644**	2.4665013
Aust=Aust	18.18	40.00	5.50	**0.0263823**	2.2205379
Sejr=Sejr	15.38	40.00	6.50	**0.0370194**	2.0855496
DRA_1=Eqca_DRAx0401	14.29	40.00	7.00	**0.0429588**	2.0241104
mje=Varazdin	50.00	20.00	1.00	0.05	1.959964
Sejr=not.Sejr	1.60	60.00	93.50	**0.0370194**	-2.08555
Aust=not.Aust	1.59	60.00	94.50	**0.0263823**	-2.220538
Saxk=not.Saxk	1.56	60.00	96.00	**0.013644**	-2.466501
DRA_1=Eqca_DRAx0101	0.00	0.00	66.00	**0.004111**	-2.869514
Eqca_DRAx0501					
mje=Vinkovci	14.29	100.00	3.50	**0.035**	2.1083584

DRB_1	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	*V*
Eqca_DRBx01					
DRB_2=Eqca_DRBx01	100.00	95.00	9.50	**1.122E-25**	10.475308
DRB_HH=Hom	13.10	95.00	72.50	**0.0116841**	2.5215427
DRA_1=Eqca_DRAx0101	13.64	90.00	66.00	**0.0134554**	2.4714824
mje=Krizevci	50.00	15.00	3.00	**0.0151859**	2.4279162
DRA_HH=Hom	13.91	80.00	57.50	**0.031849**	2.1463004
DRA_2=Eqca_DRAx0101	12.77	90.00	70.50	**0.0386323**	2.068082
Pom=not.Pom	12.10	95.00	78.50	**0.0490655**	1.9680223
Pom=Pom	2.33	5.00	21.50	**0.0490655**	-1.968022
DRA_HH=Het	4.71	20.00	42.50	**0.031849**	-2.1463
DRB_2=Eqca_DRBx06	0.00	0.00	16.50	**0.0221751**	-2.287355
DRB_HH=Het	1.82	5.00	27.50	**0.0116841**	-2.521543
DRB_2=Eqca_DRBx04	0.00	0.00	19.50	**0.0101868**	-2.569425
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**0.0052011**	-2.794306
Eqca_DRBx02					
DRB_2=Eqca_DRBx02	100.00	100.00	7.00	**8.476E-22**	9.5939684
DRB_HH=Hom	9.66	100.00	72.50	**0.0092365**	2.6031755
DRB_2=Eqca_DRBx04	0.00	0.00	19.50	**0.0427282**	-2.026357
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**0.0269495**	-2.212248
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0092365**	-2.603175
Eqca_DRBx03					
DRB_2=Eqca_DRBx03	100.00	51.76	22.00	**7.978E-21**	9.359949
DRB_HH=Het	74.55	48.24	27.50	**1.941E-08**	5.6172092
DRA_1=Eqca_DRAx0301	71.43	35.29	21.00	**2.545E-05**	4.210773
Pom=Pom	60.47	30.59	21.50	**0.0082737**	2.6406926
DRB_2=Eqca_DRBx04	58.97	27.06	19.50	**0.0229653**	2.2740119

