

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

Kristina Blažeković

**GENETSKA STRUKTURA I POPULACIJSKA
DINAMIKA OBLIĆA *ANISAKIS* SPP. IZOLIRANIH IZ
KITOVA ZUBANA (ODONTOCETI) JADRANSKOG
MORA**

Diplomski rad

Split, travanj 2013.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

**GENETSKA STRUKTURA I POPULACIJSKA
DINAMIKA OBLIĆA *ANISAKIS* SPP. IZOLIRANIH IZ
KITOVA ZUBANA (ODONTOCETI) JADRANSKOG
MORA**

Diplomski rad

Predmet: Parazitologija morskih organizama

Mentor:

Prof. dr. sc. Ivona Mladineo

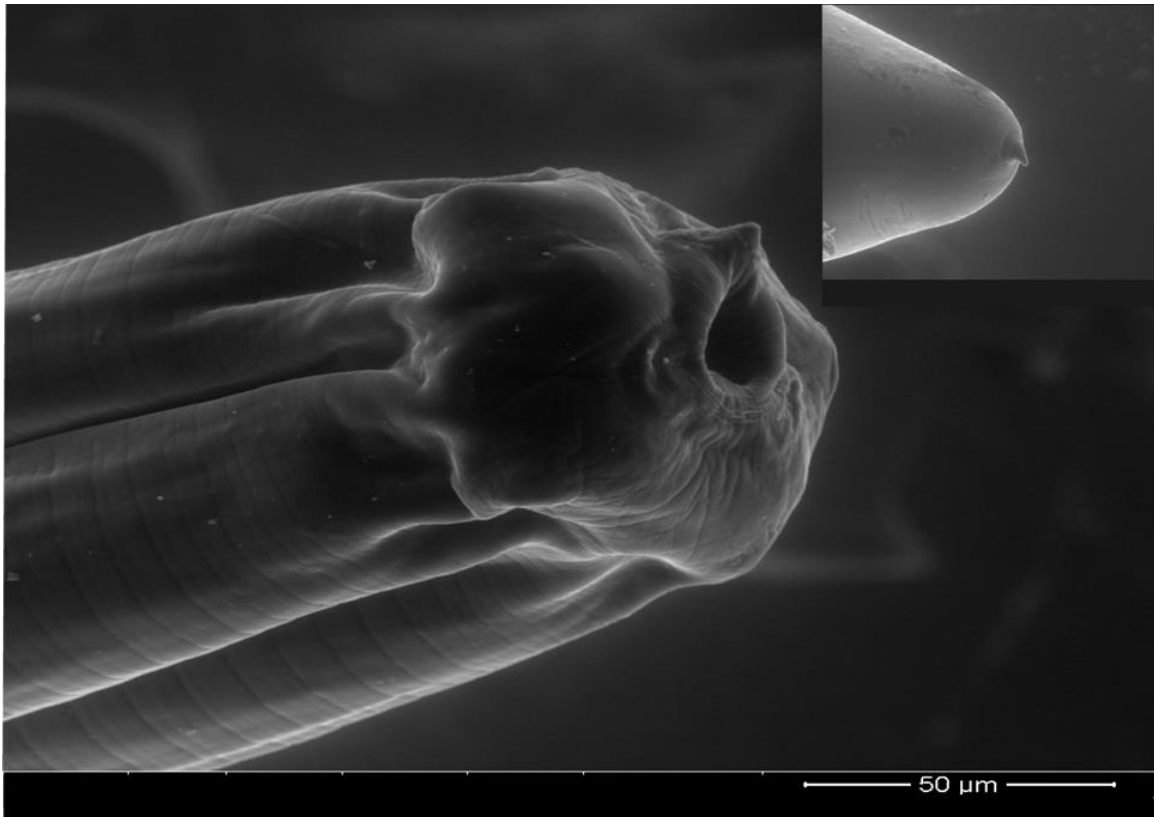
Komentor:

Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić

Student:

Kristina Blažeković

Split, travanj 2013.



Slika ličinke 3. stadija vrste *Anisakis* spp. iz Jadranskog mora rađena (*environmental*) SEM tehnikom

Fotografiju pripremila: Tea Zubin Ferri, dipl. konz., mag. chem.
Istarska razvojna agencija (IDA) d.o.o.
Centar za istraživanje metala Istarske županije - METRIS

Zahvale:

Od srca se zahvaljujem prof. dr. sc. Ivoni Mladineo i doc. dr. sc. Martini Đuras što su mi omogućile da radim upravo na ovoj temi istraživanja za diplomski rad i time ostvarim svoje snove. Mojim mentoricama također zahvaljujem na svom prenesenom znanju, razumijevanju i podršci tijekom istraživanja i izrade rada. Prof. dr. sc. Mladineo posebno zahvaljujem na uvođenju u fascinantan svijet nametnika i molekularnih istraživanja, a doc. dr. sc. Đuras na brojnim prilikama upoznavanja s istraživanjima morskih sisavaca u praksi.

Najljepše hvala doc. dr. sc. Tomislavu Gomerčiću što mi je omogućio sudjelovanja u terenskim istraživanjima dobrih dupina u Jadranskom moru na kojima su djetinji snovi o društvu dupina postali stvarnost. Ivani Lepen Pleić zahvaljujem na trudu, velikoj strpljivosti i pomoći pri molekularnom dijelu istraživanja. Dr. sc. Darinki Škrtić hvala na strpljenju i pomoći oko uzoraka, te moralnoj podršci i prijateljstvu. Mom životnom partneru, Goranu, posebna zahvala na svim oblicima podrške i motivaciji tijekom izrade ovog rada, kao i tijekom cijelog studija. Zahvaljujem majci, ocu, bratu i prijateljima na podršci i vjeri u mene i moje snove.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Biologija i ekologija mora

Diplomski rad

GENETSKA STRUKTURA I POPULACIJSKA DINAMIKA OBLIĆA *ANISAKIS* SPP. IZOLIRANIH IZ KITOVA ZUBANA (ODONTOCETI) JADRANSKOG MORA

Kristina Blažeković

Sažetak

Cilj predstavljenog istraživanja je bio identificirati vrste roda *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) iz krajnjih domaćina u Jadranskom moru, te istražiti genetsku strukturu i populacijsku dinamiku najbrojnije vrste nametnika. Oblici pripadajućih morfoloških osobina roda *Anisakis* su prikupljeni iz gastrointestinalnog trakta lešina 4 vrste kitova zubana (Odontoceti): dobri dupin (*Tursiops truncatus*), plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavati dupin (*Grampus griseus*) i krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*), pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora u razdoblju od 1999. do 2012. godine. Mjere populacijske dinamike nametnika su određene na 181 jedinki domaćina. Identifikacija vrsta roda *Anisakis* provedena je molekularnom analizom 165 jedinki izdvojenih iz 26 kitova zubana, na temelju umnažanja fragmenta mitohondrijske DNK, lokusa za citokrom oksidazu podjedinice 2 (COII), dužine oko 600 bp pomoću lančane reakcije polimeraze. Prevalencija nametnika u kitovima zubanima (N=181) iznosila je 28,73%, odnosno 31,90% bez domaćina starosti do godinu dana (N=163). Srednja abundancija oblića u 163 domaćina iznosila je 1209,96, a srednji intenzitet 3781,13 oblića po pojedinom zaraženom domaćinu. Najveća prevalencija nametnika utvrđena je u plavobijelih dupina (52%), zatim u glavatih i krupnozubih (50%), a najmanja u dobrim dupina (26,92%). Filogenetskom analizom je utvrđena prisutnost tri vrste roda *Anisakis* u kitovima uginulim u Jadranskom moru: *A. pegreffii* (96,73%), *A. simplex* (1,96%) i *A. physeteris* (1,31%). Posljednje dvije vrste su prvi puta utvrđene na području Jadranskog mora. Analizom molekularne raznolikosti vrste *A. pegreffii* (N=148) utvrđeno je 47 polimorfni mjesta, 38 haplotipova, visoka raznolikost haplotipova ($h=0,6360 \pm 0,0471$), te niska nukleotidna raznolikost ($\pi=0,004520 \pm 0,002706$).

(119 stranica, 29 slika, 22 tablice, 122 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Anisakis pegreffii*, genetska struktura, populacijska dinamika, dupin, Jadran

Mentor: Prof. dr. sc. Ivona Mladineo, izvanredni profesor

Komentor: Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić, docent

- Ocjenjivači:**
1. Doc. dr. sc. Mirela Petrić, docent
 2. Doc. dr. sc. Martina Đuras Gomerčić, docent
 3. Prof. dr. sc. Ivona Mladineo, izvanredni profesor

University of Split
Department of Marine Studies
Graduate study of Marine Biology and Ecology

MSc Thesis

**GENETIC STRUCTURE AND POPULATION DYNAMICS OF THE *ANISAKIS* SPP.
NEMATODE ISOLATED FROM TOOTHED WHALES (ODONTOCETI) OF THE
ADRIATIC SEA**

Kristina Blažeković

Abstract

The purpose of the presented research was to identify *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) species from definitive hosts in the Adriatic Sea, and to investigate genetic structure and population dynamics of the most abundant parasite species. Nematodes showing morphological features of genus *Anisakis* were isolated from gastrointestinal tract of 4 toothed whale species (Odontoceti): bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*), Risso's dolphin (*Grampus griseus*) and Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*), stranded in the Croatian part of the Adriatic Sea from 1999 to 2012. Parasite population dynamics values were determined on 181 hosts. *Anisakis* species identification was conducted by molecular analysis of 165 samples, isolated from 26 toothed whales, by amplification of 600 bp long mitochondrial DNA fragment, locus for cytochrome oxidase subunit 2 (COII) by polymerase chain reaction. Overall prevalence in toothed whales (N=181) was 28.73%, and 31.90% when excluding one-year old host (N=163). Mean abundance in 163 hosts was 1209.96 and mean intensity 3781.13 of parasites per infected host. Striped dolphins had the highest prevalence (52%), then Risso's dolphins and Cuvier's beaked whales (50%), while bottlenose dolphins had the lowest value (26.92%). Phylogenetic analysis indicated presence of three *Anisakis* species in stranded cetaceans of Adriatic Sea: *A. pegreffii* (96.73%), *A. simplex* (1.96%) and *A. physeteris* (1.31%). Last two species were detected for the first time in the Adriatic area. Molecular diversity analysis of *A. pegreffii* (N=148) detected 47 polymorphic sites, 38 haplotypes, high haplotype diversity ($h=0.6360 \pm 0.0471$) and low nucleotide diversity ($\pi=0.004520 \pm 0.002706$).

(119 pages, 29 figures, 22 tables, 122 references, original in: Croatian)

Keywords: *Anisakis pegreffii*, genetic structure, population dynamics, dolphin, Adriatic Sea

Supervisor: Ivona Mladineo, PhD / Associate Professor

Co-supervisor: Martina Đuras Gomerčić, PhD / Assistant Professor

Reviewers:

1. Mirela Petrić, PhD / Assistant Professor
2. Martina Đuras Gomerčić, PhD / Assistant Professor
3. Ivona Mladineo, PhD / Associate Professor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ekologija nametnika roda <i>Anisakis</i> Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae)	1
1.1.1. Rod <i>Anisakis</i> Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae)	1
1.1.2. Rasprostranjenost	3
1.1.3. Morfologija roda <i>Anisakis</i>	5
1.1.3.1. Jaja i ličinke stadija 1 i 2	5
1.1.3.2. 3. stadij ličinke	6
1.1.3.3. 4. stupanj ličinke	8
1.1.3.4. Odrasli stadiji	9
1.1.4. Životni ciklus	12
1.1.5. Molekularna identifikacija vrsta roda <i>Anisakis</i>	15
1.1.6. Patogenost roda <i>Anisakis</i>	16
1.2. Cetacea (Kitovi)	18
1.2.1. Odontoceti	19
1.2.1.1. Morfologija i ekologija	19
1.2.1.2. Biologija vrste krupnozobog dupina, <i>Ziphius cavirostris</i> (Cuvier, 1823) ..	21
1.2.1.3. Biologija vrste glavatog dupina, <i>Grampus griseus</i> (Cuvier, 1812)	22
1.2.1.4. Biologija vrste plavobijelog dupina, <i>Stenella coeruleoalba</i> (Meyen, 1833) ..	23
1.2.1.5. Biologija vrste dobri dupin, <i>Tursiops truncatus</i> (Montagu, 1821)	24
1.2.1.6. Vrste kitova u Jadranskom moru	25
1.2.1.7. Dobri dupin u Jadranskom moru	26
1.2.1.8. Mjere zaštite kitova u Jadranskom moru	27
1.3. Specifičnost odnosa vrsta roda <i>Anisakis</i> i krajnjih domaćina	28
1.4. Dosadašnja istraživanja	29
1.4.1. Istraživanja roda <i>Anisakis</i> u Jadranskom moru	29
1.5. Svrha i ciljevi rada	30
2. MATERIJALI I METODE	31
2.1. Prikupljanje uzoraka	31

2.2.	Morfološka identifikacija nametnika roda <i>Anisakis</i>	32
2.3.	Analiza populacijske dinamike i brojnosti nametnika.....	34
2.3.1.	Metode procjene populacijske dinamike oblića <i>Anisakis</i> spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora.....	34
2.3.2.	Brojnost nametnika po domaćinu.....	36
2.3.3.	Korelacije broja nametnika s biološkim osobinama domaćina	37
2.4.	Molekularna analiza	38
2.4.1.	Izolacija DNK	38
2.4.2.	Lančana reakcija polimerazom (PCR, <i>Polymerase chain reaction</i>)	40
2.4.3.	Elektroforeza PCR produkata.....	41
2.4.4.	Pročišćavanje PCR produkata i sekvenciranje	42
2.5.	Analiza dobivenih sekvenci mitohondrijske DNK nametnika <i>Anisakis</i> spp.	43
2.5.1.	Genetska raznolikost i populacijska struktura haplotipova vrste <i>Anisakis pegreffii</i>	43
2.5.2.	Filogenetska analiza haplotipova vrste <i>Anisakis pegreffii</i>	46
2.5.3.	Filogenetska analiza vrsta roda <i>Anisakis</i> korištenjem BI (<i>Bayesian inference</i>) analize	47
3.	REZULTATI.....	48
3.1.	Rezultati populacijske dinamike i brojnosti nametnika.....	48
3.1.1.	Zaraženost kitova zubana nametnikom <i>Anisakis</i> spp. u hrvatskom dijelu Jadranskog mora	48
3.1.2.	Populacijska dinamika oblića <i>Anisakis</i> spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora.....	51
3.1.3.	Brojnost nametnika <i>Anisakis</i> spp. po domaćinu.....	57
3.1.4.	Korelacije broja nametnika s biološkim osobinama domaćina	59
3.2.	Rezultati molekularne analize	64
3.2.1.	Uspješnost i rezultati molekularne identifikacije vrsta roda <i>Anisakis</i>	64
3.2.2.	Genetska raznolikost vrste <i>Anisakis pegreffii</i> u ukupnom uzorku i u populacijama odvojenim prema vrsti domaćina	66
3.2.3.	Genetska struktura populacija <i>Anisakis pegreffii</i> s obzirom na vrste domaćina	80
3.2.4.	Demografska povijest.....	81
3.2.5.	Filogenetski odnosi haplotipova vrste <i>Anisakis pegreffii</i>	85
3.2.6.	Rezultati BI (<i>Bayesian inference</i>) analize	87
4.	RASPRAVA	90

4.1. Populacijska dinamika oblića <i>Anisakis</i> spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora	90
4.2. Genetska struktura oblića <i>Anisakis</i> spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora	94
5. ZAKLJUČCI.....	102
6. LITERATURA	105
7. PRILOZI	115
7.1. Prilog 1	115
7.2. Prilog 2	119

1. UVOD

1.1. Ekologija nametnika roda *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae)

1.1.1. Rod *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae)

Oblici porodice Anisakidae su prvi put izolirani u 13. stoljeću, najvjerojatnije iz riba, iako ne postoje pisani tragovi iz kojih vrsta. U morskim sisavcima su zabilježeni početkom 18. stoljeća, a kao povremeni uzročnici oboljenja ljudi, tek 1867. godine. Uobičajenim uzročnikom bolesti čovjeka, ovi oblici se smatraju tek od 1950. i 1960. godine (Myers, 1976). Rod *Anisakis* se nalazi unutar nadporodice Ascaridoidea (koljeno oblića), koju ukupno čini 52 roda s vrstama koje su uglavnom nametnici probavnog sustava kralježnjaka (Mattiucci i Nascetti, 2008). Pripadnici roda *Anisakis* su nametnici morskih sisavaca, prvenstveno kitova u čijem probavnom sustavu završavaju životni ciklus. Morski sisavci se invadiraju ovim nametnicima jedući paratenične domaćine kao što su ribe i glavonošci u kojima se mogu naći ličinački stadiji oblića (Smith i Wootten, 1978). Taksonomija roda *Anisakis* Dujardin 1845 (Nematoda, Anisakidae) je prikazana u Tablici 1. gdje je vidljivo postojanje 9 vrsta koje su do danas utvrđene molekularnim metodama (Mattiucci i Nascetti, 2008; Mattiucci i sur., 2009).

Tablica 1. Taksonomija roda *Anisakis* Dujardin, 1845 sa vrstama koje su do danas utvrđene.

Carstvo	Animalia	
Koljeno	Nematoda	
Razred	Secernentea	
Red	Ascaridida	
Porodica	Anisakidae	
Rod	<i>Anisakis</i> Dujardin, 1845	
Vrsta	<i>Anisakis</i> tip I	<i>A. simplex</i> kompleks [<i>A. simplex</i> (<i>sensu stricto</i>), <i>A. pegreffii</i> i <i>A. simplex C</i>], <i>A. typica</i> , <i>A. ziphidarum</i> i <i>A. nascettii</i>
	<i>Anisakis</i> tip II	<i>A. physeteris</i> kompleks [<i>A. physeteris</i> , <i>A. brevispiculata</i> i <i>A. paggiae</i>]

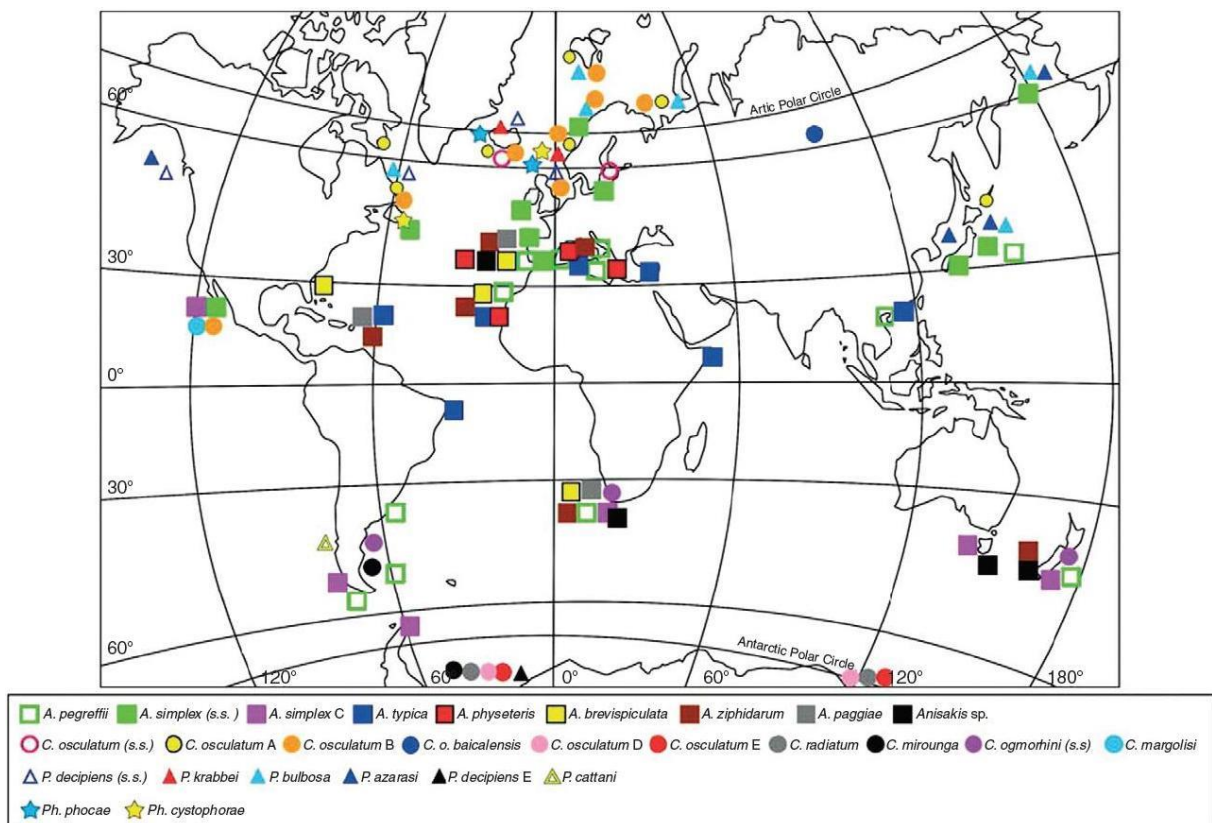
Prije uvođenja molekularnih tehnika u svrhu identifikacije vrsta, postojala su različita mišljenja o broju vrsta unutar roda *Anisakis*. Od 21 ranije opisane vrste Davey (1971) u svojoj

reviziji smatra valjanim samo tri: *A. simplex*, *A. typica* i *A. physeteris*. Dio ostalih opisanih vrsta (14) smatra sinonimima tri navedene vrste, a status 4 vrste: *A. alexandri*, *A. schupakovi*, *A. dussumierii* i *A. insignis* ostavlja neriješenim zbog manjka podataka. Razlog tome je vrlo mali broj morfoloških osobina koje bi bile od taksonomske važnosti u identifikaciji vrsta. Nadalje, osobine ekskretornog sustava, probavnog trakta, broj i smještaj bradavica zadnjeg dijela tijela u mužjaka, dužina spikula i smještaj stidnice su upotrebljive samo u identifikaciji odraslih jedinki i prvenstveno mužjaka, što otežava identifikaciju svih jedinki do razine vrste. Prema Berlandu (1961) ličinke roda *Anisakis* imaju također morfološke osobine (dužina ventrikulusa i prisutnost/odsutnost repića - mukrona) pomoću kojih se svrstavaju u *Anisakis* tip 1 i *Anisakis* tip 2 ličinke. Međutim, navedene osobine ličinki se nisu pokazale dovoljno pouzdanima i točnima u identifikaciji do razine vrste (Mattiucci i Nascetti, 2008).