DRA_HH=Het	51.76	51.76	42.50	**0.0241102**	2.2553689
DRB_2=Eqca_DRBx14	0.00	0.00	3.00	**0.0341436**	-2.118371
DRA_2=Eqca_DRAx0101	37.59	62.35	70.50	**0.0323056**	-2.140609
DRA_HH=Hom	35.65	48.24	57.50	**0.0241102**	-2.255369
DRB_2=Eqca_DRBx12	0.00	0.00	4.00	**0.010735**	-2.55121
Pom=not.Pom	37.58	69.41	78.50	**0.0082737**	-2.640693
DRB_2=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0005531**	-3.453604
DRA_1=Eqca_DRAx0101	33.33	51.76	66.00	**0.0003036**	-3.61219
DRB_2=Eqca_DRBx02	0.00	0.00	7.00	**0.0003017**	-3.613821
DRB_2=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**8.856E-05**	-3.91997
DRB_2=Eqca_DRBx01	0.00	0.00	9.50	**1.36E-05**	-4.350226
DRB_HH=Hom	30.34	51.76	72.50	**1.941E-08**	-5.617209
Eqca_DRBx04					
DRB_2=Eqca_DRBx04	35.90	58.33	19.50	**7.062E-06**	4.4918242
DRA_1=Eqca_DRAx0201	62.50	20.83	4.00	**0.0007665**	3.3646166
DRB_2=Eqca_DRBx06	27.27	37.50	16.50	**0.0082962**	2.6397704
mje=Samobor	100.00	8.33	1.00	**0.0138693**	2.4606296
mje=Konjscina	100.00	8.33	1.00	**0.0138693**	2.4606296
DRA_2=Eqca_DRAx0301	40.00	16.67	5.00	**0.023449**	2.2660385
mje=Lipik	42.86	12.50	3.50	**0.0431405**	2.0223472
DRA_1=Eqca_DRAx0301	2.38	4.17	21.00	**0.0220905**	-2.288808
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**0.0016765**	-3.142255
Eqca_DRBx05					
DRB_2=Eqca_DRBx05	100.00	100.00	0.50	**0.005**	2.8070338
mje=Split	50.00	100.00	1.00	**0.01**	2.5758293
Eqca_DRBx06					
DRB_2=Eqca_DRBx06	24.24	100.00	16.50	**2.52E-07**	5.1562194
mje=Krapina	100.00	12.50	0.50	**0.04**	2.0537489
Eqca_DRBx07					
mje=Vrbovsko	33.33	50.00	1.50	**0.03**	2.1700904
Eqca_DRBx08					
mje=Ivanska	33.33	100.00	1.50	**0.015**	2.4323791
Eqca_DRBx09					
DRB_2=Eqca_DRBx09	50.00	100.00	1.00	**0.01**	2.5758293
pas=HSK	33.33	100.00	1.50	**0.015**	2.4323791
mje=Vinkovci	14.29	100.00	3.50	**0.035**	2.1083584
Eqca_DRBx10					
DRB_2=Eqca_DRBx10	33.33	100.00	1.50	**0.015**	2.4323791
pas=araber	25.00	100.00	2.00	**0.02**	2.3263479
mje=Vinkovci	14.29	100.00	3.50	**0.035**	2.1083584
Eqca_DRBx11					
DRB_2=Eqca_DRBx11	100.00	100.00	8.00	**5.912E-24**	10.093348
pas=HT	15.66	81.25	41.50	**0.0010431**	3.2786373
DRB_HH=Hom	11.03	100.00	72.50	**0.0045713**	2.8357893

mje=Ludbreg	50.00	18.75	3.00	**0.0077041**	2.6647714
mje=Daruvar	50.00	12.50	2.00	**0.0344754**	2.1144669
DRB_2=Eqca_DRBx06	0.00	0.00	16.50	**0.0492457**	-1.966458
DRB_2=Eqca_DRBx04	0.00	0.00	19.50	**0.0266502**	-2.216604
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**0.015681**	-2.416256
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0045713**	-2.835789
Eqca_DRBx12					
DRB_2=Eqca_DRBx12	100.00	100.00	4.00	**1.815E-14**	7.6631045
pas=HP	19.05	50.00	10.50	**0.0052187**	2.793215
mje=Vrbovec	17.39	50.00	11.50	**0.0075204**	2.6728771
mje=Sesvete	50.00	25.00	2.00	**0.0082717**	2.6407751
DRA_HH=Hom	6.96	100.00	57.50	**0.010735**	2.5512097
DRA_1=Eqca_DRAx0101	6.06	100.00	66.00	**0.0334201**	2.1269993
pas=HT	0.00	0.00	41.50	**0.0123764**	-2.501226
DRA_HH=Het	0.00	0.00	42.50	**0.010735**	-2.55121
Eqca_DRBx13					
DRB_2=Eqca_DRBx13	100.00	100.00	0.50	**0.005**	2.8070338
mje=Djakovo	20.00	100.00	2.50	**0.025**	2.2414027
pas=lipicanac	14.29	100.00	3.50	**0.035**	2.1083584
Eqca_DRBx14					
DRB_2=Eqca_DRBx14	83.33	100.00	3.00	**2.366E-09**	5.9704323
pas=poni	33.33	40.00	3.00	**0.0073854**	2.6789466
mje=Slatina	50.00	20.00	1.00	0.05	1.959964
mje=Oborovo	50.00	20.00	1.00	0.05	1.959964
NN					
DRB_2=NN	100.00	100.00	6.50	**1.132E-20**	9.3228877
spol=F	10.08	92.31	59.50	**0.0104699**	2.559911
DRB_HH=Hom	8.97	100.00	72.50	**0.013085**	2.4814476
Grpth=not.Grpth	8.67	100.00	75.00	**0.0207221**	2.3130102
Cani=Cani	17.24	38.46	14.50	**0.0299457**	2.1708081
DRA_1=Eqca_DRAx0101	9.09	92.31	66.00	**0.0341616**	2.1181585
Pom=not.Pom	8.28	100.00	78.50	**0.0384232**	2.0703109
DRA_HH=Hom	9.57	84.62	57.50	**0.0417332**	2.0361704
DRA_HH=Het	2.35	15.38	42.50	**0.0417332**	-2.03617
Pom=Pom	0.00	0.00	21.50	**0.0384232**	-2.070311
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**0.0352417**	-2.10557
Cani=not.Cani	4.68	61.54	85.50	**0.0299457**	-2.170808
Grpth=Grpth	0.00	0.00	25.00	**0.0207221**	-2.31301
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.013085**	-2.481448
spol=M	1.23	7.69	40.50	**0.0104699**	-2.559911
pas=HH	0.00	0.00	36.00	**0.0023969**	-3.036063