Zadnjih dvadesetak godina se identifikacija vrsta roda *Anisakis* uspješno provodi različitim molekularnim i/ili biokemijskim metodama. Broj utvrđenih vrsta prvenstveno je porastao otkrićem genetičkih biljega nekoliko sestrinskih vrsta koje su reproduktivno izolirane, a morfološki su vrlo slične (Mattiucci i Nascetti, 2008). Sestrinske vrste se sistematski svrstavaju unutar kompleksa vrsta koji odgovara ranije morfološki prepoznatoj kozmopolitskoj vrsti. Najpoznatiji primjer je *Anisakis simplex* kompleks koji sadrži tri sestrinske vrste: *A. simplex* Rudolphi, 1809 (*sensu stricto*) (Nascetti i sur., 1986), *A. pegreffii* Campana-Rouget i Biocca, 1955 (Nascetti i sur., 1986) i *A. simplex* C Mattiucci i sur. (1997) (Mattiucci i Nascetti, 2006). Dosadašnja istraživanja vrsta ukazuju da je rod *Anisakis* polifiletski i vrlo heterogen. Postojanje dvije glavne grane (grupe) unutar roda je potvrđeno različitim molekularnim metodama. Jedna grana uključuje vrste čiji je ličinački stadij poznat kao *Anisakis* tip 1 (prema Berlandu, 1961), a drugu grupu čine vrste s morfologijom ličinki *Anisakis* tip 2 (prema Berlandu, 1961) (Mattiucci i Nascetti, 2008).

1.1.2. Rasprostranjenost

Čitav životni ciklus nametnika roda *Anisakis* se odvija u morskoj sredini korištenjem homotermnih krajnjih domaćina (morski sisavci), te je njihova rasprostranjenost sukladno time kozmopolitska. Rasprostranjenost pojedinih vrsta *Anisakis* spp. pokazuje različitu geografsku raspodjelu uz djelomična preklapanja areala dviju i više vrsta na nekim područjima. Prikaz karte svijeta s do sada utvrđenom geografskom raspodjelom vrsta nalazi se na Slici 1.



Slika 1. Geografska raspodjela molekularno utvrđenih vrsta *Anisakis* spp. Vrste roda *Anisakis* su označene kvadratom, a boje predstavljaju različite vrste. (Vrste rodova *Pseudoterranova*, *Contracaecum* i *Phocascaris* su označene trokutom, krugom i zvjezdicom). Mjesta na kojima se nalaze oznake odgovaraju točnim lokacijama uzorkovanja iz krajnjih ili intermedijarnih domaćina. (izvor: Mattiucci i Nascetti, 2008)

Budući da su dosadašnja istraživanja ovog roda nametnika vrlo brojna, detaljniji opis areala će biti naveden samo za nekoliko vrsta. Vrste *A. simplex* kompleksa se uglavnom nalaze u Atlantskom oceanu te istočnom i zapadnom Pacifiku sukladno pojavnosti njihovih krajnjih domaćina iz porodice Delphinidae. Distribucija *A. simplex* s.s. je uža unutar

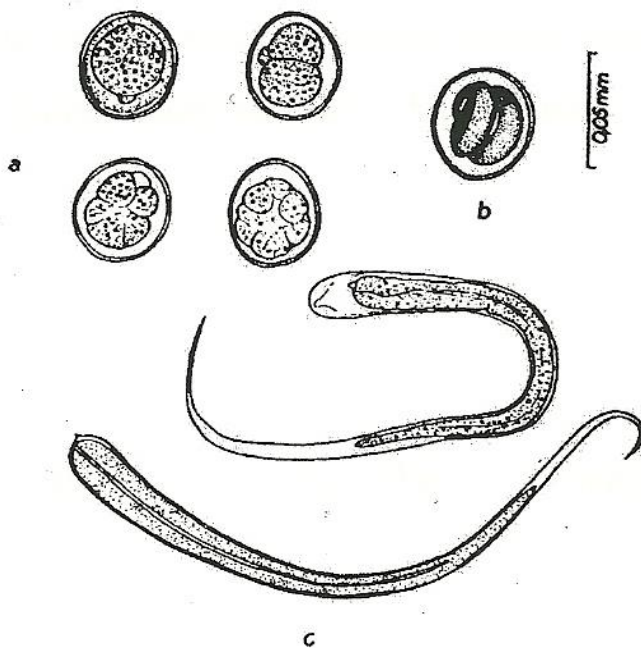
navedenih oceana i nalazi se na sjevernoj hemisferi od 20° sjeverno do iznad Arktičkog polarnog kruga, 80°N (Kuhn i sur., 2011). Granično područje *A. simplex* s.s. je područje Gibraltara, no ponekad se nalazi i u vodama zapadnog Sredozemlja zbog migracija pelagičkih vrsta riba iz Atlantika u Alboransko more (Mattiucci i Nascetti, 2008). Vrsta *A. pegreffii* je rasprostranjena u Jadranskom (Petrić i sur., 2011) i Sredozemnom moru, istočnom Atlantiku, južno do Antarktičkog poluotoka i u vodama Japana i Kine (Kuhn i sur., 2011). Sjeverna granica rasprostranjenja vrste *A. pegreffii* u Atlantiku je obala Pirenejskog poluotoka. Između vrsta *A. simplex* s.s. i *A. pegreffii* su utvrđena simpatrička područja uz Atlantsku obalu Španjolske i Portugala, Alboransko more i vode oko Japana, no zbog reproduktivne izolacije odrasli hibridi dviju vrsta nisu nađeni. Nametnici vrste *A. physeteris* se nalaze u Sredozemlju i središnjem dijelu Atlantskog oceana (Mattiucci i Nascetti, 2008).

1.1.3. Morfologija roda *Anisakis*

Morfološke osobine su upoznate proučavanjem jedinki iz laboratorijskog uzgoja (*in vitro*) Grabde (1976) koja detaljno opisuje sve razvojne stadije nametnika roda *Anisakis*.

1.1.3.1. Jaja i ličinke stadija 1 i 2

Jajašca roda *Anisakis* imaju glatku, tanku i prozirnu ljusku, a variraju u veličini od 39 do 42 x 41 do 43 μm (Slika 2a.). Nakon 2 do 5 dana unutar jaja su vidljive savijene i pokretne ličinke 1. stadija (Slika 2b.). Ličinke se u jajetu prvi put presvlače prelazeći u drugi stadij, no ne izlaze iz plašta kutikule, te on ostaje obavijen oko tijela i nakon izlaska iz jajeta. Ličinke 2. stadija nakon izlaska iz jajne ljuske su pokretne i plivaju u vodi savijanjem tijela. Plašt kutikule koji ih obavija ima fine poprečne pruge i najbolje se uočava u području repa (Slika 2c.) gdje je tijelo ličinke kraće od plašta. Smatra se da je prisutnost opisanog ličinačkog plašta u drugom stadiju ličinke stalna osobina ove grupe oblića.



Slika 2. Razvojni stadiji oblića roda *Anisakis*. a) oplođena jajašca u različitim stupnjevima diobe, b) ličinka 1. stadija u jajetu, c) ličinka 2. stadija izvan jajeta, omotana plaštem kutikule prijašnjeg stadija (razvoj od 1. do 3. stadija prema Grabdi, 1976).

Tijelo ličinki je najšire u prednjem dijelu, a postepeno se sužava prema kraju. Plašt kutikule formira dug i šiljat rep unutar kojeg se vidi kraći i ne toliko zašiljen završetak tijela.

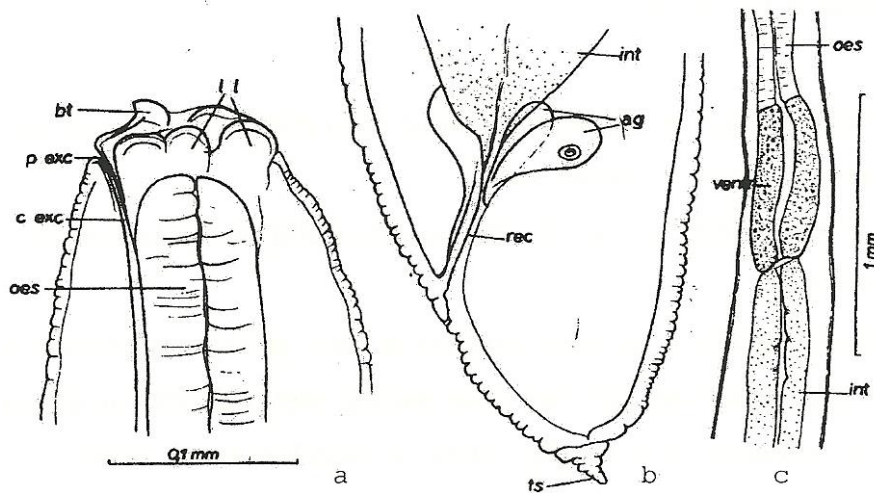
Zubić za bušenje je smješten blago asimetrično na vrhu glave, na kojoj se ne vide naznake budućih usana. Unutranji organi su slabo razvijeni pa probavilo čine jednjak u obliku tankog kanala i slabo razvijeno crijevo. Ličinke su s plaštom kutikule duge od 297 do 351 μm , najveće debljine u prednjem dijelu od 20 do 23 μm . Mjereno bez plašta dužina ličinki 2. stadija je manja, od 281 do 293 μm . Ličinke 2. stadija odbacuju plašt kutikule tek nakon što ih pojede prvi intermedijarni domaćin (Grabda, 1976). Køie i suradnici (1995) su na jajima oblića iz sjevernog Atlantika utvrdili drugačiji obrazac presvlačenja u kojem ličinka napušta jajašce tek u trećem stadiju (detaljnije opisano u životnom ciklusu nametnika).

1.1.3.2. 3. stadij ličinke

Ličinke 3. stadija se nalaze u parateničnim domaćinima, najčešće spiralno posložene ispod serozne ovojnice organa trbušne šupljine. Ponekad se nađu izvan ovojnice, prednjim dijelom tijela u hipaksijalnim mišićima, dok zadnjim vire slobodne u trbušnoj šupljini, ili su u potpunosti okružene mišićima domaćina. Ličinke su biserno bijele boje, a dužina im varira od 19 do 28 mm (mjereno u *in vitro* uzgoju) s promjerom središnjeg dijela tijela od 0,3 do 0,5 mm. Kutikula je prozirna s blagim poprečnim prugama. Osnovna struktura u identifikaciji ličinki 3. stadija je zubić za bušenje jajne ovojnice (Slika 3a.) koji se nalazi na vrhu glave, pomaknut malo leđno, uz tri vrlo slabo razvijene usne (jedna leđna i dvije trbušno-postrane). Malo ispod zubića i između trbušno-postranih usana se nalazi otvor kanalića jednostanične žlijezde za izlučivanje koja na tom mjestu završava. Spomenuta žlijezda se proteže uzduž trbušne strane, pomaknuta malo u lijevo od središta, uz jednjak, želudac i prednji dio crijeva i dobro se vidi u živih ličinki kao tamna pruga. Na trbušnoj strani, u predjelu crijeva, žlijezda za izlučivanje je povezana s lijevom lateralnom hipodermalnom prugom, a prema prednjem dijelu tijela ta veza nestaje.

Probavna cijev iza usnog otvora se nastavlja u mišićni jednjak, čija dužina ovisi o veličini ličinke, a u jedinki uzgajanih u laboratoriju je iznosila od 1,8 do 2,8 mm. Jednjak okružuje ganglijski prsten koji se dobro vidi na udaljenosti od 0,25 do 0,27 mm od vrha glave. Od četiri hipodermalne pruge, trbušna i leđna su slabo razvijene. Dvije lateralne pruge imaju suženu bazu i dva režnja koji strše u šupljinu tijela. Žljezdani dio jednjaka, dužine od 0,6 do 0,8 mm, se naziva želudac (*ventriculus*), i povezan je s crijevom kosim spojem (Slika 3c.). Lumen čitave probavne cijevi (jednjak, želudac i crijevo) ima triradijalan oblik. U ličinki 3. stadija crijevo je prazno, i ne ispunjava čitavu širinu pseudocoela. Probavni kanal koji je

sužen i bez čestica hrane dokazuje da se ličinke u ovom stadiju života ne hrane. Rektum se sastoji od kratkog kanala s debelim slojem kutikule i smješten je ukošeno prema anusu. Oko rektuma su smještene tri velike kruškolike stanice, analne žlijezde. Na kratkom i koničnom repu 3. stadija se nalazi pomičan nastavak, repić ili mukron koji je druga važna struktura u identifikaciji oblića (Slika 3b.).



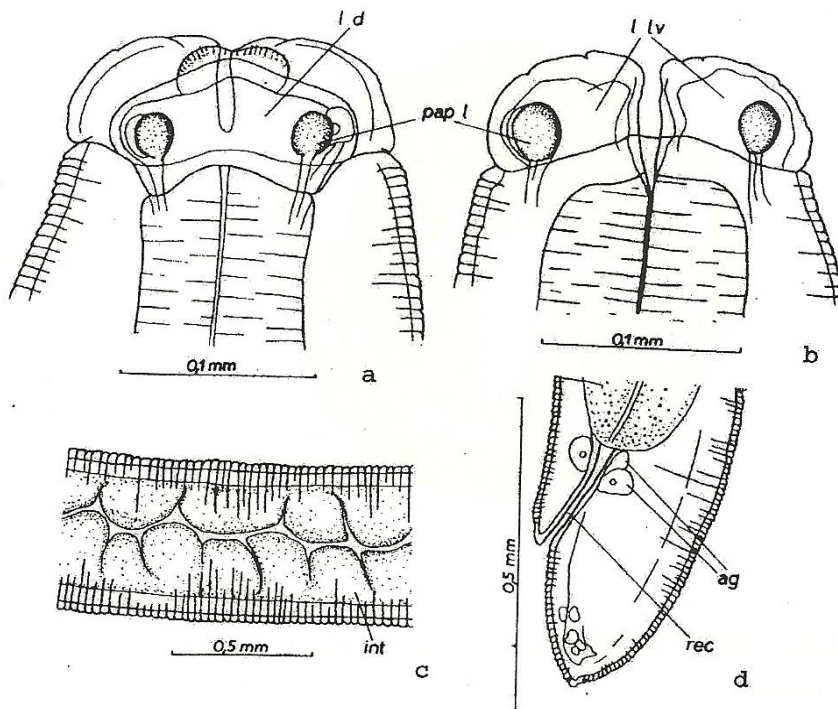
Slika 3. Morfologija ličinke 3. stadija roda *Anisakis*. a) prednji dio ličinke: bt- zubić za bušenje, l- usna, p exc- otvor ekskretornog kanalića, c exc- ekskretorni kanalić, oes- jednjak; b) stražnji dio ličinke: int- crijevo, ag- analne žlijezde, rec- rektum, ts- repić (mukron); c) dio tijela ličinke u području želuca: ventr – *ventriculus* (Grabda, 1976).

Navedene osobine 3. stadija odgovaraju opisu ličinki *Anisakis* tip 1 kojeg je naveo Berland (1961). Smatra se da ličinke trećeg stadija mogu preživjeti anabiotske uvjete međudomaćina duže vrijeme, dok se ne nađu u odgovarajućem krajnjem domaćinu. U eksperimentalnim uvjetima, ličinke koje su ostavljene u fiziološkoj otopini natrij-klorida (0,65 % NaCl) na 2°C su preživjele i do 8,5 mjeseci. Pretpostavlja se da ličinke u prirodnim uvjetima preživljavaju duže nego što je utvrđeno eksperimentom (Grabda, 1976).

1.1.3.3. 4. stupanj ličinke

Četvrti stadij ličinke nastupa presvlačenjem i prvim uzimanjem hrane iz probavnog sustava krajnjeg domaćina. Dužina varira od 25 do 31 mm, a debljina središnjeg dijela tijela od 0,45 do 0,7 mm. Kutikula ima jače izražene poprečne pruge od prethodnog stadija (Grabda, 1976). Ličinke ovog stadija više nisu bijele zbog čestica hrane koje ispunjavaju probavilo, te se boja ličinki kreće od žute do svjetlo smeđe.

Na glavi ličinke se nalaze tri dobro razvijene usne, slične usnama odraslih. Leđna usna ima dvije velike bradavice (*papillae*) sa svake strane, dok trbušno-postrane usne imaju po jednu bradavicu (Slika 4a. i 4b.). Svaka usna ima na rubu nježno nazubljen greben, usmjeren prema središtu. Ličinke 4. stupnja nemaju na glavi zubić za bušenje jajne ovojnice. Završetak tijela je kratak i okrugao s malim čvorom umjesto repića (mukrona). Zubić za bušenje i mukron nedostaju zbog odbacivanja kutikule (presvlačenja) na kojoj su te strukture bile pričvršćene u ličinki 3. stupnja.



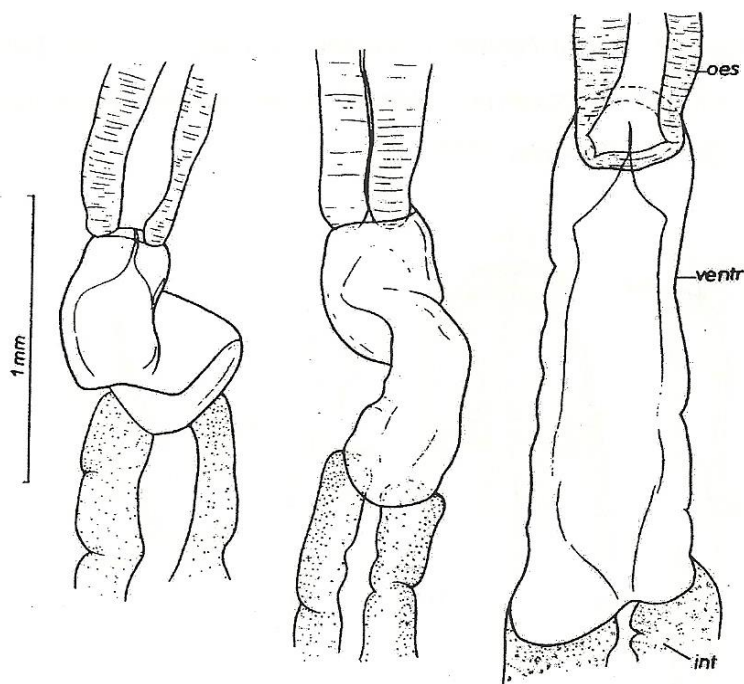
Slika 4. Morfologija 4. stupnja ličinki roda *Anisakis*. a) prednji dio ličinke dorzalno: l d - leđna usna, pap l - bradavice usne; b) prednji dio ličinke ventralno: l lv - ventrolateralne (trbušno-postrane usne), pap l - usne bradavice; c) dio tijela ličinke 4. stadija: int - crijevo; d) stražnji dio ličinke: ag - analne žlijezde, rec - rektum (Grabda, 1976).

Jednjak je nešto duži nego kod prethodnog stadija (2,2 do 2,4 mm), a ganglijski prsten se također nalazi udaljenije od vrha glave (0,27 do 0,37 mm). Hipodermalne pruge su građene jednako 3. stadiju. Žlijezda za izlučivanje je u području crijeva spojena s lijevom lateralnom hipodermalnom prugom pomoću uske komisure. Žljezdani dio jednjaka (želudac) je dug od 0,7 do 0,9 mm. Lumen crijeva je dobro vidljiv u obliku sigmoidalnog kanala ispunjenog sadržajem (Slika 4c.). Rektum je kratak i debelim kutikularnim slojem završava u anusu. Uz rektum su smještene velike jednostanične analne žlijezde, dvije leđne i jedna trbušna (Slika 4d.). U laboratorijskim uvjetima ličinke 4. stadija su nakon 12 do 14 dana presvlačenjem dosegle odrasli stadij (Grabda, 1976).