DRB_2	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Eqca_DRBx01					
DRB_1=Eqca_DRBx01	95.00	100.00	10.00	**1.122E-25**	10.475308

DRB_HH=Hom	13.10	100.00	72.50	**0.0015642**	3.1624969
DRA_1=Eqca_DRAx0101	12.88	89.47	66.00	**0.0194322**	2.337135
DRA_HH=Hom	13.04	78.95	57.50	**0.0477894**	1.9792364
DRA_HH=Het	4.71	21.05	42.50	**0.0477894**	-1.979236
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0015642**	-3.162497
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**1.36E-05**	-4.350226
Eqca_DRBx02					
DRB_1=Eqca_DRBx02	100.00	100.00	7.00	**8.476E-22**	9.5939684
DRB_HH=Hom	9.66	100.00	72.50	**0.0092365**	2.6031755
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0092365**	-2.603175
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**0.0003017**	-3.613821
Eqca_DRBx03					
DRB_1=Eqca_DRBx03	51.76	100.00	42.50	**7.978E-21**	9.359949
DRB_HH=Hom	30.34	100.00	72.50	**8.088E-08**	5.3651496
DRA_1=Eqca_DRAx0301	38.10	36.36	21.00	**0.0074782**	2.6747616
mje=Veliki Grdevac	100.00	4.55	1.00	**0.0475377**	1.9814781
mje=Vrbovec	39.13	20.45	11.50	**0.0499391**	1.9604854
DRB_1=NN	0.00	0.00	6.50	**0.0352417**	-2.10557
DRB_1=Eqca_DRBx02	0.00	0.00	7.00	**0.0269495**	-2.212248
DRB_1=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**0.015681**	-2.416256
DRA_1=Eqca_DRAx0101	16.67	50.00	66.00	**0.0138496**	-2.46114
DRB_1=Eqca_DRBx01	0.00	0.00	10.00	**0.0052011**	-2.794306
DRB_1=Eqca_DRBx04	0.00	0.00	12.00	**0.0016765**	-3.142255
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**8.088E-08**	-5.36515
Eqca_DRBx04					
DRB_HH=Het	45.45	64.10	27.50	**8.404E-08**	5.3582384
DRB_1=Eqca_DRBx04	58.33	35.90	12.00	**7.062E-06**	4.4918242
DRA_2=Eqca_DRAx0201	39.53	43.59	21.50	**0.000507**	3.477039
DRA_HH=Het	27.06	58.97	42.50	**0.0229653**	2.2740119
DRB_1=Eqca_DRBx03	27.06	58.97	42.50	**0.0229653**	2.2740119
pas=HH	27.78	51.28	36.00	**0.0312539**	2.1538254
mje=Lipik	57.14	10.26	3.50	**0.0315516**	2.1500453
mje=Konjscina	100.00	5.13	1.00	**0.0372362**	2.0831651
DRB_1=Eqca_DRBx02	0.00	0.00	7.00	**0.0427282**	-2.026357
DRB_1=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**0.0266502**	-2.216604
DRA_HH=Hom	13.91	41.03	57.50	**0.0229653**	-2.274012
DRB_1=Eqca_DRBx01	0.00	0.00	10.00	**0.0101868**	-2.569425
pas=HP	0.00	0.00	10.50	**0.0079796**	-2.652931
DRA_2=Eqca_DRAx0101	13.48	48.72	70.50	**0.0015225**	-3.170352
DRB_HH=Hom	9.66	35.90	72.50	**8.404E-08**	-5.358238
Eqca_DRBx05					
DRB_1=Eqca_DRBx05	100.00	100.00	0.50	**0.005**	2.8070338

mje=Split	50.00	100.00	1.00	**0.01**	2.5758293
Eqca_DRBx06					
DRB_HH=Het	45.45	75.76	27.50	**2.322E-10**	6.3383985
DRB_1=Eqca_DRBx06	100.00	24.24	4.00	**2.52E-07**	5.1562194
DRA_1=Eqca_DRAx0201	62.50	15.15	4.00	**0.0038675**	2.8887751
DRB_1=Eqca_DRBx04	37.50	27.27	12.00	**0.0082962**	2.6397704
DRA_2=Eqca_DRAx0301	50.00	15.15	5.00	**0.0141635**	2.4530885
mje=Samobor	100.00	6.06	1.00	**0.0265327**	2.2183253
mje=Luzani	60.00	9.09	2.50	**0.0354022**	2.1037279
DRB_1=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**0.0492457**	-1.966458
DRB_1=Eqca_DRBx01	0.00	0.00	10.00	**0.0221751**	-2.287355
DRB_HH=Hom	5.52	24.24	72.50	**2.322E-10**	-6.338399
Eqca_DRBx07					
NA					
Eqca_DRBx09					
mje=Vinkovci	28.57	100.00	3.50	**0.0010553**	3.2753594
DRB_1=Eqca_DRBx09	100.00	50.00	0.50	**0.01**	2.5758293
pas=HSK	33.33	50.00	1.50	**0.03**	2.1700904
Eqca_DRBx10					
DRB_1=Eqca_DRBx10	100.00	33.33	0.50	**0.015**	2.4323791
Eqca_DRBx11					
DRB_1=Eqca_DRBx11	100.00	100.00	8.00	**5.912E-24**	10.093348
pas=HT	15.66	81.25	41.50	**0.0010431**	3.2786373
DRB_HH=Hom	11.03	100.00	72.50	**0.0045713**	2.8357893
mje=Ludbreg	50.00	18.75	3.00	**0.0077041**	2.6647714
mje=Daruvar	50.00	12.50	2.00	**0.0344754**	2.1144669
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.0045713**	-2.835789
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**8.856E-05**	-3.91997
Eqca_DRBx12					
DRB_1=Eqca_DRBx12	100.00	100.00	4.00	**1.815E-14**	7.6631045
pas=HP	19.05	50.00	10.50	**0.0052187**	2.793215
mje=Vrbovec	17.39	50.00	11.50	**0.0075204**	2.6728771
mje=Sesvete	50.00	25.00	2.00	**0.0082717**	2.6407751
DRA_HH=Hom	6.96	100.00	57.50	**0.010735**	2.5512097
DRA_1=Eqca_DRAx0101	6.06	100.00	66.00	**0.0334201**	2.1269993
pas=HT	0.00	0.00	41.50	**0.0123764**	-2.501226
DRA_HH=Het	0.00	0.00	42.50	**0.010735**	-2.55121
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**0.010735**	-2.55121
Eqca_DRBx13					
DRB_1=Eqca_DRBx13	100.00	100.00	0.50	**0.005**	2.8070338
mje=Djakovo	20.00	100.00	2.50	**0.025**	2.2414027
pas=lipicanac	14.29	100.00	3.50	**0.035**	2.1083584
Eqca_DRBx14					
DRB_1=Eqca_DRBx14	100.00	83.33	2.50	**2.366E-09**	5.9704323

pas=poni	33.33	33.33	3.00	**0.011002**	2.542635
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**0.0341436**	-2.118371
NN					
DRB_1=NN	100.00	100.00	6.50	**1.132E-20**	9.3228877
spol=F	10.08	92.31	59.50	**0.0104699**	2.559911
DRB_HH=Hom	8.97	100.00	72.50	**0.013085**	2.4814476
Grpth=not.Grpth	8.67	100.00	75.00	**0.0207221**	2.3130102
Cani=Cani	17.24	38.46	14.50	**0.0299457**	2.1708081
DRA_1=Eqca_DRAx0101	9.09	92.31	66.00	**0.0341616**	2.1181585
Pom=not.Pom	8.28	100.00	78.50	**0.0384232**	2.0703109
DRA_HH=Hom	9.57	84.62	57.50	**0.0417332**	2.0361704
DRA_HH=Het	2.35	15.38	42.50	**0.0417332**	-2.03617
Pom=Pom	0.00	0.00	21.50	**0.0384232**	-2.070311
Cani=not.Cani	4.68	61.54	85.50	**0.0299457**	-2.170808
Grpth=Grpth	0.00	0.00	25.00	**0.0207221**	-2.31301
DRB_HH=Het	0.00	0.00	27.50	**0.013085**	-2.481448
spol=M	1.23	7.69	40.50	**0.0104699**	-2.559911
pas=HH	0.00	0.00	36.00	**0.0023969**	-3.036063
DRB_1=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	42.50	**0.0005531**	-3.453604