1.1.3.4. Odrasli stadiji

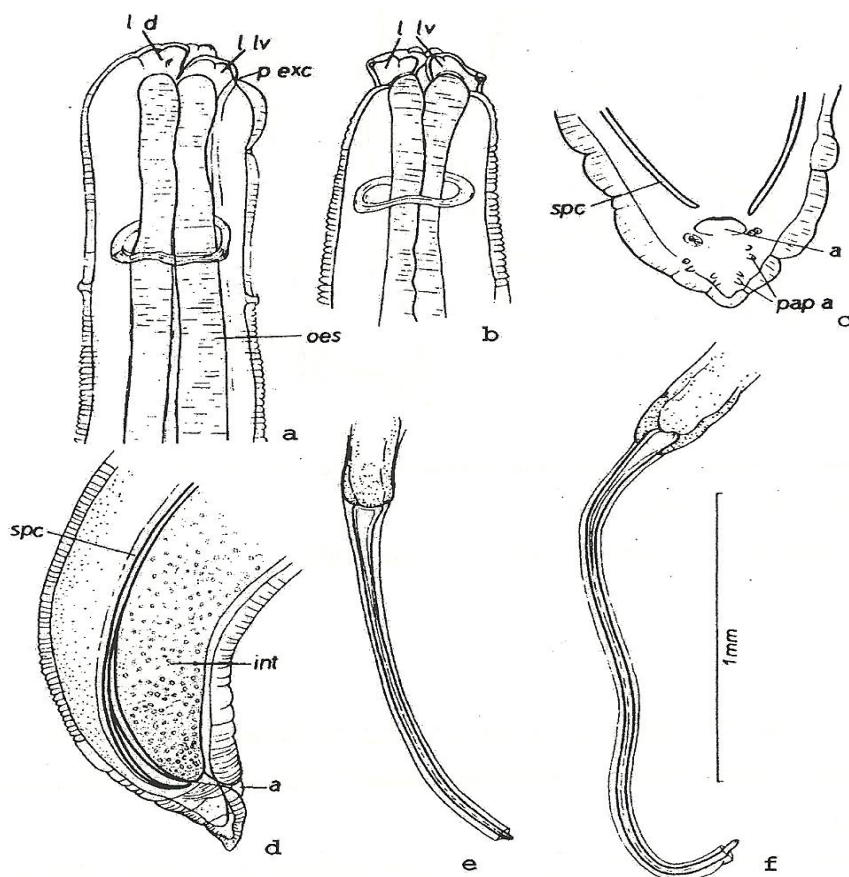
Osobine odraslih primjeraka se podudaraju s opisom roda *Anisakis* Dujardin, 1845, kojeg je u svojoj reviziji iznio Davey (1971). Usta odraslih su okružena jednom velikom leđnom usnom i dvjema manjim trbušno-postranim usnama. Pri bazi leđne usne nalaze se dvije bradavice, dok trbušno-postrane usne imaju po jednu bradavicu. Svaka usna ima dvodijelni zaobljeni nastavak, usmjeren prema naprijed, na kojem se u središtu nalazi greben tvorbi sličnih zubićima. Jednjak je dug, sa želucem cilindričnog ili S oblika koji je ukoso spojen s crijevom (Slika 5.). Želudac (*ventriculus*) i crijevo nemaju privjesaka za razliku od drugih srodnih rodova oblića. Rektum je tanak, kratak i koso položen kanal sa završetkom u anusu. Rep odraslih jedinki roda *Anisakis* je kratak i koničan (Davey, 1971). Kutikula odraslih jedinki je višeslojna, debela i vrlo čvrsta.

Dužina tijela odraslih jedinki varira, a Berland (2006) smatra da je povezana s vrstom, odnosno veličinom krajnjeg domaćina u kojem nametnik sazrijeva. Primjer je vrsta *Anisakis simplex*, nađena u brojnim vrstama kitova (zubana, ali i usana) čiju su različitu dužinu zabilježili Ugland i sur. (2004) mjereći odrasle jedinke iz tri vrste kitova. U najmanjim domaćinima kao što je obalni dupin (*Phocaena phocaena*), srednja dužina oblića se kretala od 5,7 cm (mužjaci) do 7,1 cm (ženke). Dužina oblića većih bjelogrih dupina (*Globicephala melas*) se nalazila u rasponu od 6,8 cm (mužjaci) do 7,3 cm (ženke). Oblići mnogo većih domaćina, patuljastih kitova (*Balaenoptera acutorostrata*) iz skupine kitova usana, su imali najviše vrijednosti srednje dužine, mužjaka od 10,6 cm i ženki od 12,6 cm (raspona od 6,4 do 24 cm). Oba spola oblića patuljastih kitova su bila statistički značajno veća od nametnika mjerenih iz obalnih i bjelogrih dupina.



Slika 5. Oblici žljezdanog dijela jednjaka (želudac) odraslog stadija nametnika *Anisakis* spp. oes - mišićni dio jednjaka, ventr - želudac (*ventriculus*), int – crijevo (Grabda, 1976).

Mužjaci uzgojeni u laboratoriju su bili dugi od 5,7 do 7,2 cm. U većine mužjaka zadnji kraj tijela je savijen prema trbušnoj strani. Ispred kloake (trbušna strana) se nalazi izdužen žlijeb s brojnim preanalnim bradavicama (Slika 6.). Kutikula uz obje strane žlijeba je zadebljana i tvori krilca koja se protežu do kraja kratkog i koničnog repa. Dužina repa od udaljenijeg kraja anusa je 0,3 do 0,4 mm. Pri kraju repa se nalaze 4 para, a sa strane anusa 2 para slabo vidljivih bradavica (Grabda, 1976). Spolni sustav mužjaka je građen od jednog sjemenika i sjemenovoda koji se preko ventralnog ejakulatornog kanala otvara u kloaku. U dorzalnoj stijenci kloake se nalaze kopulatorne spikule (Berland, 2006). Spikule su nejednake dužine i veličinom ovise o dužini jedinke (Slika 6.). U mužjaka dužine 5,6 cm, desna spikula je bila duga 1,35 mm, a lijeva 1,97 mm, dajući omjer 1:1,47. Na udaljenosti od 0,55 do 0,71 mm od vrha glave, ganglijski prsten okružuje jednjak i grana se prema hipodermalnim prugama. U mužjaka su lateralne hipodermalne pruge izdužene i vrlo izražene. Na kutikuli odmah iza ganglijskog prstena se vide dvije bradavice, leđna i trbušna. Želudac je cilindričnog ili S oblika, dužine 1,6 mm. Crijevo mužjaka se ne razlikuje od ličinki 4. stadija, a ispunjeno je sadržajem i sigmoidalnog je oblika.



Slika 6. Morfologija odraslog mužjaka roda *Anisakis*. a) prednji dio tijela s desne strane: l d - leđna usna, l v - trbušno-postrana usna, p exc - otvor ekskretornog kanalića, oes - jednjak; b) prednji dio tijela s trbušne strane: l v - trbušne usne; c) stražnji dio mužjaka s trbušne strane: spc - desna spikula, a - anus, pap a - bradavice; d) stražnji dio tijela s desne strane: spc - desna spikula, int - crijevo, a - anus; e) desna spikula; f) lijeva spikula (Grabda, 1976).

Ženke odrasle u kontroliranim uvjetima su bile duge od 5,6 do 10,4 cm, debljine središnjeg dijela tijela 2 mm. Čitavo tijelo ženki je cilindričnog oblika s koničnim repom. Usne i želudac se ne razlikuju od muškog spola. Spolni sustav ženki se sastoji od stidnice (smještena prije same sredine tijela), rodnice (usmjerena prema nazad), maternice oblika slova Y (rogovi maternice se protežu prema kraju tijela) koja prelazi u jajovode (Berland, 2006) i jajnika (formiranih u brojne petlje). Crijevo ženki je dobro razvijeno, proširenog lumena punog čestica hrane. U prednjem dijelu tijela lateralne pruge hipoderme su dobro razvijene, dok uz crijevo ne nadvisuju mišićni sloj i slabo su vidljive, za razliku od mužjaka (Grabda, 1976).

1.1.4. Životni ciklus

Potpuni životni ciklus oblića roda *Anisakis* se odvija preko intermedijarnih domaćina (različiti beskralješnjaci, najčešće rakovi svjetlonošci), parateničnih (ribe i glavonošci) i krajnjih domaćina (morski sisavci, najčešće kitovi). Ciklus započinje (Slika 7.) izlaskom jaja iz probavnog sustava kitova putem izmeta, u morski okoliš gdje padaju na dno. Za razliku od drugih rodova, embriogeneza jaja oblića *Anisakis* spp. ne započinje u krajnjem domaćinu nego tek kada se ista nađu u okolišu koji je hladan i bogat kisikom (Højgaard, 1998).

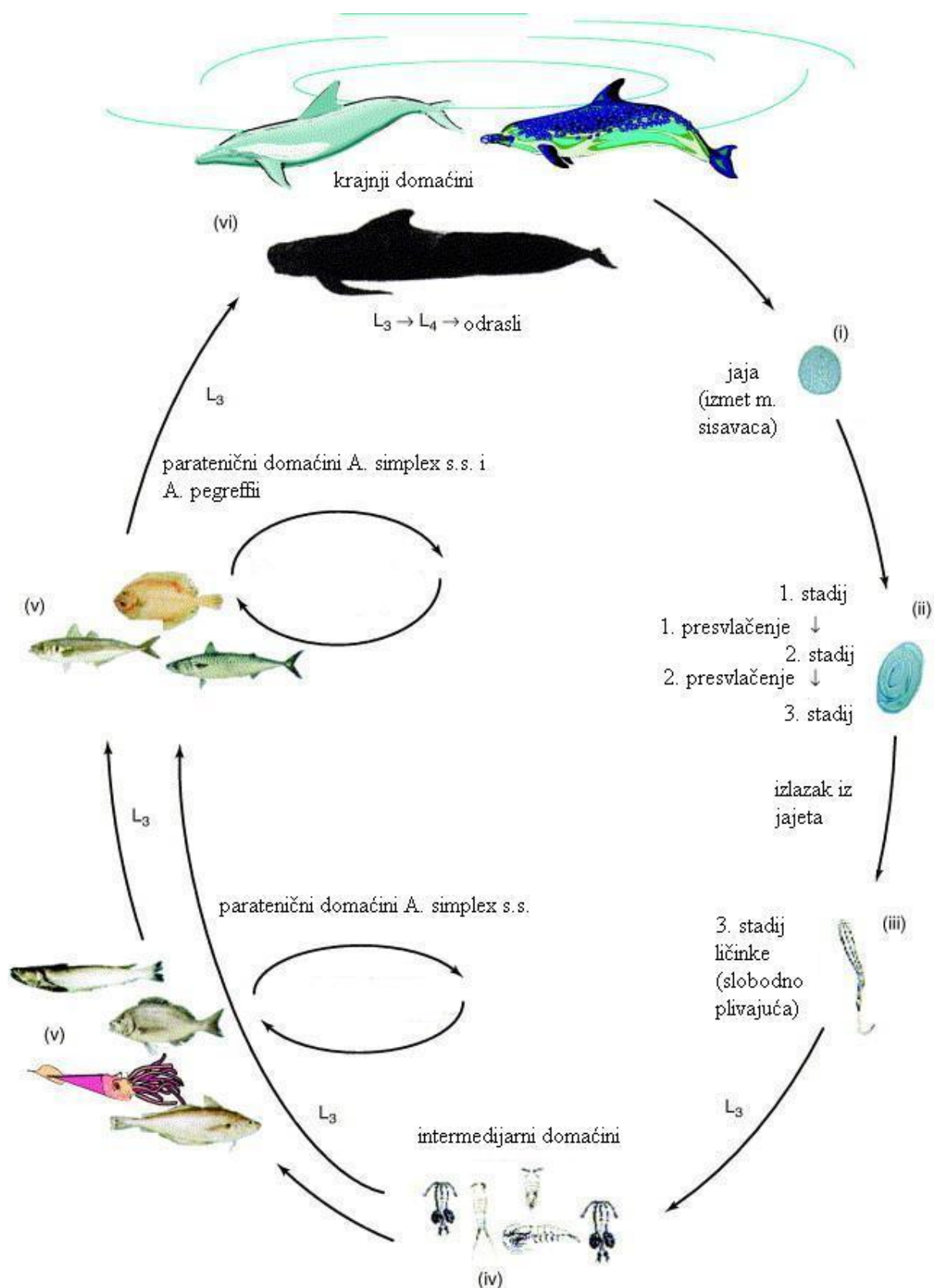
U jajetu se ličinka 1. stadija prvi puta presvlači i odbacuje kutikulu prelazeći u ličinku drugog stadija. I dalje u jajetu, ličinka se presvlači drugi puta, ne odbacujući kutikulu i razvija se u 3. stadij. Ličinka 3. stadija se izliježe iz jajeta omotana plaštom kutikule 2. stadija (Køie i sur., 1995), koji joj vjerojatno pomaže pri lebdenju u stupcu vode. Kada ličinku 3. stupnja proguta planktonski rak (najčešće rakovi svjetlonošci, porodica Euphausidae), on postaje prvi intermedijarni domaćin. U njemu ličinka odbacuje kutikularni plašt (ostatak 2. stupnja), probija se u hemocel i raste (McClelland, 2005).

Ciklus se nastavlja kada intermedijarnog domaćina pojede riba ili glavonožac (paratenični ili prijenosni domaćin) u kojem ličinka 3. stadija migrira iz probavnih organa u trbušnu šupljinu. Do sada nije utvrđeno da li ličinka koristi zubić na glavi za probijanje stijenke probavila domaćina. Smatra se vjerojatnim da koristi sekrete želuca i žlijezde za izlučivanje (Berland, 2006), te da aktivno probija stijenk probavila histolizom pomoću enzima hijaluronidaze kojeg posjeduje (Hotez i sur., 1994). U trbušnoj šupljini međudomaćina, ličinke se nalaze skrupčane ispod ili unutar serozne ovojnice (peritoneuma) i čekaju prijenos u idućeg domaćina.

Ciklus se zatvara ukoliko parateničnog domaćina (ribu ili glavonošca) pojede morski sisavac. U želucu krajnjeg domaćina ličinka prelazi u 4. stadij presvlačenjem, odbacivanjem kutikule i prvim hranjenjem. Ličinka raste, razvija se i zadnji puta se presvlači u odraslu jedinku. Oblići se hrane i rastu najčešće u prvoj od tri postojeće komore želuca kitova, pri čemu mogu biti slobodni u lumenu ili pričvršćeni za sluznicu želuca. Odrasli oblići nakon postizanja spolne zrelosti se u želucu krajnjeg domaćina razmnožavaju i otpuštaju jaja završavajući ciklus (Simard, 1997). Život nametnika roda *Anisakis* u želucu kita može trajati od 2 do 3 mjeseca (Berland, 2006). Nametnici obično imaju malu važnost za zdravlje krajnjeg domaćina, no mogu ga ugroziti kada se nalaze pričvršćeni u grupama za stijenk želuca u

velikom broju te izazivaju krvarenja i erozije sluznice. Pretpostavlja se da u najtežim slučajevima mogu dovesti i do njegove smrti (Raga i sur., 2009).

U životnom ciklusu nametnici roda *Anisakis* mogu proći i više od jednog parateničnog domaćina ako se prvim domaćinom nahrani veća karnivorna riba ili glavonožac. U drugom parateničnom domaćinu se tada ponavlja isti proces kao i u prvom (migracija u trbušnu šupljinu), te oni često nakupe vrlo velik broj ličinki 3. stadija u svom tijelu (Berland, 2006). Istraživanjem životnog ciklusa *Anisakis* spp. u različitim geografskim područjima utvrđene su razlike u vrstama intermedijarnih i parateničnih domaćina. U sjevernom djelu Sjevernog mora prvi intermedijarni domaćin je rak *Paraeuchaeta norvegica* Boeck, 1872 iz podrazreda Copepoda, dok vrste porodice Euphausiidae nemaju važnosti u uspješnom prijenosu oblića (Klimpel i sur., 2004).



Slika 7. Životni ciklus oblića roda *Anisakis*. (i) jaje, (ii) 1., 2. i 3. stadiji ličinke, (iii) slobodno plivajuća ličinka 3. stadija, (iv) ličinke 3. stadija u intermedijarnim domaćinima (Euphausiidae, Copepoda i dr.), (v) ličinke 3. stadija u parateničnim domaćinima, (vi) razvoj

iz 3. u 4. i odrasli stadij u krajnjim domaćinima (morski sisavci, najčešće kitovi) (prema Pascual i Abollo, 2005).

1.1.5. Molekularna identifikacija vrsta roda *Anisakis*

S obzirom da ne postoje mjerodavne morfološke osobine koje bi omogućile identifikaciju svih vrsta roda *Anisakis* u svim stadijima razvoja, pouzdana identifikacija moguća je jedino korištenjem molekularnih (genetskih) markera (Mattiucci i Nascetti, 2008). U istraživanju filogenetskih odnosa nametnika potrebno je koristiti više očuvane (sporije evoluirajuće) molekularne biljege od onih koji se koriste u istraživanju slobodnoživućih organizama. Razlog takvog pristupa je mnogo brža stopa evolucije (stupanj varijacije sekvenci) genetskog materijala nametnika od one u slobodnoživućih organizama (Hwang i sur., 1998). Za identifikaciju nametnika *Anisakis* spp. do razine vrste koristi se nekoliko različitih molekularnih metoda podjeljenih u dvije grupe:

1. Alozimska elektroforeza. Temelji se na činjenici da svi organizmi proizvode više varijanti (formi) nekih enzima (alozimi), koje su proizvod različitih alela na istom lokusu. Svaki alozim ima određenu razliku u sekvenci aminokiselina jer nastaje kao produkt jedinstvenog alela. Budući da se aminokiseline razlikuju električnim nabojem, alozimi se mogu razlikovati zbog različite brzine migracije pri elektroforezi na gelu (Bader, 1998). Alozimska elektroforeza se smatra najboljom metodom dokazivanja reproduktivne izolacije između vrsta roda *Anisakis*. Prednost ove metode je mogućnost analize velikog broja uzoraka, a nedostatak ograničenost primjene na samo svježe ili smrznute uzorke (Mattiucci i Nascetti, 2008).

2. Dijagnostičke tehnike temeljene na analizi DNK umnožene lančanom reakcijom polimeraze (PCR):

a) PCR-RFLP - polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (*restriction fragment length polymorphism*) ITS (*internal transcribed spacer*) regije DNK, umnožene PCR reakcijom. Dio regije ribosomalne DNK (ITS-1, 5,8S i ITS-2) se umnožava lančanom reakcijom polimeraze. Dobiveni produkti se podvrgavaju restrikcijskoj analizi korištenjem endonukleaza koje “režu” DNK na specifičnim mjestima dajući fragmente različite veličine. Fragmenti se potom odjeljuju elektroforezom na gelu, te se na osnovi njihovog broja i veličine koji su specifični, utvrđuje vrsta.

- b) SSCP-DNK (ITS) - Polimorfizam jednolančane konformacije (*single-strand conformational polymorphism*) PCR produkata ITS regije ribosomalne DNK. Metoda se temelji na razdvajanju jednolančanih nukleinskih kiselina na osnovi različite sekundarne strukture, koja je posljedica određenih razlika u slijedu nukleotida. Razlike u sekundarnoj strukturi daju nukleinskim lancima različitu mobilnost, te se razdvajanje vrši elektroforezom na gelu (Galov, 2007).
- c) Direktno sekvencioniranje djela cistrona ribosomalne DNK (podjedinice 28S-velike podjedinice i regija ITS1, 5.8S, ITS2), prethodno umnoženog PCR reakcijom.
- d) Analiza sekvenci mitohondrijske citokrom oksidaze b (mtDNK cytb).
- e) Analiza sekvenci mitohondrijske citokrom oksidaze 2 (mtDNK cox2). Metoda analize lokusa citokrom oksidaze podjedinice 2, fragmenta mitohondrijske DNK, se smatra vrlo korisnom ne samo u identifikaciji vrsta roda *Anisakis*, nego i za utvrđivanje filogenetskih odnosa (Mattiucci i Nascetti, 2008).

1.1.6. Patogenost roda *Anisakis*

Nametnici roda *Anisakis* se tijekom svog životnog ciklusa mogu naći i u neodgovarajućem domaćinu. Konzumacijom sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe kao i ostale hrane iz mora koja sadrži ličinke 3. stadija, čovjek može postati slučajni domaćin. U čovjeku nametnik ne može dovršiti razvoj, te izaziva bolest (anisakijaza) (ne) posredno poticanjem hipersenzitivnosti imunskog sustava (Audicana i Kennedy, 2008).

Ličinke 3. stadija u probavnom sustavu čovjeka se ponekad razvijaju u 4. stadij, a u nekoliko iznimnih slučajeva su identificirane u odraslom nezrelom stadiju (Kliks, 1986; Audicana i sur., 2003). Unos ličinki hranom uzrokuje gastrointestinalne simptome koji mogu biti praćeni blagim ili teškim imunološkim reakcijama (najčešće alergijske). Audicana i Kennedy (2008) navode 4 varijante anisakijaze ljudi: želučana (gastrična), crijevna (intestinalna), ektopična anisakidoza i alergijski oblik. Želučana varijanta nastupa obično nakon nekoliko sati od ingestije živog nametnika i može dovesti do abdominalne boli, mučnine, povraćanja i/ili dijareje. U nekih pacijenata se istovremeno razvijaju i alergijski simptomi. Gastrointestinalni simptomi se javljaju kao posljedica invazivnog ponašanja ličinki koje proteolitičkim enzimima i antikoagulacijskim tvarima izazivaju brojne erozije i krvarenja sluznice probavnog sustava. U najtežim slučajevima bolest može završiti smrću. Alergijske simptome također može uzrokovati hrana u kojoj ima ostataka nametnika bez obzira na

termičku obradu, a simptomi takvih reakcija su: akutna urtikarija, angioedem, bronhospazam, prestanak disanja i anafilaktički šok. Do alergijskih reakcija može doći i bez unošenja nametnika u probavni sustav, što je utvrđeno u ribara i zaposlenika industrije prerade ribe putem unošenja alergena u vidu aerosola. S time su povezani astma, gingivostomatitis, konjuktivitis i kontaktni dermatitis (Mladineo i sur., 2012).