DRA_HH	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Het					
DRA_1=Eqca_DRAx0301	92.86	45.88	21.00	**2.173E-14**	7.64E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0201	90.70	45.88	21.50	**1.691E-13**	7.37E+00
mje=Zupanja	80.00	18.82	10.00	**0.0004453**	3.51E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0401	85.71	14.12	7.00	**0.0008815**	3.33E+00
mje=Vinkovci	100.00	8.24	3.50	**0.0021612**	3.07E+00
DRB_2=Eqca_DRBx04	58.97	27.06	19.50	**0.0229653**	2.27E+00
DRB_1=Eqca_DRBx03	51.76	51.76	42.50	**0.0241102**	2.26E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0501	100.00	4.71	2.00	**0.0313023**	2.15E+00
DRB_2=Eqca_DRBx01	21.05	4.71	9.50	**0.0477894**	-1.98E+00
DRB_2=NN	15.38	2.35	6.50	**0.0417332**	-2.04E+00
DRB_1=NN	15.38	2.35	6.50	**0.0417332**	-2.04E+00
mje=Krizevci	0.00	0.00	3.00	**0.0341436**	-2.12E+00
DRB_1=Eqca_DRBx01	20.00	4.71	10.00	**0.031849**	-2.15E+00
DRB_2=Eqca_DRBx12	0.00	0.00	4.00	**0.010735**	-2.55E+00
DRB_1=Eqca_DRBx12	0.00	0.00	4.00	**0.010735**	-2.55E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0101	24.82	41.18	70.50	**2.359E-15**	-7.92E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0101	19.70	30.59	66.00	**1.339E-20**	-9.31E+00
Hom					
DRA_1=Eqca_DRAx0101	80.30	92.17	66.00	**1.339E-20**	9.31E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0101	75.18	92.17	70.50	**2.359E-15**	7.92E+00

DRB_2=Eqca_DRBx12	100.00	6.96	4.00	**0.010735**	2.55E+00
DRB_1=Eqca_DRBx12	100.00	6.96	4.00	**0.010735**	2.55E+00
DRB_1=Eqca_DRBx01	80.00	13.91	10.00	**0.031849**	2.15E+00
mje=Krizevci	100.00	5.22	3.00	**0.0341436**	2.12E+00
DRB_2=NN	84.62	9.57	6.50	**0.0417332**	2.04E+00
DRB_1=NN	84.62	9.57	6.50	**0.0417332**	2.04E+00
DRB_2=Eqca_DRBx01	78.95	13.04	9.50	**0.0477894**	1.98E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0501	0.00	0.00	2.00	**0.0313023**	-2.15E+00
DRB_1=Eqca_DRBx03	48.24	35.65	42.50	**0.0241102**	-2.26E+00
DRB_2=Eqca_DRBx04	41.03	13.91	19.50	**0.0229653**	-2.27E+00
mje=Vinkovci	0.00	0.00	3.50	**0.0021612**	-3.07E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0401	14.29	1.74	7.00	**0.0008815**	-3.33E+00
mje=Zupanja	20.00	3.48	10.00	**0.0004453**	-3.51E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0201	9.30	3.48	21.50	**1.691E-13**	-7.37E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0301	7.14	2.61	21.00	**2.173E-14**	-7.64E+00