Vrsta *Anisakis simplex* je najčešći uzročnik infekcija ljudi nakon konzumacije sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe (Williams i Jones, 1994), dok je za vrstu *A. physeteris* prijavljeno samo nekoliko slučajeva. Do danas su poznati slučajevi zaraze ljudi sa svih 5 kontinenata: Azije (Koreja i Japan), Europe (Nizozemska, Francuska, Ujedinjeno Kraljevstvo Velike Britanije i Sjeverne Irske, Španjolska, Njemačka, Italija), Afrike (Egipat) i obje Amerike (Sjedinjene Američke države uključujući Aljasku i Havaje, Kanada i zemlje južne Amerike). Najveći postotak pojavnosti anisakijaze u ljudi je zabilježen u Japanu gdje se najčešće i konzumira sirova riba (Audicana i Kennedy, 2008). U Hrvatskoj je zasada poznat samo jedan smrtni slučaj u Šibeniku uzrokovan konzumacijom zaražene sušene ribe iz Japana, koji je objavljen u medijima 2006. godine, ali nije u potpunosti dokazana uključenost *Anisakis* ličinke (<http://arhiv.slobodnadalmacija.hr/20061209/spektar03.asp>). Anisakijaza kao bolest je u hrvatskim medicinskim krugovima u potpunosti zanemarena i gotovo nepoznata (Žilić i Mladineo, 2006), što može biti razlog nedostatnih informacija o slučajevima zaraze u Hrvatskoj.

1.2. Cetacea (Kitovi)

Kitovi su raznolika taksonomska skupina sisavaca koju karakterizira najviši stupanj prilagodbe životu u vodi. Specijalizirana anatomija i ponašanje skrivaju njihovo kopнено porijeklo i svrstavaju ih u posebnu grupu sisavaca - morske sisavce (Barnes, 2002). Cetacea danas čine vrste koje nastanjuju svjetske oceane, jezera i rijeke. Neke od vrsta su kozmopoliti rasprostranjeni u morima od sjevernog do južnog pola dok su druge ekologijom i statusom populacije ograničene na mala područja od nekoliko četvornih kilometara. Postoje vrste kitova koji žive isključivo u morskoj vodi, i druge koje žive u slatkoj vodi i vrste koje nastanjuju obje sredine.

Na osnovi recentnih arheoloških dokaza i rezultata molekularnih istraživanja skupina Cetacea se svrstava u red *Cetartiodactyla*, zajedno s najbližim živućim rođacima, skupinom *Artiodactyla* (Parnoprstaši). Cetacea su do nedavno označavani taksonomskom oznakom reda unutar razreda *Mammalia*, međutim prema najnovijem položaju u klasifikaciji znanstvena zajednica se još nije usuglasila oko taksonomske oznake podreda (Perrin, 2009). Prema Odboru za taksonomiju Udruženja za znanost o morskim sisavcima (Committee on Taxonomy, 2011) skupina Cetacea danas broji 87 vrsta od čega je jedna nedavno izumrla, *Lipotes vexillifer* (Miller, 1918), Yangtze riječni dupin. Kitovi se dijele na usane (*Mysticeti*) s 14 vrsta unutar 4 porodice i zubane (*Odontoceti*) sa 73 vrste unutar 10 porodica.

Odontoceti i Mysticeti se razlikuju u tri glavne osobine: teleskopski izdužene kosti lubanje, specijaliziran sustav za eholokaciju uz koji je vezana specifična anatomska građa u kitova zubana i specijaliziran sustav hranjenja filtriranjem pomoću usi u kitova usana. Često spomenuta razlika je i postojanje jedne vanjske nosnice (*blowhole*) u zubana, dok usani imaju dvije. Većina zubana ima dorzalno asimetričnu lubanju i meko tkivo lica, nasuprot usana kod kojih takve asimetrije nema. Većina kitova zubana je veličinom manja od kitova usana iako ima iznimki čije se vrijednosti preklapaju. U zubana spolni dimorfizam u smislu veličine mužjaka i ženki varira među vrstama za razliku od usana kod kojih su odrasle ženke uvijek nešto veće od odraslih mužjaka. Mnogo vrsta kitova usana se hrani zooplanktonom blizu površine, a hrana koju konzumiraju pokazuje izrazite sezonalne varijacije. Kitovi zubani se hrane u dubljim dijelovima mora, pri čemu su biomasa i vrsta plijena otprilike stalne kroz cijelu godinu (Hooker, 2002).

1.2.1. Odontoceti

1.2.1.1. Morfologija i ekologija

Kitove zubane (Odontoceti) čini 10 raznolikih porodica od kojih dvije porodice (Delphinidae i Ziphiidae) sadrže najveći broj vrsta. U 72 žive vrste pripadaju pravi dupini, Monodontidae (narval i beluga), riječni dupini, pliskavice, brazdasti dupini i prave ulješure (*sperm whales*). Većina kitova zubana su male do srednje veličine u rasponu od Hektorovog dupina (*Cephalorhynchus hectori*) (1,5 m) do kita ubojice (*Orcinus orca*) (8,5 m). Iznimke su glavata ulješura (*Physeter macrocephalus*, mužjaci do 18 m) i veće vrste brazdastih dupina (*Berardius* spp. i *Hyperoodon* spp.). Vrste kitova zubana pokazuju širok raspon rasprostranjenosti, od riječnih dupina koji se nalaze u malim specifičnim područjima do ulješura i kitova ubojica s globalnom rasprostranjenošću. Nekoliko vrsta skupine kitova zubana (pr. glavata ulješura, *P. macrocephalus*) obavlja sezonsku migraciju na veće udaljenosti kakva je do sada poznata u kitova usana, dok ostale vrste migriraju na manjim udaljenostima prateći migracije plijena.

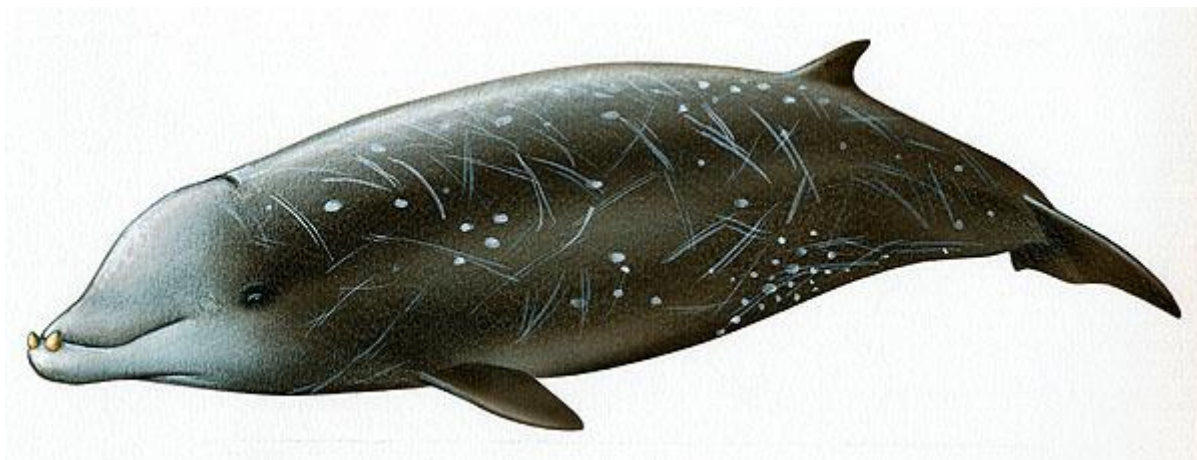
Vrste ove skupine se hrane ribom, glavonošcima, velikim rakovima, pticama i drugim morskim sisavcima. Love, zarobljavaju i gutaju pojedinačan relativno velik plijen, za razliku od kitova usana koji filtriraju i gutaju velike količine sitnog plijena. Smatra se da je takav generaliziran i prilagodljiv način hranjenja uzrokovao raznolikost vrsta kitova zubana i staništa koja koriste. Svi kitovi zubani za razliku od kitova usana imaju zube, iako su ti zubi u nekih vrsta i spola dosta reducirani i ne izbijaju iz zubnog mesa. Zubalo im je uniformno oblikovano (homodontno) za razliku od većine kopnenih sisavaca (heterodontno). Međutim, i unutar nekih vrsta postoje razlike u broju, veličini i obliku zuba, a najčešći oblik zuba je stožast.

Kitovi zubani imaju specijalizirane mehanizme proizvodnje i primanja zvuka za korištenje biosonara. Posjeduju ovalni melon, nakupinu masnog tkiva, koja se nalazi u prednjem dijelu glave, a služi kao važna komponenta ehološkog sustava. Smatra se da svi moderni pripadnici skupine koriste ehološkiju na način sličan šišmišima, kako bi stvorili sliku svog okoliša (Hooker, 2002). Kitovi zubani se uz slonove i primata (još dvije skupine životinja) nalaze na vrhu ljestvice po veličini mozga u sisavaca. Kao u slonova i većine primata, danas je poznato da i kitovi zubani vode bogate socijalne živote (Connor i sur., 1998).

U prošlosti su ljudske interakcije s ovom skupinom životinja uključivale lov zbog konzumacije mesa i držanje primjeraka u zatočeništvu u izložbene svrhe. Međutim, kitovi zubani su manje ugroženi posljedicama ljudskih aktivnosti od usana, te je samo nekoliko vrsta kitova zubana izlovljeno do razine na koju su smanjene populacije kitova usana u posljednja dva stoljeća. Iako je na lov velikih kitova proglašen moratorij, (uz sve kitove usane) jedina vrsta zubana koja se našla u toj zabrani je prava ulješura. Mnoge vrste kitova zubana se love i danas u velikim brojevima. Poražavajuća je činjenica da većina lova prolazi bez nadzora te točan broj ubijenih životinja nije poznat, iako se sumnja da je visok (Hooker, 2002). Nekoliko vrsta kitova zubana se i danas drži u zatočeništvu za izložbene i istraživačke svrhe. Kitovi zubani su danas ugroženi prvenstveno ljudskom krivicom. Stradavaju neposredno od lova, zaplitanja i utapanja u ribarskim mrežama, ingestije plastičnog otpada i posredno od bolesti uzrokovanih padom imuniteta uslijed biomagnifikacije zagađivala, degradacije i gubitka staništa, manjka hrane zbog prelova, uznemiravanja i zagađenja bukom.

1.2.1.2. Biologija vrste krupnozubog dupina, *Ziphius cavirostris* (Cuvier, 1823)

Ženke i mužjaci krupnozubih dupina se ne razlikuju značajno u veličini koja u prosjeku iznosi 6,1 m (Slika 8.). Odrasli mužjak s Falklandskog otočja je najveći točno izmjeren primjerak vrste sa 6,93 metara dužine (Heyning, 2002). Najveća zabilježena masa jedinki je oko 3000 kg (Jefferson i sur., 1993), a najduža životna dob prema Meadu (1984) je 30 godina u ženki i 36 godina u mužjaka. Rasprostranjenost ove vrste je kao i u ostalih neuobičajenih vrsta prvenstveno poznata na osnovi nađenih lešina. Takve informacije su pristrane s obzirom na brojnost u određenom području, ali i jedino dostupne. Podaci pronađenih uginulih jedinki upućuju da su krupnozubi dupini najviše kozmopolitski rasprostranjeni u odnosu na ostale brazdaste dupine. Nalaze se u svim oceanima i većini mora osim u krajnjim polarnim područjima. Najviše nalaza uginulih jedinki među brazdastim dupinima je upravo ove vrste te se zbog toga smatra da nisu toliko rijetki kao što se prije mislilo. Često se primjećuju pojedinačne životinje i grupe do sedam jedinki.



Slika 8. Mužjak krupnozubog dupina.

(izvor: http://www.espacotalassa.com/03_gb/16_species/docs/z_cavirostris.htm)

Brazdasti dupini se primarno hrane usisavanjem plijena u čemu im pomaže specifična anatomija grla koje se može proširiti i stvoriti usisni vakum (ždrijelne brazde). Kao primarni plijen ove vrste se navode glavonošci (lignje) iako je dosad analiziran premali broj sadržaja želudaca da bi se ovi podaci mogli pouzdano interpretirati. Rezultati analize sadržaja želudaca krupnozubih dupina iz voda oko Japana se razlikuju prema dubinama mora na kojima su se životinje nalazile. U jedinki koje su se nalazile do 1000 m dubine glavonošci su bili

dominantan plijen, dok je na dubinama većim od 1000 m riba bila glavni plijen, što ukazuje na oportunističke hranidbene navike. Većina plijena koji se spominje su organizmi otvorenog oceana, mezopelagijala ili dubokomorski bentički organizmi, što je u skladu s dosadašnjim mišljenjem da su krupnozubi dupini pučinska vrsta koja roni na velike dubine (Heyning, 2002).

1.2.1.3. Biologija vrste glavatog dupina, *Grampus griseus* (Cuvier, 1812)

Glavati dupin (*Grampus griseus*) je peti najveći član porodice *Delphinidae* (Slika 9.). Odrasli oba spola dosežu dužinu do 4 metra (Baird, 2002) i masu od 400 do 500 kg (Jefferson i sur., 1993). Najduži životni vijek se procjenjuje na otprilike 30 godina iako za ovu vrstu još nisu kalibrirane zone prirasta (depozicije) dentina u zubima. Glavati dupini su rasprostranjeni u umjerenim i tropskim oceanima širom svijeta, a preferiraju strma staništa ruba šelfa i kontinentalnog slaza između 400 i 1000 m dubine. Smatra se da je temperatura mora važan ograničavajući čimbenik geografske rasprostranjenosti ove vrste jer su najučestaliji u vodama temperature 15 do 20°C, a rijetko se nalaze ispod 10°C. Procjene broja jedinki postoje u brojnim regijama ali ne i na ukupnoj svjetskoj razini. Jedinke ove vrste vole život u grupi i tipično putuju zajedno u grupi od 10 do 50 jedinki, a najveća dosad zabilježena skupina je brojila preko 4000 životinja. Zabilježeno je i da često putuju s drugim vrstama kitova (Baird, 2002).



Slika 9. Izgled glavatog dupina.

(izvor: <https://www.sanctuarycruises.com/dolphins.html>)

Plijen glavatih dupina je gotovo u potpunosti sastavljen od neritičkih i oceanskih vrsta glavonožaca, no zabilježeno je da u nekim područjima skidaju ribu s parangala. Postojeća istraživanja ponašanja ukazuju na to da se primarno hrane noću (Baird, 2002).

1.2.1.4. Biologija vrste plavobijelog dupina, *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833)

Plavobijeli dupin je mala pelagična vrsta kita iz porodice *Delphinidae* (Slika 10.). Odrasle jedinke su do 2,6 metara dužine, pri čemu su mužjaci malo duži od ženki. Najveća zabilježena masa je 156 kg (Jefferson i sur., 1993). Najduža životna dob ženki i mužjaka je 57,5 godina. Pripadnici ove vrste primarno obitavaju u toplim vodama, no ukupna geografska rasprostranjenost se širi u umjerena područja sve do 50°N i 40°S. Rasprostranjenost vrste je vrlo dobro proučena u nekoliko regija: zapadnom i istočnom dijelu sjevernog Pacifika, tropskom Pacifiku i Sredozemnom moru. Vrsta je također zabilježena u Atlantskom oceanu, od sjevera južne Amerike preko istočnog obalnog pojasa sjeverne Amerike do mjesta gdje se Gofska struja odvaja od obale, u istočnom djelu Atlantskog oceana južno od Velike Britanije, te u Indijskom oceanu. U Sredozemnom moru se smatra najbrojnijom vrstom iz skupine kitova zubana. Plavobijeli dupini život provode u oceanskoj regiji, izvan područja kontinentalne podine, a najčešće u moru iznad kontinentalnog slaza, pogotovo u područjima uzlaznih struja (*upwelling*). Obali prilaze samo na područjima gdje je more uz obalu duboko (Archer, 2002).



Slika 10. Izgled plavobijelog dupina.

(izvor: <http://hawaiihumpbackwhale.noaa.gov/explore/striped.html>)

Plavobijeli dupini se hrane raznim vrstama pelagičkih ili bentopelagičkih riba i glavonožaca. Uz obale Japana i južne Afrike primarni plijen su ribe porodice Myctophidae, u

sjeveroistočnom Atlantiku bakalar, a u Sredozemlju se najčešće hrane glavonošcima. Pretpostavlja se da plavobijeli dupini za potencijalnim plijenom rone na dubine od 200 do 700 m. Plavobijeli dupini žive u skupinama čija veličina varira u različitim regijama, od 10 - 30 do nekoliko stotina jedinki, a rijetko iznad 500. Od svih vrsta kitova upravo su u plavobijelim dupinima najintenzivnije istraženi zagađivala i nametnici. Tako se uginuća tisuća plavobijelih dupina populacije zapadnog Sredozemnog mora od 1990. do 1992. godine smatraju povezanim s visokom koncentracijom organskih klorida koja uzrokuje supresiju imunskog sustava, smanjujući otpornost na infekcije (Archer, 2002).

1.2.1.5. Biologija vrste dobri dupin, *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)

Dobri dupini su najbolje poznata vrsta kitova (Slika 11.). Životni vijek mužjaka je oko 40 do 45 godina, dok ženke mogu živjeti i preko 50 godina. Najstarija dokumentirana ženka dobrog dupina je imala 53 godine (Reynolds, 2000). Dužina odraslih jedinki se kreće od 2 do 3,8 metara, a masa od 135 do 635 kg, ovisno o geografskom području u kojem žive. Veličina tijela dupina je obrnuto proporcionalna s temperaturom mora u mnogim dijelovima svijeta, osim u istočnom Pacifiku. Osim veličine poznate su razlike u boji i izgledu lubanje između populacija različitih oceana ili staništa (obalno područje ili pučina). Dobri dupini nastanjuju umjerena i tropska mora cijelog svijeta, a granica rasprostranjenja je vjerojatno povezana s temperaturom posredno ili neposredno preko razdiobe plijena. Sjeverna granica rasprostranjenja u Pacifiku je otočje Kuril i središnja Kalifornija, u sjevernom Atlantskom oceanu tijekom ljetnih mjeseci obale Nove Engleske, Norveška i Lofotsko otočje, dok zimi ove populacije migriraju južnije. Granica rasprostranjenja na jugu su Ognjena zemlja (*Tierra del Fuego*), južna Afrika, Australija i Novi Zeland.

Dobri dupini se hrane mnogim vrstama riba i/ili glavonošcima, a najčešće vrste plijena su ribe iz porodica Sciaenidae, Scombridae i Mugilidae. Većinu ribljeg plijena čine bentičke vrste, no zastupljene su i neke pelagičke. Postoji nekoliko poznatih primjera da se grupe dobrih dupina ovisno o spolu i dobi na nekom području razlikuju po hrani. Tako se majke s mladunčadi koja još sisa hrane bliže obali, adolescenti nešto dalje, a odrasli mužjaci i ženke bez mladunaca još dalje prema pučini. Dobri dupini su izrazito socijalni i tipično žive u grupama od 2 do 15 jedinki, no poznati su i primjeri grupa s više od 1000 jedinki. Općenito jedinke koje žive u zaljevima i estuarijima formiraju manje grupe od onih koji najviše obitavaju u otvorenom moru. Grupe u kojima žive su dinamične jer ih ne čine uvijek iste

jedinke, dok su podgrupe stabilnije i mogu se ponavljati tijekom godina. Osnovne socijalne jedinice uključuju: jasličke grupe (*nursery groups*), grupe mladih (juvenilnih) jedinki oba spola i odrasli mužjaci koji žive solitarno ili u snažnom partnerstvu s još jednim ili dva odrasla mužjaka (Wells i Scott, 2002).



Slika 11. Izgled dobrih dupina u Jadranskom moru.

1.2.1.6. Vrste kitova u Jadranskom moru

Krajem devetnaestog stoljeća u Jadranskom moru su bile poznate dvije vrste kitova, brojniji obični dupin (*Delphinus delphis*) i manje viđen dobri dupin (*Tursiops tursio*=*Tursiops truncatus*) (Brusina, 1889). Prema Gomerčiću i sur. (2004) u Jadranskom moru su dosad zabilježene tri vrste kitova usana: veliki sjeverni kit (*Balaenoptera phvsalus*), patuljasti kit (*Balaenoptera acutorostrata*) i crni ledeni kit (*Eubalaena glacialis*), odnosno od kitova zubana 8 vrsta: obični dupin (*Delphinus delphis*), dobri dupin (*Tursiops truncatus*), glavati dupin (*Grampus griseus*), sjeverna kljunasta ulješura (*Hyperoodon ampullatus*), crni dupin (*Pseudorca crassidens*), plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavata ulješura (*Physeter macrocephalus*) i krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*). Vrste koje se češće pojavljuju su plavobijeli i glavati dupin dok se obični i krupnozubi dupin rjeđe viđaju. Dobri dupin je jedina vrsta koja se smatra rezidentnom, što podrazumijeva da živi i razmnožava se u

Jadraniu (Gomerčić i Huber, 1989; Gomerčić i sur., 1994; Bearzi i Notarbartolo di Sciara, 1995; Gomerčić i sur., 1998; Gomerčić i sur., 2004). Ostale spomenute vrste vjerojatno dolaze iz Sredozemnog mora gdje stalno obitava osam vrsta kitova (Notarbartolo di Sciara, 1993; Notarbartolo di Sciara i Demma, 1994).

1.2.1.7. Dobri dupin u Jadranskom moru

Sustavna istraživanja dobrih dupina u Jadranskom moru se protežu unazad dvadesetak godina. Gomerčić i sur. (2004) veličinu populacije dobrih dupina u hrvatskom dijelu Jadranskog mora procjenjuju na oko 250 jedinki s rasprostranjenjem po svim područjima, te smatraju da je populacija stabilna s obzirom na broj prisutnih jedinki. Đuras Gomerčić (2006) je istraživanjem morfometrijskih osobina utvrdila da su dobri dupini u Jadranskom moru znatno veći od jedinki iz Sarasote, istočne Floride i središnje atlantske obale SAD-a, te da sve jedinke pripadaju jednom morfološkom tipu. Istraživanjem genetičke raznolikosti populacija dobrih dupina u Jadranskom moru Galov (2007) nije utvrdila strukturiranje populacija Jadranskog mora, kao ni prolazak populacije kroz "usko grlo" (*bottleneck*), što znači da postoji dobar protok gena između dobrih dupina Jadrana i Sredozemnog mora. Na temelju zona prirasta u zubnom dentinu 51 jedinke, Ćurković i sur. (2003) su utvrdili najveću starost uginulih dupina od 26 godina. Histogram starosti navedenog istraživanja je ukazao na mladu populaciju dobrih dupina u Jadraniu. Na uzorku od 66 lešina iz hrvatskog dijela Jadranskog mora utvrđen je visoki postotak uginuća (51,5 %) dobrih dupina kao posljedica ljudskih aktivnosti, dok je zbog zdravstvenih poremećaja uginulo 48,5 % jedinki (Gomerčić i sur., 2002).

Detaljni podaci ishrane i vrsta plijena dobrih dupina u Jadranskom moru do danas nisu objavljeni. Djelomične informacije iznosi Poldan (2004) analizom 59 jedinki od kojih je 16 imalo prazan želudac, 4 mlijeko, 2 mekonij i 37 ostatke plijena. Od 37 dupina s ostacima plijena, njih 43,24 % je u želucu imalo ostatke riba, glavonožaca i rakova, 40,54 % samo ostatke riba, dok je 10,81 % imalo ostatke samo glavonožaca. U toj analizi na osnovi 10 analiziranih sadržaja želudaca, jedine identificirane vrste plijena su vrste glavonožaca: obična lignja (*Loligo vulgaris*), mali lignjun (*Illex coindetii*), obična sipa (*Sepia officinalis*) i mrki muzgavac (*Eledone moschata*). Također je utvrđeno da je najveći broj čeljusti glavonožaca pripadao mrkom muzgavcu (43,39 %).

1.2.1.8. Mjere zaštite kitova u Jadranskom moru

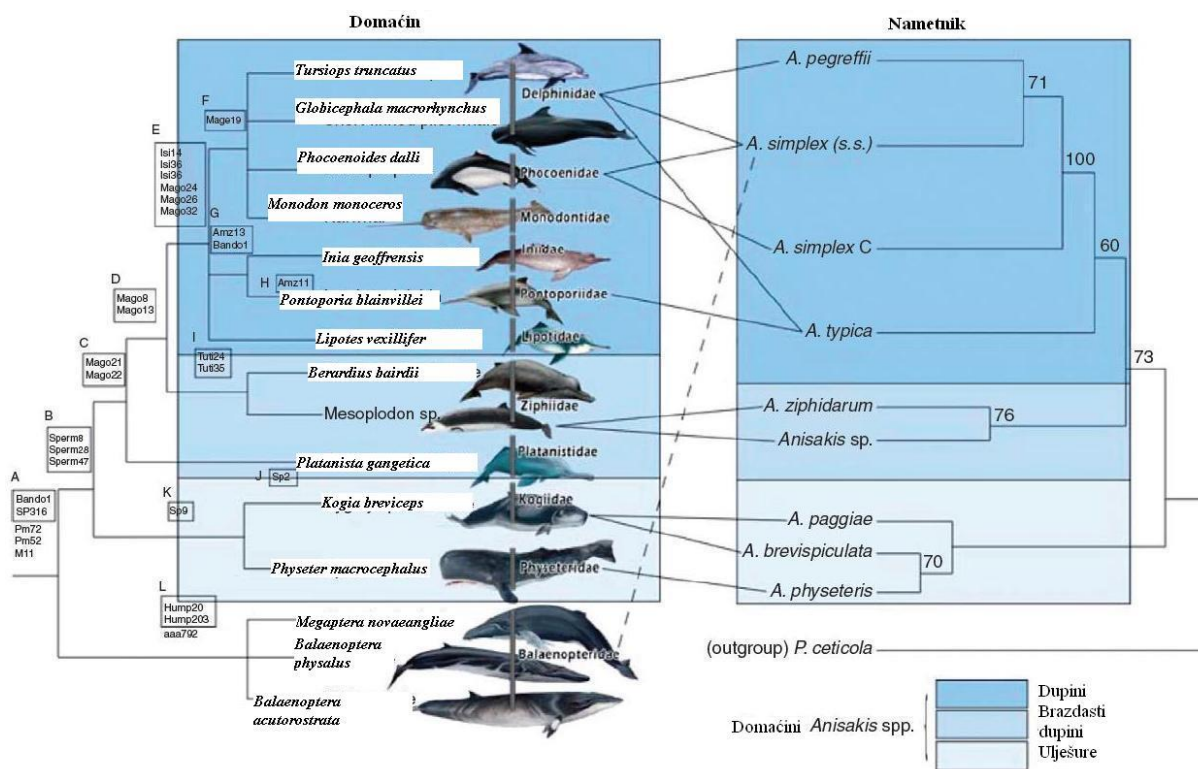
Sve vrste kitova koji se zateknu u Jadranskom moru strogo su zaštićene prema Zakonu o zaštiti prirode (NN 70/05; 139/08; 57/11), Pravilniku o zaštiti pojedinih vrsta sisavaca (Mammalia) (NN 31/95), Pravilniku o proglašavanju divljih svojiti zaštićenim i strogo zaštićenim (NN 99/09), te međunarodnoj konvenciji ACCOBAMS (Agreement on the conservation of cetaceans of the Black Sea, Mediterranean Sea and contiguous Atlantic Area) koje je i Republika Hrvatska potpisnik (Međunarodni ugovori, 6/2000). Zakon o zaštiti prirode zabranjuje, osim hvatanja, ubijanja i držanja, i rastjerivanje kitova, a za počinitelje takvih nedozvoljenih radnji je određena kazna u iznosu 35 000 kn prema Pravilniku o zaštiti pojedinih vrsta sisavaca (Mammalia). U Crvenoj knjizi sisavaca Hrvatske iz 2006. godine (sadrži crveni popis vrsta koje su posebno ugrožene, a izdaje ju Državni zavod za zaštitu prirode) dobri dupin je svrstan u kategoriju ugrožene vrste kojoj prijeti vrlo visok rizik od izumiranja u prirodi. Iz tog razloga se od strane više institucija u Republici Hrvatskoj posvećuje posebna pažnja zaštiti i očuvanju postojećih populacija u Jadranu.

Glavni razlozi ugroženosti morskih sisavaca u Jadranu su slučajan ulov u ribolovne mreže (prilov), uznemiravanje te prevelik izlov morskih organizama kojima se morski sisavci hrane (prelov). Također, veliki negativni utjecaj na morske sisavce ima plastični otpad kojega zabunom progutaju, te onečišćenje bukom koju proizvode plovila posebno u ljetnim mjesecima. Dodatan i ne manje značajan problem za dupine i kitove općenito (uz glavne uzroke ugroženosti koje posredno i neposredno izaziva čovjek i koji se lako primjećuju) je i kumulativan učinak više uzročnika (kao što je zagađenje mora koje može oslabiti imunitet dupina te dovesti do njegove smrti uslijed neke bakterijske infekcije koja u uobičajenim uvjetima ne izaziva uginuće). Danas se istraživanjima kumulativnih učinaka posvećuje sve veća pažnja zbog mogućeg razjašnjavanja masovnih uginuća kitova zubana.

1.3. Specifičnost odnosa vrsta roda *Anisakis* i krajnjih domaćina

Općenito nametnici su načinom života usko povezani sa životom domaćina, te evolucija svake vrste nametnika ovisi o evoluciji njegovog domaćina, ali i obrnuto. U tom vrlo bliskom odnosu nametnici moraju što bolje prilagoditi svoj životni ciklus i/ili fiziologiju krajnjem domaćinu ili se nalaze u opasnosti od izumiranja (Raga i sur., 2009). Postoje dva načina na koji određena vrsta nametnika postaje povezana sa svojim domaćinom, morskim sisavcem. Prvi je putem nasljeđa, odnosno vrsta nametnika je nastala tako što su njen predak i predak domaćina već bili u interakciji. Drugi način je da nametnik nakon što se nađe u novoj vrsti domaćina uspije kolonizirati tu vrstu domaćina. Uska povezanost putem nasljeđa ukazuje na koevoluciju, odnosno na savršenu podudarnost filogenije nametnika s filogenijom domaćina (Aznar i sur., 2001).

Danas postoje brojni podaci o genetici kako nametnika tako i domaćina, te je moguće usporedbom njihovih filogenetskih stabala otkriti kofilogenetske događaje. U istraživanju povezanosti vrsta roda *Anisakis* s vrstama krajnjih domaćina jedna od novijih metoda u upotrebi je kofilogenetsko mapiranje (Mattiucci i Nascetti, 2008). Mattiucci i Nascetti (2006) su nedavno dokazali koevolucijske događaje između vrsta *Anisakis* spp. i kitova. Utvrđeno je da razdvajanje vrsta *Anisakis* spp. u dvije grane unutar roda podupiru ekološki podaci o domaćinima i specifična veza domaćina i nametnika. Tako nametnici unutar grupe *Anisakis* Tip 2 (*A. physeteris*, *A. brevispiculata* i *A. paggiae*) koriste ulješure (*Physeter catodon*, *Kogia breviceps* i *Kogia sima*) kao krajnje domaćine, dok pripadnici *A. simplex* kompleksa i *A. typica* nastanjuju nekoliko oceanskih vrsta porodice Delphinidae, Arktičke dupine (Monodontidae) i pliskavice (Phocoenidae). Kitovi *Ziphius cavirostris*, *Mesoplodon layardii*, *M. mirus* i *M. grayi* su domaćini vrstama *A. ziphidarum* i *A. nascettii* koje pripadaju grupi *Anisakis* Tip 1 zajedno s *A. simplex* kompleksom. Opisana povezanost filogenije nametnika *Anisakis* spp. i kitova domaćina je prikazana na Slici 12.



Slika 12. Tangelogram filogenetskih stabala *Anisakis* spp. i njihovih krajnjih domaćina (kitova). Pune linije prikazuju utvrđene kospecijacijske događaje domaćina i nametnika, a isprekidane linije ukazuju na moguće događaje prelaska (*host-switching*) u novog domaćina (Mattiucci i Nascetti, 2008).

1.4. Dosadašnja istraživanja

1.4.1. Istraživanja roda *Anisakis* u Jadranskom moru

U Jadranskom moru ovo je prvo istraživanje nametnika roda *Anisakis* u njihovih krajnjih domaćinima (kitova). Nametnici su istraživani u parateničnim domaćinima, ribama i glavonošcima. Mladineo (2003) prvi puta utvrđuje prevalenciju nametnika *Anisakis simplex* u 5 vrsta riba iz Jadranskog mora (oslić, *Merluccius merluccius*; šarun, *Trachurus trachurus*; skuša, *Scomber scombrus*; lokarda, *Scomber japonicus* i inćun, *Engraulis encrasicolus*), i ukazuje da je vrlo visoka (od 50 % za šaruna i 100 % za inćuna). Zbog nedostupnosti molekularnih metoda, identifikacija vrsta nametnika (*A. simplex*) je utvrđena prema ranije opisanim morfološkim osobinama. Žilić i Mladineo (2006) opisuju prevalenciju i abundanciju nametnika *A. simplex* iz plavoperajne tune (*Thunnus thynnus*) u kaveznom uzgoju na osnovi trogodišnjeg uzorkovanja. U tuna obuhvaćenih ovim istraživanjem prevalencija nametnika je

bila znatno niža (21,78 %) nego u ranije istraženih vrsta riba, što se može povezati s pojavom gubitka nametničkih populacija u tune tijekom vremena provedenog u uzgoju.

U istraživanju 5 vrsta riba (lubin, *Dicentrarchus labrax*; komarča, *Sparus aurata*; pic, *Diplodus puntazzo*; rumenac okan, *Pagellus bogaraveo* i plavoperajna tuna *T. thynnus*) iz uzgoja u Jadranskom moru (Mladineo, 2006) u 4 vrste nije utvrđena niti jedna jedinka nametnika roda *Anisakis*, dok su samo tune iz 1,5-godišnjeg uzgoja imale prevalenciju od 11,5 %. Mattiucci i sur. (2008) su za potrebe identifikacije različitih stokova šaruna (*T. trachurus*) u njihovom području rasprostranjenja, prvi puta genetski identificirali vrste roda *Anisakis* u Jadranskom moru. Metodom alozimske elektroforeze u uzorku 116 ličinki utvrdili su prisutnost jedne vrste, *A. pegreffii* u Jadranskom moru. Prvu molekularnu analizu oblića iz glavonožaca Jadranskog mora su proveli Petrić i sur. (2011) istražujući parazitofaunu malog lignjuna (*Illex coindetii*). Analizom 8 sekvenci fragmenta mitohondrijske DNK (cox2) utvrđena je vrsta *A. pegreffii*. U navedenom istraživanju detaljno je opisana populacijska dinamika nametnika u odnosu na osobine domaćina, te je utvrđeno da mali lignjun služi kao drugi paratenični domaćin nametnika. Prevalencija *A. pegreffii* u 439 malih lignjuna je iznosila 30,5 %. Vrlo opsežno istraživanje populacijske dinamike nametnika *A. pegreffii* i molekularnu identifikaciju su proveli Mladineo i sur. (2012) na uzorku od 4 600 inćuna u Hrvatskom dijelu Jadranskog mora, tijekom dvije i pol godine. Utvrđena prevalencija nametnika u čitavom uzorku inćuna je bila 76,1 %, s oscilacijama u različitim sezonama uzorkovanja od 20 % do 100 %. Molekularno je identificirano 8 jedinki vrste *A. pegreffii*.

1.5. Svrha i ciljevi rada

Glavni cilj provedenog istraživanja je bila pouzdana identifikacija vrsta oblića izoliranih iz probavnog sustava kitova zubana hrvatskog dijela Jadranskog mora, te proširenje dosadašnjih saznanja o vrstama roda *Anisakis* koje se nalaze u Jadranskom moru. Svrha molekularne analize velikog broja oblića roda *Anisakis* je bila utvrditi strukturu populacijske genetike najbrojnije vrste, *Anisakis pegreffii*. Utvrđivanjem brojnosti nametnika po domaćinu ispitana je povezanost broja nametnika s biološkim osobinama krajnjih domaćina. Računanjem prevalencija, abundancija i intenziteta nametnika u domaćinima, cilj je bio utvrditi populacijsku dinamiku nametnika *Anisakis* spp. u kitovima zubanima koji su nađeni uginuli u hrvatskom dijelu Jadranskog mora.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Prikupljanje uzoraka

Uzorkovanje nametnika roda *Anisakis* je rađeno pri razudbama kitova na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta (053-0533406-3640): „Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu“. Sastavni dio spomenutog projekta su postmortalni pregledi morskih sisavaca koji se provode od 1990. godine do danas. Istraživanje oblića *Anisakis* spp. uključivalo je četiri vrste krajnjih domaćina iz skupine kitova zubana: dobri dupin (*Tursiops truncatus*) koji je jedina stalno prisutna vrsta morskog sisavca u Jadranskom moru, te tri vrste koje povremeno dolaze iz Sredozemlja (Gomerčić i sur., 2004), plavobijeli dupin (*Stenella coeruleoalba*), glavati dupin (*Grampus griseus*) i krupnozubi dupin (*Ziphius cavirostris*).

Tijekom postmortalnih pregleda utvrđuju se i bilježe: vrsta, spol, starost, tjelesna masa, vanjske anatomske mjere i rezultati patoanatomske razudbe provedene prema modificiranom protokolu prema Kuiken i Hartman (1991). Patoanatomska razudba uključuje mjerenje debljine masnog tkiva, utvrđivanje prisustva nametnika, prikupljanje uzoraka za daljnja istraživanja i mnoge druge parametre (Đuras Gomerčić i sur., 2008). Tijekom razudbe pregledavaju se svi organski sustavi, a u probavnom sustavu se bilježi prisustvo i vrsta sadržaja, nametnici, nametnički čvorovi i stanje sluznice. Postojanje nametnika i/ili oštećenja sluznice (erozije) probavnog trakta se dokumentiraju digitalnim fotoaparatom. Pri nalazu erozija pomičnim mjerilom se mjeri njihova veličina, dubina i debljina okolne sluznice organa u kojem se nalaze. Stupanj starosti lešine određuje se prema modificiranom Kuiken i Hartman protokolu (1991) prema sljedećoj skali:

1. Svježa lešina (kao da je upravo uginula, nema napuhnutosti) – Oznaka F (*Fresh*).
2. Srednji stupanj raspadanja lešine (napuhnutost lešine, ljuštenje kože, penis može biti ekstendiran u mužjaka, organi u potpunosti netaknuti osim štetom nastalom postmortalno) – Oznaka MD (*Moderate decomposition*).
3. Uznapredovali stupanj raspadanja lešine (vrlo velika napuhnutost lešine, ljuštenje kože, penis ekstendiran u mužjaka, organi neprepoznatljivi, izložene kosti uslijed raspadanja) – Oznaka AD (*Advanced decomposition*).
4. Mumificirana lešina ili samo koštani ostaci – Oznaka M/SR (*Mummified/Skeletal remains*)

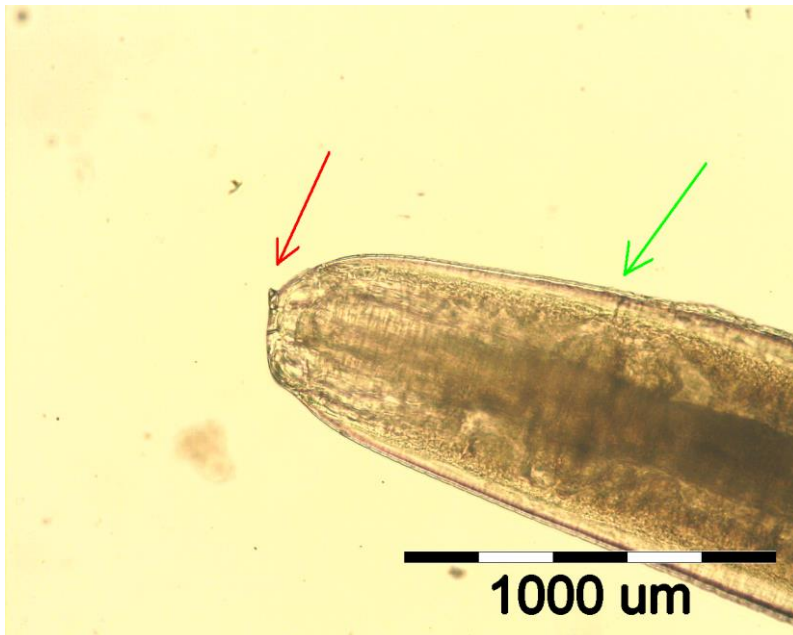
Uzorci oblića roda *Anisakis* Dujardin 1845 (Nematoda, Anisakidae) su prikupljeni iz gastrointestinalnog trakta lešina kitova zubana (Odontoceti) pronađenih u hrvatskom dijelu Jadranskog mora u razdoblju od siječnja 1999. godine do travnja 2012. godine. Oblići su ručno izdvojeni iz probavnog sustava kitova i fiksirani. Dio nametnika svakog domaćina je fiksiran u otopini 70 % etilnog alkohola za potrebe molekularnih istraživanja, a ostatak uzorka je sačuvan u otopinama 4 do 10 % formalina. Geografski prikazi mjesta nalaza uginulih kitova zubana su napravljeni pomoću programa ArcView GIS 3.2 (Environmental Systems Research Institute, 1992 - 1999).