DRB_HH	*Cla/Mod*	*Mod/Cla*	*Global*	*p*	***V***
Het					
DRB_2=Eqca_DRBx06	75.76	45.45	16.50	**2.322E-10**	6.34E+00
DRB_1=Eqca_DRBx03	48.24	74.55	42.50	**1.941E-08**	5.62E+00
DRB_2=Eqca_DRBx04	64.10	45.45	19.50	**8.404E-08**	5.36E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0201	87.50	12.73	4.00	**0.0005782**	3.44E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0301	80.00	14.55	5.00	**0.0006509**	3.41E+00
pas=lipicanac	71.43	9.09	3.50	**0.0197606**	2.33E+00
Aust=not.Aust	29.10	100.00	94.50	**0.0260878**	2.22E+00
mje=Pozega	60.00	10.91	5.00	**0.0330245**	2.13E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0101	22.73	54.55	66.00	**0.039492**	-2.06E+00
Aust=Aust	0.00	0.00	5.50	**0.0260878**	-2.22E+00
mje=Vrbovec	8.70	3.64	11.50	**0.0260028**	-2.23E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0101	22.70	58.18	70.50	**0.0222622**	-2.29E+00
DRB_2=NN	0.00	0.00	6.50	**0.013085**	-2.48E+00
DRB_1=NN	0.00	0.00	6.50	**0.013085**	-2.48E+00
DRB_1=Eqca_DRBx01	5.00	1.82	10.00	**0.0116841**	-2.52E+00
DRB_2=Eqca_DRBx02	0.00	0.00	7.00	**0.0092365**	-2.60E+00
DRB_1=Eqca_DRBx02	0.00	0.00	7.00	**0.0092365**	-2.60E+00
pas=HP	4.76	1.82	10.50	**0.0084995**	-2.63E+00
DRB_2=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**0.0045713**	-2.84E+00
DRB_1=Eqca_DRBx11	0.00	0.00	8.00	**0.0045713**	-2.84E+00
DRB_2=Eqca_DRBx01	0.00	0.00	9.50	**0.0015642**	-3.16E+00
DRB_2=Eqca_DRBx03	0.00	0.00	22.00	**8.088E-08**	-5.37E+00
Hom					
DRB_2=Eqca_DRBx03	100.00	30.34	22.00	**8.088E-08**	5.37E+00
DRB_2=Eqca_DRBx01	100.00	13.10	9.50	**0.0015642**	3.16E+00
DRB_2=Eqca_DRBx11	100.00	11.03	8.00	**0.0045713**	2.84E+00
DRB_1=Eqca_DRBx11	100.00	11.03	8.00	**0.0045713**	2.84E+00
pas=HP	95.24	13.79	10.50	**0.0084995**	2.63E+00
DRB_2=Eqca_DRBx02	100.00	9.66	7.00	**0.0092365**	2.60E+00
DRB_1=Eqca_DRBx02	100.00	9.66	7.00	**0.0092365**	2.60E+00
DRB_1=Eqca_DRBx01	95.00	13.10	10.00	**0.0116841**	2.52E+00
DRB_2=NN	100.00	8.97	6.50	**0.013085**	2.48E+00
DRB_1=NN	100.00	8.97	6.50	**0.013085**	2.48E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0101	77.30	75.17	70.50	**0.0222622**	2.29E+00
mje=Vrbovec	91.30	14.48	11.50	**0.0260028**	2.23E+00
Aust=Aust	100.00	7.59	5.50	**0.0260878**	2.22E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0101	77.27	70.34	66.00	**0.039492**	2.06E+00
mje=Pozega	40.00	2.76	5.00	**0.0330245**	-2.13E+00
Aust=not.Aust	70.90	92.41	94.50	**0.0260878**	-2.22E+00
pas=lipicanac	28.57	1.38	3.50	**0.0197606**	-2.33E+00
DRA_2=Eqca_DRAx0301	20.00	1.38	5.00	**0.0006509**	-3.41E+00
DRA_1=Eqca_DRAx0201	12.50	0.69	4.00	**0.0005782**	-3.44E+00

DRB_2=Eqca_DRBx04	35.90	9.66	19.50	**8.404E-08**	-5.36E+00
DRB_1=Eqca_DRBx03	51.76	30.34	42.50	**1.941E-08**	-5.62E+00
DRB_2=Eqca_DRBx06	24.24	5.52	16.50	**2.322E-10**	-6.34E+00

9. ŽIVOTOPIS

Vesna Mojčec Perko, državljanka Republike Hrvatske, rođena je 4. kolovoza 1980. godine u Koprivnici. Osnovnu školu i gimnaziju pohađala je u Križevcima. Studij biologije, smjer molekularne biologije, upisala je 1998.g. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2004.g. i stekla zvanje dipl. inženjera biologije. Od veljače 2004. do srpnja 2006.g. zaposlena je u Veterinarskoj stanici Koprivnica d.o.o u svojstvu voditelja DDD službe. U srpnju 2006.g. zapošljava se na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u svojstvu stručnog savjetnika I vrste - molekularnog biologa na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Uključena je u uvođenje i provođenje molekularne dijagnostike bakterijskih i virusnih zaraznih bolesti na matičnom Zavodu. Sudjeluje u svakodnevnom stručnom radu Laboratorija za leptospire. Uključena je u sve znanstvene djelatnosti matičnog Zavoda iz područja molekularne biologije uzročnika virusnih i bakterijskih zaraznih bolesti. Glavni znanstveni interes joj je vezan uz leptospirozu, te se tako od veljače do lipnja 2007.g. stručno i znanstveno usavršava u Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinskog fakulteta u Ljubljani. Od svibnja do lipnja 2008.g. stručno se usavršava iz područja molekularnog istraživanja leptospiroze u Leptospirosis Research Laboratory, David Geffen School of Medicine, Division of Infectious Diseases, UCLA, USA. Poslijediplomski sveučilišni studij molekularne biologije upisuje 2009.g. na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od iste godine uključena je u uvođenje i održavanje sustava kvalitete (Norma HR EN ISO/IEC 17025) u svojstvu odgovorne osobe za umjeravanje i opremu. Od veljače do ožujka 2012.g. stručno se usavršava iz područja primjene proteomike u istraživanjima leptospiroze u Veterinary Science Centre, Dublin, Irska. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju i European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

Turk R, Habuš J, Flegar-Meštrić Z, Svetina A, **Mojčec V,** Perkov S, Belić M, Starešina V, Turk N (2009) Serum platelet-activating factor acetylhydrolase and paraoxonase-1 activity in horses infected with Leptospira spp. Acta tropica 118. 2: 97-100.

Turk N, Milas Z, **Mojčec V,** Ružić-Sabljić E, Starešina V, Štritof Z, Habuš J, Postic D (2009) Molecular analysis of Leptospira spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism (RFLP), real-time PCR and pulsed-filed gel electrophoresis (PFGE). FEMS microbiology letters 300. 2: 174-179.

Stritof Majetic Z, Galloway R, Ruzic Sabljic E, Milas Z, **Mojcec V**, Habus J, Margaletic J, Pernar R, Turk N(2014) Epizootiological survey of small mammals as Leptospira spp. reservoirs in Eastern Croatia. Acta tropica131: 111-116.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

Turk N, Milas Z, Habuš J, Štritof Majetić Z, **Mojčec Perko V,** Barbić Lj, Stevanović V, Perharić M, Starešina V (2013) Equine leptospirosis in Croatia - occurrence of subclinical infections and abortions. Veterinarski arhiv83. 3: 253-262.

Štritof Majetić Z, Habuš J, Milas Z, **Mojčec Perko V,** Starešina V, Turk N (2012) A serological survey of canine leptospirosis in Croatia - the changing epizootiology of the disease. Veterinarski arhiv 82. S2: 183-191.

Turk N, Milas Z, Habuš J, Štritof Z, **Mojčec V,** Modrić Z, Starešina V, Postic D (2008) Identificiranje i tipiziranje Leptospira spp. primjenom metode raznolikosti dužine restrikcijskih fragmenata rDNK za gen 16S (RFLP) i gel elektroforeze u pulsirajućem polju (PFGE). Infektološki glasnik 28. 4: 173-182.

Ostali radovi u drugim časopisima

Barbić Lj, Stevanović, V Milas Z, Starešina V, Turk N, Štritof Majetić Z, Habuš J, Perharić M, Kovač S, Martinković K, **Mojčec Perko V,** Madić J, Lohman Janković I, Maltar Lj (2014) Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj - značaj i rezultati veterinarske kontrole u javnom zdravstvu. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora 22. 1-2: 24-31.
Barbić Lj, Stevanović V, Milas Z, Starešina V, Turk N, Štiritof Majetić Z, Habuš J, Perharić M, Kovač, S, Martinković, K, **Mojčec Perko V,** Madić, J (2013) Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj- veterinarski aspekt. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora 21. 7-8: 46-54.

Krolo J, Starešina V, Milas Z, Barbić Lj, Štritof Majetić Z, Habuš J, **Mojčec Perko V,** Stevanović V, Perharić M, Turk N (2013) Ileitis u svinja- epizootiooško i kliničko značenje. Hrvatski veterinarski vjesnik - Hrvatska veterinarska komora 21. ½: 22-28.

Štritof Majetić Z, Vnuk D, Barbić Lj, Habuš J, Milas Z, Starešina V, Stevanović V, Perharić M, Martinković K, **Mojčec Perko V,** Turk N (2013) Aspergiloza nosa u pasa. Veterinarska stanica 44. 1: 39-46.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

Turk R, Habuš J, Flegar-Meštrić Z, **Mojčec V,** Svetina A, Perkov S, Robić M, Belić M, Starešina V, Turk, N (2012) Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity and lipid status in horses with subclinical leptospirosis. Abstracts of the 1st Biotechnology World Congress. 14-15 February 2012, Dubai, United Arab Emirates. Objavljeno u: Current Pharmaceutical Biotechnology 13 Foldes- Papp, Z. (ur.). Sharjah: Bentham Science Publishers, 2011. str. 143-143.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

Štritof Majetić Z, Habuš J, Milas Z, **Mojčec Perko V**, Starešina V, Barbić Lj, Perharić, M, Stevanović V, Martinković K, Turk N (2012) Canine leptospirosis in Croatia - alteration of infective serovars. Abstract of the 73rd Congresso Internazionale, Multisala SCIVAC : procedimento. Rimini Italia, 8 - 10 June 2012. str. 553-553.

Drugi radovi u zbornicima skupova s recenzijom

Barbić Lj, Stevanović V, **Mojčec V**, Kovač S, Perharić M, Gašpar A, Turk N, Milas Z, Starešina V; Madić J (2012) Virusni arteritis konja - rezultati provođenja propisanih mjera kontrole bolesti na području Republike Hrvatske (2009. - 2012.). Zbornik radova. Harapin, Ivica (ur.) Hrvatski veterinarski kongres. 10. - 13. studeni 2012. Tuheljske toplice, Hrvatska. str. 263-273.