2.2. Morfološka identifikacija nametnika roda *Anisakis*

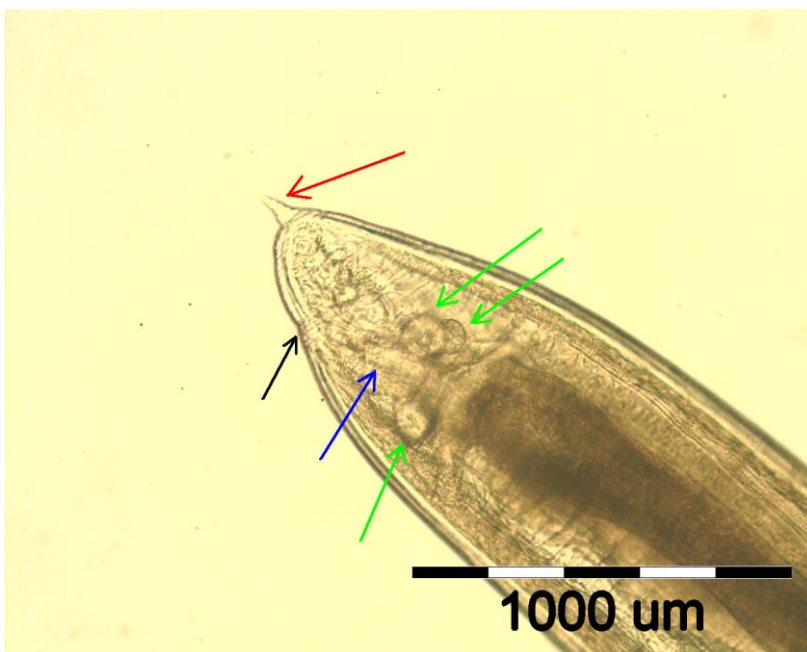
Pregledom općih morfoloških obilježja uz pomoć stereomikroskopa (Nikon, SMZ-U) nametnici probavnog sustava kitova zubana obuhvaćenih ovim istraživanjem su svrstani u koljeno oblića. Detaljnija determinacija do roda *Anisakis* provedena je korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Nikon, Microphot FXA) pod povećanjima 40, 100 i 200x. Da bi se olakšalo promatranje svih anatomskih struktura, zbog čvrste kutikule i promjera tijela 0,3 do 3 mm, jedinke nametnika su uklopljene između dvije debele staklene ploče (trihineloskopska stakla) čiji se obostran pritisak na preparat regulira putem dva vijka.

Razvojni stadiji nametnika su određeni prema Grabdinom (1976) opisu pripadajućih morfoloških osobina. Treći stadij ličinke L_3 karakterizira zubić za bušenje na glavi (Slika 13.) ispod kojeg je otvor ekskretornog kanalića, žljezdani dio jednjaka (*ventriculus*) koso spojen s crijevom, te kratak koničan završetak tijela s repićem koji se naziva mukron (Slika 14.). Zadnji, četvrti stadij ličinke L_4 ima tri dobro razvijene usne na glavi (nema zubića) s dvije velike bradavice (leđna usna) i po jednom bradavicom na trbušno-postranim usnama, jasno vidljiv lumen crijeva u sigmoidalnom obliku ispunjen sadržajem, te kratak i okruglast završetak tijela s malim čvorom umjesto repića. Odrasli nametnici roda *Anisakis* imaju tri razvijene usne (slično L_4) od kojih je leđna veća s dvije usne bradavice pri osnovici i dvije manje trbušno-postrane usne s po jednom bradavicom. Žljezdani jednjak (*ventriculus*) odraslih je cilindričan ili oblika slova S, koso spojen s crijevom bez ikakvih privjesaka, a završetak tijela je kratak i koničan. Muški spol odraslih jedinki karakteriziraju još i bočna zadebljanja kutikule u obliku krilaca pri (najčešće ventralno savijenom) završetku tijela, dva para bradavica lateralno od anusa, četiri para pri kraju repa i spikule nejednake dužine. Ženke

Anisakis spp. osim spomenutih obilježja odraslih imaju cilindričan oblik cijelog tijela, koničan rep i stidnicu smještenu prije sredine tijela (Grabda, 1976).



Slika 13. Ličinka 3. stupnja roda *Anisakis* pod povećanjem 100x. Prednji kraj ličinke: crvena strelica pokazuje zubić kao jednu od osnovnih struktura za identifikaciju, a zelena strelica ukazuje na ganglijski prsten koji okružuje mišićni jednjak.



Slika 14. Ličinka 3. stupnja roda *Anisakis* pod povećanjem 100x. Zadnji kraj ličinke: crvena strelica je usmjerena na drugu identifikacijsku strukturu ličinke, repić ili mukron, zelene strelice – 3 analne žlijezde, plava strelica – rektum i crna strelica – anus.

2.3. Analiza populacijske dinamike i brojnosti nametnika

2.3.1. Metode procjene populacijske dinamike oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora

U razdoblju od listopada 1990. godine do travnja 2012. godine u protokole projekta „Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu“ je upisano ukupno 265 dojava o morskim sisavcima. Od ukupnog broja dojava 256 se odnosilo na uginule jedinke, 7 na žive i 2 dojave su upisane za nerođene jedinke (fetuse) nađene unutar lešine majke. Iz analize brojnosti isključene su nađene lešine *Pinnipedia* (1) i kitova usana (4). Od 251 lešine kitova zubana postmortalno je pregledano 208 od kojih je bilo 27 lešina ne pregledanog probavnog sustava (mumificirane jedinke - najveći stupanj starosti lešine M/SR, novorođenčad fiksirana cijela u formalinu ili bez nađenog probavnog sustava). Za određivanje parametara populacijske dinamike nametnika korišteni su podaci 181 jedinke kitova zubana čiji je postmortalni pregled uključivao pregled želuca i probavnog sustava.

Statističke mjere populacijske dinamike su računate u programu Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa i sur., 2000; Reiczigel i Rózsa, 2005). Prevalencija nametnika je izražena podjelom broja zaraženih domaćina s ukupnim brojem pregledanih domaćina (Bush i sur., 1997), uz 95 % interval pouzdanosti određen Sterneovom egzaktnom metodom (Reiczigel, 2003). Srednja abundancija oblića je određena prosječnim brojem jedinki oblića po domaćinu (uključujući zaražene i ne zaražene domaćine), a prosječan intenzitet kroz omjer ukupnog broja nametnika i broja zaraženih domaćina (Bush i sur., 1997). Granice 95 % intervala pouzdanosti za mjere srednje abundancije i intenziteta određene su bootstrap metodom replika (*bootstrap method*, broj replika=2000).

Vrlo čest oblik distribucije broja nametnika u nekoj populaciji domaćina je asimetrična razdioba (desno iskošena), agregirana (mali broj zaraženih domaćina sadrži najveći dio ukupnog broja nametnika u populaciji domaćina) i pokazuje prekomjernu disperziju (varijanca je značajno veća od srednje vrijednosti). Teoretski model koji najviše odgovara opisanoj distribuciji je negativna binomna razdioba (Bliss i Fisher, 1953). Podudarnost stvarne i teoretske distribucije je utvrđena usporedbom dobivenih i očekivanih (teoretskih) frekvencija podataka uz korištenje metode najveće vjerojatnosti (*maximum likelihood*). Odstupanje podataka od nulte hipoteze podudarnosti s teoretskim modelom negativne binomne razdiobe je utvrđen uz nivo značajnosti $p=0,05$. Asimetričnost razdiobe je

određena računanjem tri agregacijska indeksa: omjerom varijance i srednje abundancije nametnika (mjera prekomjerne disperzije), eksponentom k negativne binomne razdiobe (asimetričnost razdiobe, pri čemu k koji se približava nuli označava jaku agregaciju) i indeksom nepodudarnosti D (0 za uniformnu raspodjelu, do 1 za teoretsko najviše odstupanje od uniformne razdiobe) (Poulin, 1993).

Prva analiza prevalencije nametnika *Anisakis* spp. u kitovima zubanima uključivala je sve vrste domaćina svih starosnih skupina (N=181). Uzimajući u obzir činjenicu da se istraživani nametnik ne prenosi transplacentalno i majčinih mlijekom nego isključivo putem hrane, u svim ostalim analizama (osim analize starosnih grupa) isključene su jedinke stare do godinu dana te su prevalencija, srednji intenzitet i abundancija nametnika određeni na 163 domaćina. Prevalencija nametnika je posebno računata: pojedinačno za svaku vrstu domaćina, u lešinama različitog stupnja starosti za sve vrste domaćina (Fresh/Moderate Decomposition, Advanced Decomposition), prema spolu domaćina ukupno i pojedinačno za dvije vrste domaćina, te po dobnim skupinama za dvije vrste najzastupljenijih domaćina (*Tursiops truncatus* i *Stenella coeruleoalba*). Podjela jedinki kitova na starosne grupe rađena je samo za dvije navedene vrste jer su ostale vrste bile zastupljene premalim brojem jedinki. Granice starosnih grupa su određene prema promjenama u rastu, razvoju i načinu života svake vrste posebno. Najraniji početak spolnog sazrijevanja, 7 godina za dobre dupine u Jadranskom moru (Jagar, 2005) i 5 godina za plavobijele dupine (Archer i Perrin, 1999) je postavljen za gornju granicu prve dobne skupine. Najkasniji završetak spolnog i fizičkog sazrijevanja oba spola (Cockcroft i Ross, 1990), 14 godina za dobre dupine i 15 godina za plavobijele, je postavljen kao gornja granica druge dobne skupine. Ostale dvije dobne skupine su određene proizvoljno s podjednakim vremenskim razdobljem kao prve dvije grupe.

Srednji intenzitet i abundancija oblića roda *Anisakis* su izračunati posebno unutar vrsta dobrih i plavobijelih dupina, a dobiveni rezultati dviju vrsta su uspoređeni t-testom za dva uzorka pomoću bootstrap metode (*bootstrap 2-sample t-test*). Razlika u prevalencijama oblića dobrih i plavobijelih dupina je ispitana pomoću egzaktnog bezuvjetnog testa (*exact unconditional test*) (Reiczigel i sur., 2008). Statistička značajnost razlike postotaka (zaraženih dobrih dupina s erozijama sluznice želuca od zaraženih plavobijelih dupina koji su imali erozije) i razlike u starosti (zaraženih i ne zaraženih dupina unutar dvije vrste) je utvrđena t-testom u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc. 2011). Grafički prikazi prevalencija su rađeni u programu Microsoft Office Excel (2007).

2.3.2. Brojnost nametnika po domaćinu

Brojnost nametnika je istraživana na lešinama pronađenim u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od ožujka 2000. godine do travnja 2012. godine. Pri određivanju točnog broja jedinki oblića *Anisakis* spp. po pojedinom domaćinu korišteni su samo sadržaji želudaca za koje se sigurno zna da su u potpunosti sačuvani, što je rezultiralo uzorkom od 24 kita zubana. Nametnici su prema potrebi ručno izdvajani iz sadržaja želudaca fiksiranih u otopinama 4 do 10 % formalina, te brojani. U 20 uzoraka je prebrojana svaka jedinka nametnika, a u 4 uzorka je ukupan broj nametnika određivan putem poduzoraka zbog vrlo velikog broja jedinki ($N > 6\ 000$). Prema uočenim morfološkim obilježjima pojedinog stadija nametnici su pri brojanju odvajani u 4 skupine: mužjaci, ženke, 3. stadij L_3 (ličinke) i No (spolno nezreli odrasli i 4. stadij ličinke). Mužjaci i ženke su odvajani na osnovi ranije opisanih makroskopski vidljivih razlika zadnjeg djela tijela. U treću, L_3 grupu, su ubrojene sve jedinke u kojih je svjetlosnim mikroskopom (Nikon, Microphot FXA) pri povećanju 100x utvrđena prisutnost glavnih ličinačkih osobina, zubića za bušenje na glavi i repića (mukrona) na završetku tijela (Žilić i Mladineo, 2006). Četvrtu skupinu, oznake No, su činile sve jedinke bez vidljivih spolnih ili ličinačkih obilježja. U dva uzorka nisu odvajane grupe nametnika prema spolu zbog lošeg stanja uzoraka kao posljedice starosti lešina iz kojih su nametnici izolirani, već je samo određen ukupan broj nametnika i broj ličinki 3. stadija.

U 4 uzorka iz kojih je ukupan broj nametnika određivan poduzorcima proveden je jednak postupak. Čitav uzorak nametnika je izvađen iz fiksativa, dobro ocijeđen, izvagan analitičkom vagom te vraćen u fiksativ. Potom je isti dobro promješan u fiksativu te su nasumično izvađena tri poduzorka podjednake količine. Poduzorcima su ocijeđeni, stavljeni u obilježene posude i izvagani analitičkom vagom. Nakon vaganja, jedinke svakog poduzorka su prebrojane prema stadiju na gore naveden način i potom vraćene u čitav uzorak s fiksativom. Broj nametnika u čitavom uzorku je matematički računat iz omjera mase cijelog uzorka i mase poduzorka. Dobiveni broj (omjera mase) je zatim pomnožen s brojem jedinki oblića u poduzorku, dajući kao rezultat broj oblića u cijelom uzorku. Ukupan broj oblića je računat posebno za svaki poduzorak, te je kao konačan broj oblića korištena srednja vrijednost tri procjenjena broja. Broj jedinki svake od grupa (mužjaci, ženke, No i L_3) u poduzorku korišten je kao reprezentativan omjer za izračun ukupnog broja jedinki svake grupe u čitavom uzorku.

Točnost korištene metodologije procjene konačnog broja iz poduzoraka i odstupanje od stvarne vrijednosti su provjereni na dva prethodno izbrojana uzorka koji su sadržavali 20703, odnosno 2 037 jedinki oblića. Nakon prebrojavanja svih jedinki napravljeni su poduzorci na ranije opisan način, te je procijenjen ukupan broj oblića na osnovi mase i broja oblića u poduzorku. Odstupanja izračunatih vrijednosti cijelih uzoraka na osnovi vaganja i brojanja poduzoraka su iznosila prihvatljivih 1 do 2,5 %.

2.3.3. Korelacije broja nametnika s biološkim osobinama domaćina

Za ispitivanje korelacija broja nametnika s nekim od bioloških značajki pojedinih domaćina odabrana je Spearmanova korelacija (Spearman, 1904). Spearmanova korelacija je ne-parametrijska mjera kojom se utvrđuje povezanost (korelacija) dviju mjerenih varijabli. Uspješno se koristi za podatke koji ne zadovoljavaju pretpostavke normalne razdiobe i linearnosti. Nulta hipoteza Spearmanove korelacije je nepostojanje korelacije dviju varijabli, odnosno povećanjem vrijednosti jedne varijable nije vjerojatno da će doći do smanjenja (ili povećanja) vrijednosti druge varijable. Korelacijski koeficijent ove mjere se naziva Spearmanov rho, a označava se sa r_s ili grčkim slovom ρ (McDonald, 2009).

Korelacije su računate u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc. 2011) korištenjem prvo abundancija nametnika, a zatim intenziteta oblića za sljedeće varijable:

Za dvije vrste dupina zajedno (dobri i plavobijeli dupini):

1. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i dob svih dupina zajedno

Posebno po vrsti domaćina (zbog različitih bioloških osobina vrsta):

1. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i dob domaćina
2. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i tjelesna dužina domaćina
3. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i tjelesna masa domaćina (bez lešina uznapređovalog stupnja raspadanja *AD*)
4. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i debljina masnog tkiva (*blubber*) na leđima (bez lešina uznapređovalog stupnja raspadanja *AD*)
5. Broj oblića *Anisakis* spp. (ukupno, adulti i L_3) u pojedinom domaćinu i debljina masnog tkiva (*blubber*) na truhu (bez lešina uznapređovalog stupnja raspadanja *AD*)

U izračunu korelacija između abundancija nametnika i bioloških osobina dvije vrste domaćina nisu korišteni podaci svih ne zaraženih jedinki dvije vrste domaćina (N=107), već samo jednog dijela ne zaraženih domaćina (N=45) čiji su podaci bili dostupni i/ili pouzdaniji na temelju stupnja starosti lešine. Broj korištenih ne zaraženih domaćina također je smanjen radi očuvanja vrijednosti stvarne prevalencije nametnika, budući da je brojnost nametnika utvrđena samo za dio (N=23) od ukupnog broja zaraženih dobrih i plavobijelih dupina kao domaćina (N=48). Ispitivanje razlike u broju nametnika prema spolu domaćina je provedeno Mann-Whitney U testom u programu Statistica 10 (StatSoft, Inc. 2011).

2.4. Molekularna analiza

2.4.1. Izolacija DNK

Molekularnim metodama je istraživano 165 jedinki oblića izdvojenih iz dostupnih uzoraka 26 jedinki kitova zubana koji su nađeni uginuli na hrvatskom dijelu Jadranskog mora u razdoblju od 12. siječnja 1999. godine do 20. kolovoza 2011. godine. Vrste kitova iz kojih su uzorkovani nametnici, te broj analiziranih nametnika po pojedinom domaćinu su prikazani u Tablici 2. Iz pojedine vrste krajnjeg domaćina analizirano je više od jedne jedinice oblića radi mogućeg otkrivanja mješane infekcije (zaraženost više od jednom vrstom nametnika).

Tablica 2. Vrste dupina i broj uzoraka molekularno istraživanih nametnika roda *Anisakis* po pojedinom domaćinu.

	BROJ DUPINA	VRSTA DUPINA	BROJ UZORAKA
1.	23	<i>Tursiops truncatus</i>	5
2.	38	<i>Tursiops truncatus</i>	5
3.	68	<i>Grampus griseus</i>	5
4.	69	<i>Grampus griseus</i>	10
5.	71	<i>Stenella coeruleoalba</i>	4
6.	79	<i>Stenella coeruleoalba</i>	10
7.	84	<i>Grampus griseus</i>	10
8.	115	<i>Stenella coeruleoalba</i>	8
9.	116	<i>Ziphius cavirostris</i>	8
10.	120	<i>Tursiops truncatus</i>	2
11.	136	<i>Tursiops truncatus</i>	2
12.	142	<i>Tursiops truncatus</i>	2
13.	143	<i>Tursiops truncatus</i>	1
14.	146	<i>Stenella coeruleoalba</i>	10
15.	168	<i>Tursiops truncatus</i>	4
16.	177	<i>Tursiops truncatus</i>	3
17.	203	<i>Tursiops truncatus</i>	12
18.	211	<i>Tursiops truncatus</i>	10
19.	212	<i>Tursiops truncatus</i>	4
20.	228	<i>Tursiops truncatus</i>	8
21.	232	<i>Tursiops truncatus</i>	1
22.	241	<i>Tursiops truncatus</i>	10
23.	244	<i>Stenella coeruleoalba</i>	5
24.	246	<i>Stenella coeruleoalba</i>	15
25.	248	<i>Tursiops truncatus</i>	2
26.	254	<i>Tursiops truncatus</i>	9
Ukupno			165

Raspon broja analiziranih oblića po domaćinu se kretao od 1 (u dva dupina nije postojao veći sačuvani broj uzoraka) do najviše 15 oblića istog domaćina. Od ukupno 165 uzoraka za molekularnu analizu, 97 uzoraka je bilo čuvano u otopini 70 % etilnog alkohola na temperaturi od -20°C, a 68 uzoraka se nalazilo fiksirano u otopinama 4 do 10 % formalina na sobnoj temperaturi.

Ukupna DNK 97 uzoraka oblića čuvanih u etilnom alkoholu izolirana je modificiranom verzijom metode po Saliju (Hogan i sur., 1994). Od svake jedinice oblića *Anisakis* spp. odrezan je srednji dio tijela (ne veći od 5 mm) radi očuvanja bitnih morfoloških obilježja prednjeg i zadnjeg dijela tijela. Komadić tkiva je stavljen u plastičnu tubicu (Eppendorf, 2 ml) s 200 µl lizirajućeg pufera (*Lysing buffer*), te je neposredno prije digestije dodan enzim proteinaza K (5 µl proteinaze K koncentracije 20 mg/ml po uzorku, konačne

koncentracije ~ 385 µg/ml). Uzorci su stavljeni na digestiju preko noći uz protresanje na 55°C (do konačne razgradnje tkiva). Nakon razgradnje tkiva uzorci su centrifugirani 10 minuta na 12 000 okretaja u minuti. Supernatant je premješten u čistu tubicu (ukoliko se pokupio talog ponovljeni su koraci centrifugiranja i odvajanja supernatanta). U svaki uzorak je dodan 1 volumen izopropanolnog alkohola (200 µl) te su uzorci protreseni na vorteks aparatu i centrifugirani 10 minuta na 12 000 okretaja u minuti. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a na talog je dodano 500 µl 70 % etilnog alkohola. Uzorci su okrenuti nekoliko puta i centrifugirani 10 minuta na 12 000 okretaja u minuti. Budući da se u ovom koraku izolirana DNK nalazi pričvrćena za dno tubice, supernatant je odliven, te je talog ostavljen da se osuši kroz 20 minuta. Nakon sušenja u svaki uzorak je dodan odgovarajući volumen TE pufera (20 – 30 µl, ovisno o količini vidljivog DNK taloga). U slučaju kada se odmah pristupalo lančanoj reakciji polimerazom (PCR) uzorci su prethodno zagrijani 10 minuta na 55°C.

Za izolaciju DNK iz uzoraka koji su bili čuvani u formalinu korišten je dio naputaka iz protokola za ekstrakciju DNK tkiva čuvanih u formalinu (Vachot i Monerot, 1996). Svaki uzorak iz formalina je ispiran 4 puta u TE puferu, tako da je stavljen u 1 ml TE pufera na 55°C uz protresanje na 350 rpm. Vrijeme ispiranja se povećavalo od 1 minute u prvom ispiranju do dva i pol sata u zadnjem ispiranju. Nakon zadnjeg ispiranja uzorci su prebačeni u plastične tubice s 200 µl lizirajućeg pufera, te je neposredno prije digestije dodano 5 µl enzima proteinaza K u svaki uzorak. Uzorci su stavljeni na digestiju 24 do 72 sata uz protresanje na 55°C. Nakon prve digestije pregledom uzoraka je utvrđeno da razgradnja tkiva nije bila potpuna te je u svaki uzorak dodano novih 4 µl enzima proteinaza K. Uzorci su ponovo stavljeni na digestiju preko noći uz protresanje na 55°C. Treći dan je u dio uzoraka s vidljivim tkivom dodano još 4 µl enzima proteinaza K, te su stavljeni na digestiju uz protresanje kroz nekoliko sati. Nakon uočene potpune digestije svih uzoraka pristupilo se izolaciji DNK uobičajenim načinom prema ranije spomenutom protokolu.

2.4.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR, *Polymerase chain reaction*)

Lančanom reakcijom polimeraze je umnažan fragment mitohondrijske DNK, lokus citokrom oksidaze podjedinice 2 (COII), dužine oko 600 parova baza (bp, *base pairs*). Za umnožavanje ciljane regije mitohondrijske DNK je korišteno po 10 µM svake specifične početnice: uzvodna početnica 5' TCTGACTTCCAATCAGAGG 3' i nizvodna početnica 5' GTCACCTTCCAAAGCAATGG 3'.

U plastične tubice (0,2 ml) čiji je broj odgovarao broju uzoraka za analizu, podijeljene su jednake količine PCR smjese (*Master mix*), izrađene od sljedećih sastojaka neophodnih za PCR reakciju:

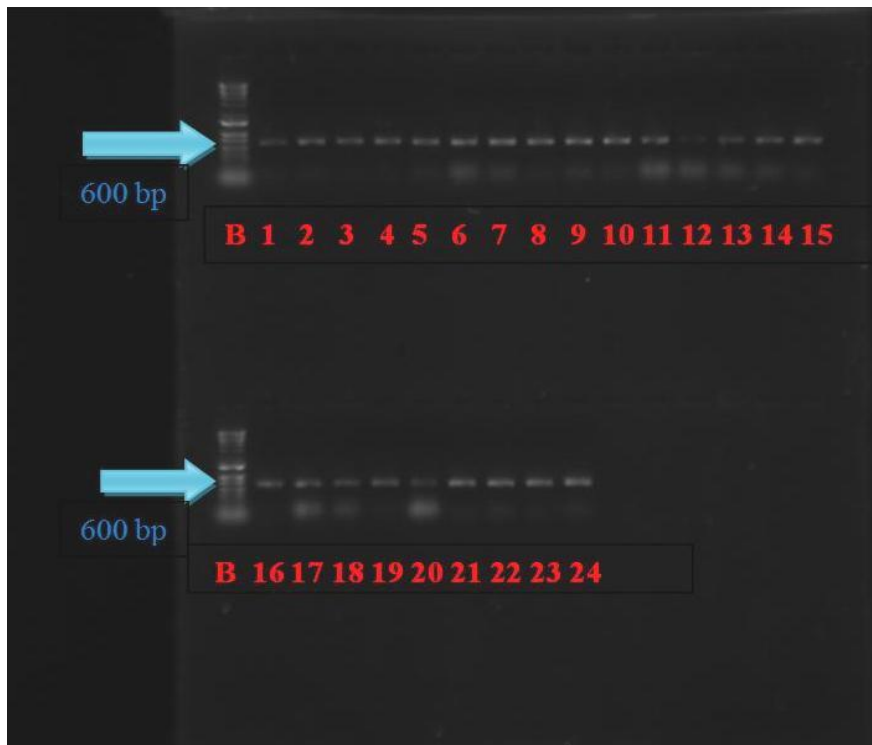
Destilirana voda	18,9 μ l
10xbuffer	2,5 μ l
MgSO ₄ (50mM)	1 μ l
dNTP (10mM)	0,5 μ l
početnica F	0,5 μ l
početnica R	0,5 μ l
Taq (polimeraza)	0,1 μ l

Nakon PCR smjese, u svaku tubicu je dodano po 1 μ l DNK kalupa (prethodno izolirane DNK uzoraka), tako da je ukupni volumen za PCR iznosio 25 μ l. PCR reakcije su provedene na uređaju GeneAmpPCR System 2700 (Applied Biosystems). Proces umnožavanja se sastojao od 2 minute početne denaturacije DNK na 94°C. Zatim 35 ciklusa u kojima se prvo 30 sekundi na 94°C denaturirala DNK, 30 sekundi spajanja početnica s kalupom na 55°C i produženje lanaca od 1 minute na 72°C djelovanjem enzima polimeraze i nukleotida iz smjese. Na kraju je uslijedilo završno produljenje lanaca 7 minuta na 72°C. Nakon završetka PCR reakcije uzorci su čuvani na 4°C do provjere produkata na 1 % agaroznom gelu.

2.4.3. Elektroforeza PCR produkata

Dužina (broj parova baza) i prisutnost umnoženih fragmenata DNK (PCR produkata) su provjereni elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Gel je pripremljen dodatkom 0,75 g agaroze u 75 ml TAE pufera. Smjesa je zagrijana do vrenja uz povremeno miješanje, te ohlađena na temperaturu 40 do 50°C, uz blago miješanje kako ne bi zaostali mjehurići zraka. Ostali dio postupka proveden je u uvjetima bez svjetlosti zbog visoke osjetljivosti SybrSafe boje za gel, koje je dodano 5 μ l u smjesu. Još tekući gel je izliven u kalup, te je u njega umetnut češalj za jažice. Nakon 20 do 30 minuta kada se gel ohladio na sobnu temperaturu i polimerizirao, češalj je izvađen i gel je potopljen u TAE pufer u kadici uređaja za elektroforezu. U prvu jažicu gela mikropipetom je dodano 5 μ l DNK biljega. U ostale jažice uneseni su PCR produkti prethodno pomješani s DNK bojom, tako da je 5 μ l svakog PCR produkta mikropipetom pomiješano s 2 μ l DNK boje. Nakon nanošenja svih uzoraka na gel, provedena je elektroforeza u trajanju 30 minuta, koliko je bilo potrebno da se PCR produkti

razdvoje na osnovi dužine. Rezultati lančne reakcije polimerazom su po završetku elektroforeze provjereni izlaganjem gela UV svjetlosti transiluminatora, te su dokumentirani digitalnim fotoaparatom (Slika 15.). Vidljiva svjetlost na mjestima do kojih su se pomakli DNK fragmenti, uslijed izlaganja električnoj energiji, potječe od obojene DNK i tumači se kao pozitivan rezultat umnažanja DNK.



Slika 15. Gel (1 % agaroz) s produktima lančane reakcije polimerazom obojenim DNK bojom, nakon završene elektroforeze i izlaganja UV svjetlosti transiluminatora. Slovo B označava DNK biljeg (lijevo gore i dolje) koji služi kao mjerilo dužine (broja parova baza). Plava strelica pokazuje mjesto na biljegu (i gelu) koje odgovara dužini od 600 bp. Brojevi označavaju fragmente DNK uzoraka koji se nalaze iznad njih.

2.4.4. Pročišćavanje PCR produkata i sekvenciranje

Volumen svakog PCR produkta nakon provjere elektroforezom iznosio je 20 μ l. Prije sekvenciranja produkti se pročišćavaju, odnosno odvajaju od molekula koje su u reakcijama ostale neiskorištene, a mogu ometati sekvenciranje ciljanih fragmenata DNK. Pročišćavanje je provedeno pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), slijedeći upute iz protokola proizvođača. Pročišćeni PCR produkti su poslani u laboratorij „MacroGen Europe“, Nizozemska, na sekvenciranje zajedno s uzvodnom početnicom. Sekvenciranje je

provedeno na aparatu ABI 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems), korištenjem kita ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit.

2.5. Analiza dobivenih sekvenci mitohondrijske DNK nametnika *Anisakis* spp.

2.5.1. Genetska raznolikost i populacijska struktura haplotipova vrste *Anisakis pegreffii*

Nukleotidni slijedovi (sekvence) fragmenta mitohondrijske DNK su poravnati pomoću algoritma Clustal W (Thompson i sur., 1994) implementiranog u programu MEGA 5.05 (Tamura i sur., 2011). Uz sekvence dobivene ovim istraživanjem za poravnanje i usporedbu korišteno je 10 referentnih sekvenci roda *Anisakis* i jedna roda *Pseudoterranova*, koje se nalaze u GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) bazi podataka pod sljedećim pristupnim brojevima: DQ116433.1 (*Anisakis brevispiculata*), DQ116434.1 (*Anisakis paggiae*), DQ116428.1 (*Anisakis pegreffii*), DQ116432.1 (*Anisakis physeteris*), DQ116429.1 (*Anisakis simplex* C), DQ116426.1 (*Anisakis simplex* 1), DQ116427.1 (*Anisakis typica*), DQ116430.1 (*Anisakis ziphidarum*), AJ132189.1 (*Anisakis simplex*), DQ116431.1 (*Anisakis* sp. SM-2005), DQ116435.1 (*Pseudoterranova ceticola*). Nakon poravnanja odrezani su krajevi sekvenci, te je dobiven jednoznačan poredak (*alignment*) 153 sekvence, svaka dužine 561 bp.

Točnost svake sekvence provjerena je u programu Sequence Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems Inc., 2005) pregledom kromatograma. Posebno su pregledana područja niskih vrijednosti kvalitete određenog nuleotida $QV < 20$ (*Quality Value*) te ručno popravljena pogrešno očitana nukleotidna mjesta. Nakon obrade sekvence su dodane u Genbank bazu podataka, te su dobiveni pristupni brojevi za svaku sekvencu ovog istraživanja, od KC479891 do KC480043 (Prilog 1.). Genetska raznolikost i populacijska struktura su određivane samo za vrstu *Anisakis pegreffii* jer su vrste *A. simplex* i *A. physeteris* bile zastupljene u nedovoljnom broju uzoraka (3;2).

Genetska raznolikost je određena u programima DnaSP 5.0 (Librado i Rozas, 2009) i Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005) procjenom broja haplotipova (H), polimorfnih mjesta (S), raznolikosti haplotipova (h, genska raznolikost; Nei, 1987), nukleotidne raznolikosti (π ; Nei, 1987) i srednjeg broja razlika između parova slijedova (k, Tajima, 1983). Mjere genetske raznolikosti izračunate su za kompletan uzorak (148) sekvenci i posebno za populacije

nametnika odvojene prema vrsti domaćina. Nametnici izolirani iz probavnog sustava dobrih dupina su označeni prvom populacijom (Pop1), plavobijelih dupina populacijom dva (Pop2), glavatih dupina populacijom tri (Pop3) i krupnozubog dupina četvrtom populacijom (Pop4). Pomoću programa MEGA 5.05 (Tamura i sur., 2011) izračunata je ukupna prosječna udaljenost, te udaljenost između parova sekvenci. Pri računanju genetske udaljenosti korišten je Tamura-Nei model s gama parametrom 0,063 zbog variranja stope supstitucije između nukleotida unutar sekvenci (gama distribucija).

Statistički izbor modela koji najbolje opisuje supstituciju nukleotida i daje parametar oblika gama distribucije za istraživane sekvence određen je programom jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) pomoću Bayes informacijskog kriterija (BIC; Schwarz, 1978). Model evolucije TrN+G (Tamura i Nei, 1993) uz parametar gama, odabran BIC metodom, korišten je u analizi molekularne varijance (AMOVA) i filogenetskoj analizi.

Procjena genetske strukturiranosti populacija je provedena hijerarhijskom analizom molekularne varijance (AMOVA), koja se temelji na analizi varijance genskih frekvencija uz korištenje broja mutacija između utvrđenih haplotipova (Excoffier i sur., 1992). Hijerarhijska analiza razdvaja ukupnu genetsku varijancu na dvije komponente (kovarijance). Prvu komponentu čine genetske razlike između haplotipova unutar populacije, a drugu razlike haplotipova između različitih populacija. Za testiranje značajnosti rezultata usporedbe između populacija korišteno je 10 000 permutacija. Populacijska diferencijacija se određuje računanjem fiksacijskog indeksa F_{ST} koji uspoređuje populacije s ukupnim uzorkom. F_{ST} kao i analiza molekularne varijance ukazuje na mjeru veće ili manje genetske strukturiranosti populacija. Vrijednost fiksacijskog indeksa nastaje računanjem udjela genetske raznolikosti između populacija u ukupnoj genetskoj raznolikosti cijelog uzorka (Barton, 2007). Testom usporedbe genetske diferencijacije između populacija su procijenjeni fiksacijski indeksi F_{ST} između parova populacija, a statistička značajnost je testirana s 10 000 permutacija. Moguće vrijednosti F_{ST} fiksacijskog indeksa se nalaze u rasponu od 0 do 1. Vrijednosti blizu nule označavaju nepostojanje genetske strukturiranosti između populacija, ili vrlo nisku genetsku diferencijaciju, nasuprot vrijednostima bliže broja 1 koje označavaju jaku genetsku strukturiranost između uspoređivanih populacija (Baldwin, 2010). Negativne vrijednosti fiksacijskog indeksa tretiraju se jednako nuli. AMOVA i F_{ST} izračuni su izvedeni u programu Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005). Genetske udaljenosti između haplotipova su ispravljene korištenjem Tamura i Nei modela nukleotidne supstitucije s gama parametrom ($G=0,0630$) statistički odabranim u programu jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008).

Nulta hipoteza populacijske panmiksije je testirana programom Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005) pomoću egzaktnog testa diferencijacije haplotipova između populacija. Egzaktni test populacijske diferencijacije haplotipova služi testiranju hipoteze koja tvrdi da uočene distribucije frekvencija imaju manju vjerojatnost od vjerojatnosti distribucije očekivane u panmiksiji (Raymond i Rousset, 1995). Vjerojatnosti su procijenjene permutacijskom analizom korištenjem 10 000 nasumično permutiranih r (populacija) $\times k$ (različitih haplotipova) na osnovi dobivenih podataka o frekvencijama haplotipova.

Provedena su dva testa neutralnosti Tajima D (Tajima, 1989) i Fu-ov F_S (Fu, 1997), na osnovi 20 000 simuliranih uzoraka radi provjere nulte hipoteze neutralnosti mutacija. Nulta hipoteza Tajima D testa je neutralna evolucija populacije koja je u ravnoteži (odnosno nema selekcijskog pritiska na bilo koji lokus, niti je populacija nedavno narasla ili se smanjila). Tajima D (Tajima, 1989) test se temelji na razlici između dva procjenitelja parametra θ (stopa mutacija u populaciji). Tajima procjenitelj θ_π se temelji na prosječnom broju razlika između parova sekvenci uzimajući u obzir frekvenciju alela. Wattersonov procjenitelj θ_S određuje broj segregirajućih mjesta u uzorku. Čimbenici kao što su populacijska ekspanzija, „usko grlo“ i selekcija rezultiraju statistički značajnim D vrijednostima (Tajima, 1989). Vrijednosti D blizu nule upućuju na stalnu veličinu populacije, pozitivne vrijednosti na smanjenje populacije, dok negativne vrijednosti ovog indeksa ukazuju na rast populacije. Fu-ov F_S test uspoređuje dobiveni broj haplotipova s očekivanim brojem haplotipova u slučajnom uzorku uz pretpostavku modela beskonačnog broja alela (*infinite-sites model*) i bez rekombinacije (Fu, 1997). F_S vrijednost se u slučaju demografske ekspanzije očituje značajnom negativnom vrijednošću.

Neusklađena distribucija (*mismatch distribution*) je distribucija broja razlika između nasumično uzorkovanih parova sekvenci iz ukupnog uzorka (Barton i sur., 2007). Oblikom neusklađenosti distribucije utvrđuje se populacijska ekspanzija ili ravnoteža (Rogers i Harpending, 1992; Rogers, 1995). Neusklađenost distribucije (Harpending, 1994) je ispitivana pomoću programa Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005). Podudarnost promatrane i očekivane distribucije je testirana Harpending indeksom (Hri; Harpending, 1994) i sumom kvadratnih devijacija (SSD) za procijenjene modele postepene (stupnjevite) ekspanzije (Schneider i Excoffier, 1999) u programu Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005). Statistička značajnost je procijenjena na parametrima sa 10 000 bootstrap replika pod nultom hipotezom nagle populacijske ekspanzije. Program R 2.15.1 (R Core Team, 2012) je korišten za grafički prikaz

rezultata analiza neusklađene distribucije provedenih u programu Arlequin 3.5 (Excoffier i sur., 2005).

2.5.2. Filogenetska analiza haplotipova vrste *Anisakis pegreffii*

Filogenetski odnosi i distribucija 38 haplotipova vrste *A. pegreffii* rekonstruirani su mrežom spajanja vrijednosti (*median-joining network*) mutacija u programu Network v4.5.1.6 (dostupan sa stranice: <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) (Bandelt i sur., 1999). Navedeni program služi za rekonstrukciju najjednostavnijih i najkraćih filogenetskih stabala i mreža iz istraživanih seta sekvenci, te za utvrđivanje pravih i potencijalnih osnivača (predaka), evolucijskih grananja i procjenu povijesnog vremena razdvajanja haplotipova (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). U izgradnji mreže korištene su standardno zadane vrijednosti parametara težine i epsilon. Za čišćenje mreže od nepotrebnih srednjih vektora i veza upotrebljena je programska opcija MP (*maximum parsimony*) (Polzin i sur., 2003). Mreža spajanja vrijednosti mutacija se sastoji od čvorova i linija koje ih povezuju. Čvorovi predstavljaju jednu ili više DNK sekvenci iz seta podataka (ako je uz čvor oznaka jedne od sekvenci) ili srednje vektore ako je čvor označen s mv (*median vector*). Srednji vektori su hipotetske (često osnivačke) sekvence za koje program procjenjuje da su potrebne za spajanje postojećih sekvenci u najjednostavniju i najkraću filogenetsku mrežu. Linije koje povezuju čvorove označavaju genetsku vezu i udaljenost dviju sekvenci, a crveno ispisani brojevi na linijama su nukleotidna mjesta na kojima je došlo do mutacije (Bandelt i sur., 1999).

2.5.3. Filogenetska analiza vrsta roda *Anisakis* korištenjem BI (*Bayesian inference*) analize

BI analiza (Larget i Simon, 1999) je napravljena na sekvencama oblića roda *Anisakis* izoliranih ovim istraživanjem (Prilog 1.) zajedno sa sekvencama (Prilog 2.) preuzetim iz GenBank baze podataka fragmenta COII (N=164), koristeći MRBayes v3.1.2 program (Huelsenbeck i Ronquist, 2001). Analiza je rađena pod pretpostavkom modela TrN+G evolucije (Tamura i Nei, 1993), prethodno testiranim programom jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). Četiri inkrementirajuća „grijana“ Markovljeva lanca je provedeno kroz 2 000 000 generacija, uz uzorkovanje svake tisućite generacije, a gdje je 500 uzoraka odbačeno. Za MCMC parametre su korištene zadane postavke. Konsezusno stablo s pravilom 50 % većine je izrađeno na temelju rezultirajućih BI podataka i vizualizirano korištenjem FigTree programa (dostupno sa stranice: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) uz prikaz posteriornih vjerojatnosti (*posterior probability*).

3. REZULTATI

3.1. Rezultati populacijske dinamike i brojnosti nametnika

3.1.1. Zaraženost kitova zubana nametnikom *Anisakis* spp. u hrvatskom dijelu Jadranskog mora

Pregledom probavnog sustava uginulih kitova, u zaraženih jedinki, oblići su nađeni najčešće u prvoj komori želuca (predželudac), zatim u drugoj komori (žljezdani dio želuca) i najrjeđe u trećoj i četvrtoj komori (pilorični dio želuca). U nekoliko slučajeva oblići su nađeni u jednjaku (Slika 16.) i početnom dijelu tankog crijeva, što vjerojatno predstavlja migraciju nametnika prema izlazu iz tijela domaćina nakon njegove smrti.



Slika 16. Fotografija otvorenog jednjaka tijekom razudbe dobrog dupina (*T. truncatus*, oznaka 232) u kojem su nađeni odrasli oblići roda *Anisakis*. Žuta strelica pokazuje vrh grkljana, zelene strelice jedinke nametnika, a bijele strelice sluznicu jednjaka (izvor: Arhiva projekta MZOŠ "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640)).

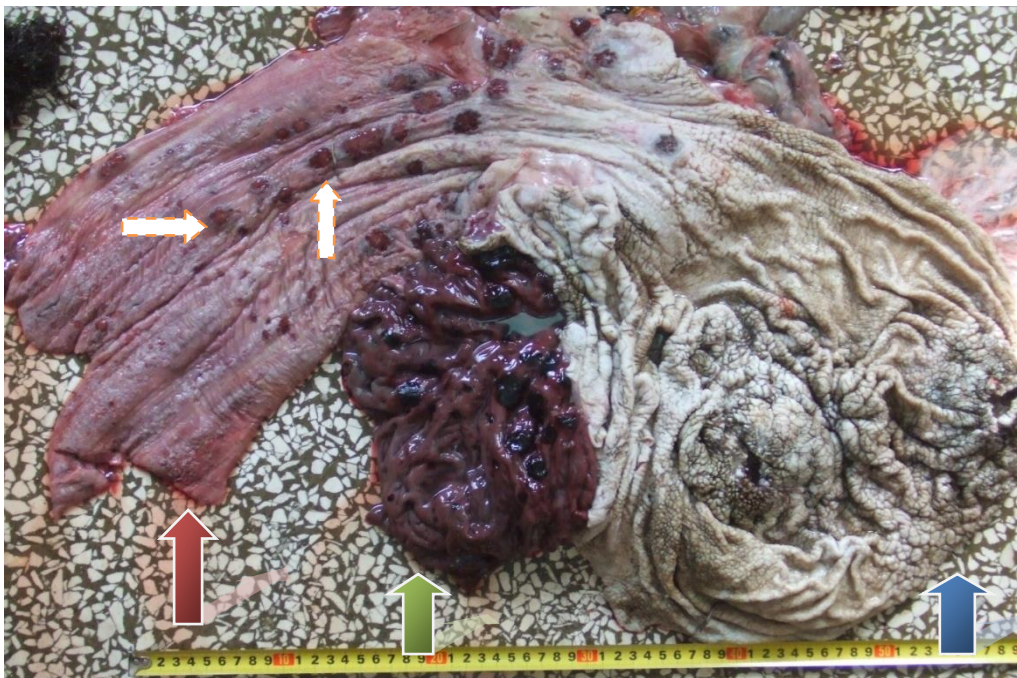
Pregledom kitova u vrlo kratkom razdoblju od uginuća, u zaraženih jedinki oblići su bili živi i vrlo vijabilni i do 96 sati od uginuća domaćina. U malom broju kitova u sluznici želuca su nađeni nametnički čvorovi, no zbog prirode biokemijskih reakcija unutar takvih procesa, zasad nije potvrđeno da li se u čvorovima nalaze nametnici roda *Anisakis*. Pregledom želuca zaraženih kitova u 71 % slučajeva su uz prisutne oblice nađene i erozije u sluznici želuca (Slika 17.) u kojima se najčešće držala skupina nametnika (Slika 18.). U nekoliko dupina erozije su nađene i u sluznici jednjaka (Slika 19.). Statistički značajna razlika ($p=0,04$, 95 % interval pouzdanosti 1,18 % do 48,42 %) je utvrđena između postotka zaraženih plavobijelih dupina s erozijama želuca (92,31 %) i zaraženih dobrih dupina kojima su uz oblice utvrđene i erozije sluznice želuca (61,76 %).