Sažeci u zbornicima skupova

Konjević D, Habuš J, Sindičić M, Janicki Z, Pavlak M, Milas Z, Štritof-Majetić Z, **Mojčec Perko V,** Srebočan E, Turk N (2013) Leptospirosis in wild boars – lowland vs. hilly habitat, preliminary results. Power of Microbes in Industry and Environment 2013. Teparić R, Frece J, Mrša V, (ur.). Zagreb. Hrvatsko mikrobiološko društvo. 9 - 12 October 2013. Primošten, Croatia. pp. 61-61.

Barbić Lj, Stevanović V, **Mojčec V,** Kovač S, Lojkić I, Bedeković T, Lemo N, Starešina V, Madić J (2012) Influence of persistent infection to molecular diagnostic of equine viral arteritis. Sixth International Congress of Veterinary Virology. Final program and abstract book. Madrid. ESVV. 4 - 7 September 2012. Madrid, Spain. pp. 226-226.

Mojčec Perko V, Turk N, Gillick P, Schuller S, Habuš J, Štritof Majetić Z, Milas Z, Starešina V, Barbić Lj, Turk R, Nally J (2012) Detection of antigens of Leptospira spp. reactive with sera from mares that aborted Abstracts of the European meeting of leptospirosis (Eurolepto 2012). Nenad Turk, Josipa Habuš (ed.). Zagreb. Faculty of Veterinary Medicine. May 30 - June 3 2012. Dubrovnik. pp. 104-105.

Habuš J, Kusak J, Huber Đ, **Mojčec V,** Štritof Z, Milas Z, Starešina V, Barbić Lj, Stevanović V, Turk N (2011) Involvement of grey wolf (*Canis lupus*) in transmission and maintenance of *Leptospira* spp. Congress Abstracts of the 4th Congress of European Microbiologists (FEMS 2011). 26- 30 June 2011. Geneva, Switzerland.

Habuš J, **Mojčec V,** Štritof Z, Milas Z, Starešina V, Tadin A, Markotić A, Beck R, Margaletić J, Vucelja M, Bjedov L, Turk N (2011) Rodents as reservoirs of multiple pathogens - is one etiological diagnosis enough? Abstracts of the VIIth Meeting of the International Leptospirosis Society. 19 - 22 September 2011. Merida, Mexico. pp. 19-19.

Hađina S, Pinter Lj, **Mojčec V,** Reljić S, Vujaklija D (2011) *Malassezia pachydermatis* in isolates from bears and wolves. Power of Fungi and Mycotoxinsin Health and Disease: Programme and abstracts. Antolović R, Miličević T (ur.) Zagreb. Croatian Microbiological Society. 19 - 22 October 2011. Primošten, Croatia. pp. 64-54.

Puh S, Barbić Lj, **Mojčec V,** Stevanović V, Martinković K, Perharić M, Starešina V (2011) Specificity and sensitivity evaluation of rapid diagnostic tests for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infection. Book of Abstracts of The International Congress Veterinary Science and Profession. Maltar-Strmečki N, Severin K, Slavica A (ur.) Zagreb. Faculty of Veterinary Medicine. 3 - 4 October 2011. Zagreb, Croatia. pp. 43-43.

Milas Z, Habuš J, Štritof Z, **Mojčec V,** Starešina V, Slavica A, Turk N (2010) The role of wild boar (*Sus scrofa*) and red fox (*Vulpes vulpes*) as potential reservoirs of serovar Australis in northwest Croatia. Spiroquetes 2010. Abstracts. IPK Havana, Kuba (ed.). 5 - 7 May 2010. Havana, Kuba.

Turk R, Habuš J, Flegar-Meštrić Z, Svetina A, **Mojčec V,** Perkov S, Robić M, Belić M, Starešina V, Turk N (2010) Paraoxonase-1 activity in horses infected with *Leptospira* spp. 4th International Conference on Paraoxonases. Abstract Book. 7 - 10 September 2010. La Pineda, Vilaseca, Catalonia, Spain.

Milas Z, **Mojčec V,** Starešina V, Štritof Z, Habuš J, Barbić Lj, Stevanović V, Turk, N (2009) Occurrence of antibodies against *Leptospira* spp. in sport and leisure horses in Croatia. 6th Annual Scientific Meeting of International Leptospirosis Society (ILS). Leptocon, 2009. Abstracts. Nainan GK (ed.) 21 - 24 September 2009. Cochin, India. P6-P6.

Turk N, Milas Z, **Mojčec V,** Ružić- Sabljić E, Margaletić J, Starešina V, Štritof Z, Modrić Z, Postic D (2007) Genetic diversity among *Leptospira* spp. clinical strains isolated from humans in Croatia. 5th Meeting of the International Leptospirosis Society. Abstracts. International Leptospirosis Society (ed.) 17 - 20 September 2007. Quito, Ecuador. Universidad San Francisco. pp. 51-51.