Slika 17. Fotografija kutane sluznice 1. komore želuca, dobrog dupina (*T. truncatus*, oznaka 203) zaraženog oblicima roda *Anisakis*, s vidljivim erozijama (tamna ovalna područja u bijeloj sluznici) (izvor: Arhiva projekta MZOŠ "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640)).



Slika 18. Fotografija erozije u kutanoj sluznici 1. komore želuca dobrog dupina (*T. truncatus*, oznaka 177) i oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz erozije (izvor: Arhiva projekta MZOŠ "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640)).



Slika 19. Fotografija erozija (bijeले strelice) u sluznici jednjaka (crvena strelica) dobrog dupina (*T. truncatus*, oznaka 170) zaraženog oblicima roda *Anisakis*. 1. komora želuca (plava strelica) i 2. komora želuca (zelena strelica) (izvor: Arhiva projekta MZOŠ "Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu" (053-0533406-3640)).

3.1.2. Populacijska dinamika oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora

Prevalencija oblića roda *Anisakis* u uginulim kitovima zubanima (N=181) pronađenim u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od listopada 1990. godine do travnja 2012. godine, iznosila je 28,73 % (95 % interval pouzdanosti 22,5 % - 35,9 %). Prevalencija nametnika računata bez mladih kitova starosti do godinu dana (N=163) iznosila je 31,90 % (95 % interval pouzdanosti 25,1 % - 39,5 %), a geografska raspodjela mjesta nalaza uginulih kitova zubana prikazana je na Slici 20.



Slika 20. Geografski prikaz Jadranskog mora s označenim lokacijama mjesta nalaza kitova zubana (N=163) uginulih od listopada 1990. godine do travnja 2012. godine. Žutom bojom označene su jedinke kitova u kojih nije utvrđena prisutnost nametnika *Anisakis* spp., a crvenom bojom su označene zaražene jedinke (31,90 %). Različiti oblici oznaka predstavljaju određene vrste kitova: krug – dobri dupin (*T. truncatus*), trokut – glavati dupin (*G. griseus*), kvadrat – plavobijeli dupin (*S. coeruleoalba*) i krug s točkom – krupnozubi dupin (*Z. cavirostris*). Skalom plave boje su označene različite dubine mora, od najsvjetlije za dubine 0-50 metara do najtamnije plave boje za dubine veće od 1 000 metara.

Srednja abundancija oblića u 163 domaćina (bez mladih kitova starosti do godinu dana) iznosila je 1 209,96 s granicama intervala pouzdanosti 95 % utvrđenim bootstrap metodom replika 510,4 – 2 764,9. Srednji intenzitet oblića je iznosio 3 781,13 uz 95 % interval pouzdanosti 1 778,9 – 7 128,4 (određen bootstrap metodom replika). Omjer varijance i srednje abundancije oblića iz 163 domaćina je iznosio 14 228,12 s indeksom nepodudarnosti (*discrepancy*) $D=0,911$. Usporedbom očekivanih frekvencija teoretskog modela negativne binomne razdiobe sa stvarnim frekvencijama podataka, uz korištenje metode najveće vjerojatnosti (*maximum likelihood*), nije utvrđeno značajno odstupanje ($\chi^2=24,6769$, $p>0,05$). EkspONENT negativne binomne razdiobe k iznosio je 0,048. Na temelju utvrđenih rezultata nulta hipoteza podudarnosti podataka istraživanja s teoretskim modelom negativne binomne razdiobe se ne odbacuje.

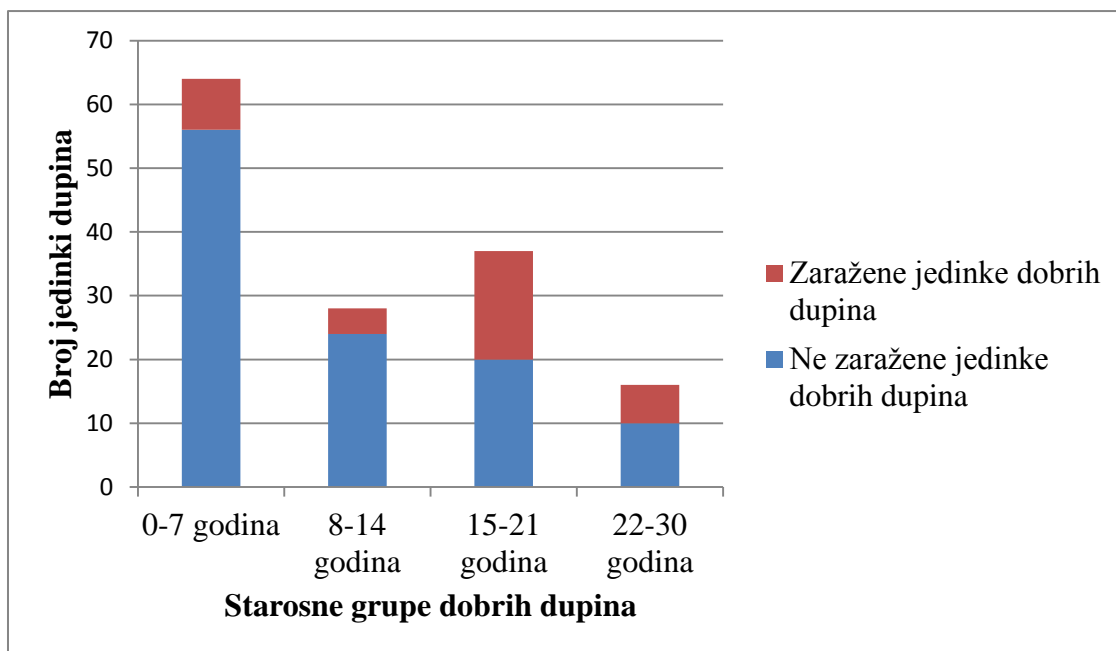
Prevalencija oblića *Anisakis* spp. dobrih dupina (bez jedinki do godine dana starosti) iznosila je 26,92 % (95 % interval pouzdanosti 19,94 % - 35,34 %), a plavobijelih dupina 52 % (95 % interval pouzdanosti 31,71 % - 70,41 %). Vrijednosti utvrđenog srednjeg intenziteta, srednje abundancije, omjera varijance i srednje abundancije, te indeksa nepodudarnosti oblića izoliranih iz dobrih i plavobijelih dupina se nalaze u Tablici 3.

Tablica 3. Rezultati populacijske dinamike nametnika *Anisakis* spp. izoliranih iz dobrih dupina i plavobijelih dupina. Vrijednosti srednjeg intenziteta i abundancije su izražene uz intervale pouzdanosti (IP) 95 % dobivene bootstrap metodom replika. Indeks nepodudarnosti D može imati vrijednosti od 0 (uniformna raspodjela) do 1 (teoretsko najviše odstupanje od uniformne razdiobe).

Vrste domaćina (broj jedinki)	Srednji intenzitet (95 % IP)	Srednja abundancija (95 % IP)	Varijanca/ srednja abundancija	Indeks nepodudarnosti D
1. Dobri dupini (130)	4381,46 (1777,54- 9706,38)	1186,65 (406,63- 3047,19)	13935,31	0,901
2. Plavobijeli dupini (25)	3378,30 (379,30- 9546,20)	1778,05 (201,74- 5590,42)	14980,42	0,849

Usporedbom prevalencija oblića dobrih (26,9 %) i plavobijelih dupina (52 %), egzaktnim bezuvjetnim testom, utvrđena je statistički značajna razlika ($p=0,015$; $p<0,05$) prevalencije između dvije vrste domaćina. Ispitivanjem razlika srednjeg intenziteta i abundancije oblića iz dvije navedene vrste dupina nije utvrđena statistički značajna razlika ($p>0,05$). Frekvencije brojnosti nametnika u obje vrste domaćina nisu značajno odstupale od teoretskog modela negativne binomne razdiobe, a rezultati indeksa nepodudarnosti su bili blizu najviših teoretskih vrijednosti tog indeksa i odstupanja od uniformne razdiobe.

Usporedbom starosti dobrih dupina (N=129, bez mladih starosti do godinu dana i jedne jedinke za koju starost nije utvrđena) nezaraženih (N=94, prosječna dob 11,63) i zaraženih jedinki te vrste (N=35, prosječna dob 15,43) utvrđena je statistički značajna razlika ($t=-2,58$; $p=0,011$). Varijacija u prevalenciji prema starosnim grupama dobrih dupina (N=146, uključeni mladi do godinu dana) prikazana je na Slici 21., a rezultati testiranja razlika u prevalencijama prema dobi nalaze u Tablici 4.



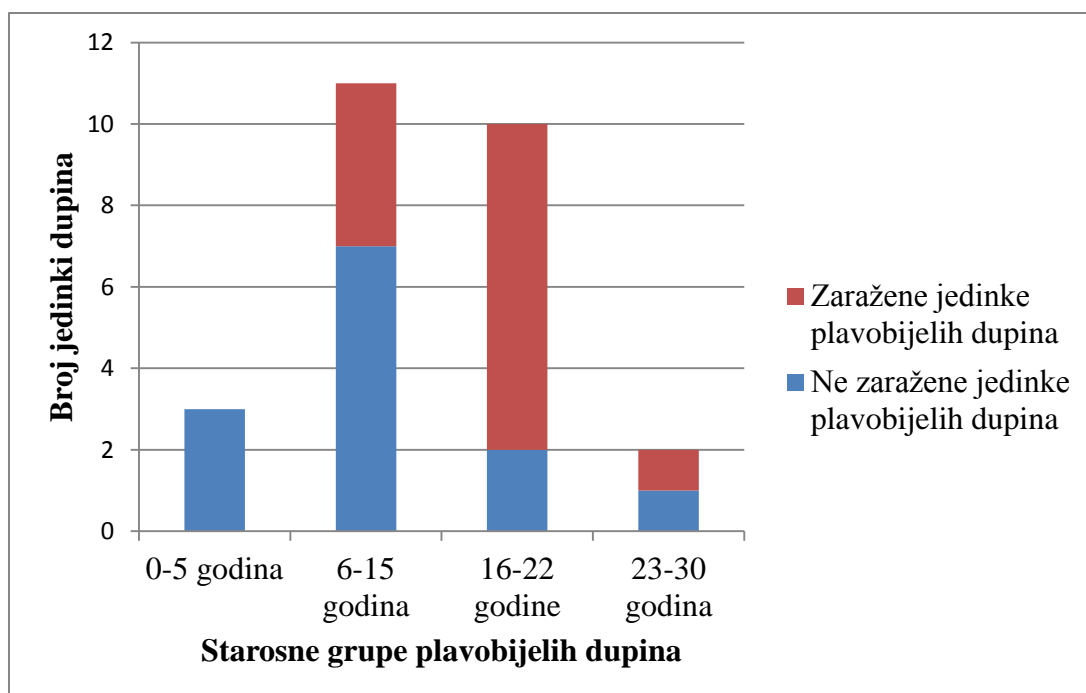
Slika 21. Prikaz prevalencije nametnika *Anisakis* spp. u dobrim dupinima po starosnim grupama dupina.

Tablica 4. Rezultati usporedbe prevalencija oblića *Anisakis* spp. između različitih dobnih skupina domaćina (dobri dupini), izraženi p-vrijednošću t-testa. Crveno označene p vrijednosti su statistički značajne ($p < 0,05$).

Dobne grupe domaćina i (prevalencija oblića)	0-7 godina (12,5 %)	8-14 godina (14,29 %)	15-21 godina (45,95 %)	22-30 godina (37,5 %)
0-7 godina(12,5 %)	p vrijednosti	0,8155	0,0003	0,0211
8-14 godina(14,29 %)	*	*	0,0088	0,0844
15-21 godina(45,95 %)	*	*	*	0,5715
22-30 godina (37,5 %)	*	*	*	*

Utvrđeno je da najmlađa dobna skupina (0 do 7 godina) ima najnižu prevalenciju oblića (12,5 %), a grupa 15 do 21 godinu starosti najvišu (45,95 %) prevalenciju. Statistički značajne razlike u prevalenciji su utvrđene između treće (15 do 21 godina) i prve (0 do 7 godina) grupe, treće i druge (8 do 14 godina) i četvrte (22 do 30) i prve grupe. Najmlađe jedinke kitova zubana u kojima su nađeni nametnici roda *Anisakis* bile su starosti 3 godine i pripadale su vrsti dobrih dupina.

U plavobijelih dupina (N=25, bez 1 jedinke starosti do godinu dana) utvrđena je najviša prevalencija (52 %), dok je u glavatih (N=6) i krupnozubih dupina (N=2) prevalencija iznosila 50 %. T-testom je utvrđena statistički značajna razlika ($t = -2,423$; $p = 0,0237$) u starosti grupe plavobijelih dupina koji nisu bili zaraženi (N=12, prosječna dob 12,92 godine) i dobi jedinki koje su bile zaražene oblicima roda *Anisakis* (N=13, prosječna dob 18,15 godina). Varijacije prevalencije prema dobnim skupinama plavobijelih dupina (N=26, uključena 1 jedinka starosti do godinu dana) prikazane su na Slici 22., a p vrijednosti dobivene testiranjem razlika između prevalencija se nalaze u Tablici 5.



Slika 22. Prikaz prevalencije oblića *Anisakis* spp. po dobnim skupinama plavobijelih dupina.

Pregledom probavnog sustava uginulih plavobijelih dupina nije utvrđena zaraženost prve starosne skupine, a najmlađa jedinka u kojoj su nađeni nametnici roda *Anisakis* bila je starosti 10 godina. Dobna skupina od 16 do 22 godine starosti u koju ulaze jedinke potpune spolne i fizičke zrelosti imala je najveću prevalenciju oblića (80 %). Statistička značajnost razlike u prevalenciji po dobnim skupinama plavobijelih dupina je utvrđena samo između prve (0 do 5 godina) i treće (16 do 22 godine) grupe. Za glavate i krupnozube dupine nije bilo moguće napraviti podjelu prema starosnim grupama zbog premalog broja jedinki.

Tablica 5. Rezultati t-testa (p vrijednost) između prevalencija nametnika roda *Anisakis* prema starosnim grupama krajnjih domaćina (plavobijeli dupini). Rezultati označeni crveno su statistički značajni ($p < 0,05$)

Dobne grupe u godinama i (prevalencija nametnika)	0-5 godina (0)	6-15 godina (36,36 %)	16-22 godina (80 %)	23-30 godina (50 %)
0-5 godina (0)	p vrijednosti	0,2402	0,0296	0,2644
6-15 godina (36,36 %)	*	*	0,0579	0,7223
16-22 godina (80 %)	*	*	*	0,3921
23-30 godina (50 %)	*	*	*	*

U četiri vrste kitova čije su lešine pregledane u kraćem periodu od uginuća (F, MD; N=74) prevalencija nametnika *Anisakis* spp. iznosila je 51,35 %, a u lešina kitova uznapređovalog stupnja raspadanja (AD; N=89) utvrđena je znatno manja prevalencija (15,73 %). Usporedbom prevalencije lešina kitova zubana prema stupnju starosti lešine utvrđena je statistički značajna razlika ($p=0,0004$, interval pouzdanosti 95 % 21,3 % - 48,2 %) u broju zaraženih lešina koje su bile svježije (F) i srednjeg stupnja raspadanja (MD) od broja lešina s uznapređovalim stupnjem raspadanja (AD) u kojima je postmortalno nađen istraživani nametnik.

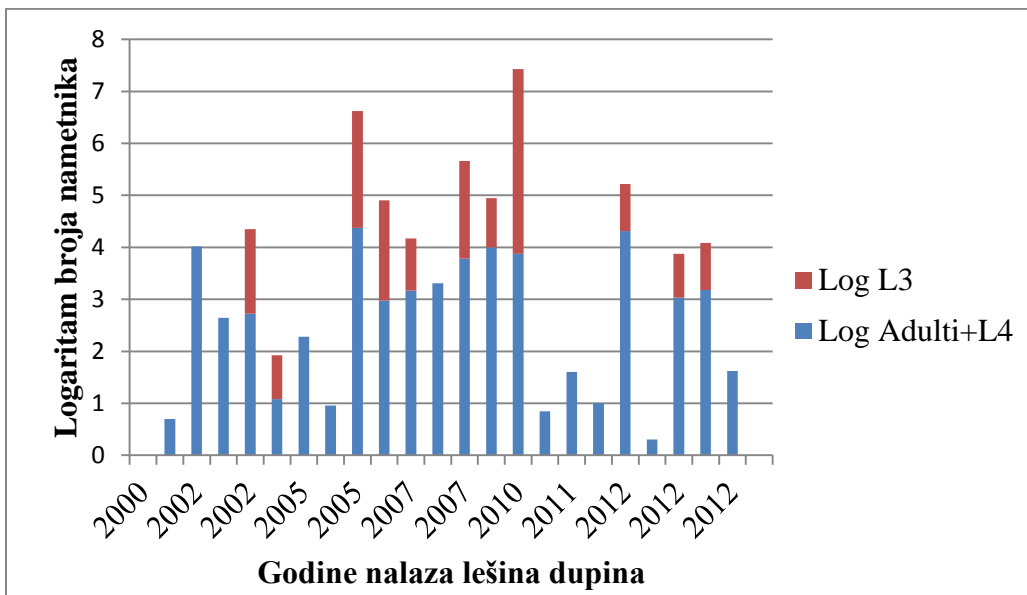
Podjelom svih jedinki kitova prema spolu (N=162, bez kitova starosti do godinu dana i jedne jedinke za koju nije utvrđen spol) utvrđeno je (Tablica 6.) da su mušjaci imali veću prevalenciju (37,93 %) od ženki (25,33 %), no razlika nije bila statistički značajna ($p=0,0887$, 95 % interval pouzdanosti -1,83 % - 26,09 %). Jednaki trend je uočen unutar vrsta dobrih i plavobijelih dupina, dok za glavate i krupnozube dupine analizu nije bilo moguće provesti zbog premalog uzorka.

Tablica 6. Podjela postmortalno pregledanih kitova zubana (N=162, bez kitova starosti do godinu dana i jedne jedinke za koju nije utvrđen spol) prema spolu i udjelu zaraženih jedinki unutar spola nametnikom *Anisakis* spp.

	Dobri dupini		Plavobijeli dupini		Sve četiri vrste kitova	
	Mušjaci	Ženke	Mušjaci	Ženke	Mušjaci	Ženke
Ne zaraženi	45	49	7	5	54	56
Zaraženi	21	14	8	5	33	19
Ukupno	66	63	15	10	87	75
Prevalencija	31,82 %	22,22 %	53,35 %	50,00 %	37,93 %	25,33 %

3.1.3. Brojnost nametnika *Anisakis* spp. po domaćinu

Iz 24 uginula kita zubana u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od ožujka 2000. godine do travnja 2012. godine ukupno je izbrojano 90 747 oblića roda *Anisakis*. Broj nametnika (adulti i ličinke) pojedinog domaćina raspoređen po godinama uginuća dupina nalazi se u grafičkom prikazu Slike 23. U 20 uzoraka iz kojih je prebrojana svaka jedinka bilo je 40 324 oblića, a 50 423 oblića se nalazilo u 4 uzorka čiji je broj procijenjen brojanjem jedinki u poduzorcima (Tablica 7.). Najmanji broj nametnika (1 jedinka) je nađen u dva domaćina (dobri dupin oznake 39 i plavobijeli dupin oznake 265), a najveći broj nametnika (24 032) je imao dobri dupin pod oznakom 142 (Tablica 7.). U 10 uzoraka nije pronađena niti jedna ličinka 3. stadija L_3 , a najveći broj ličinki oblića *Anisakis* spp. (3 561) je imao mužjak dobrog dupina oznake 212.



Slika 23. Grafički prikaz logaritmiranog broja nametnika *Anisakis* spp. po domaćinu, prema godinama uginuća dupina. Plavi dio stupca na grafu označava broj odraslih i L_4 oblića, a crveni dio označava broj ličinki 3. stadija (L_3).

Tablica 7. Podaci o brojnosti oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz uginulih kitova zubana u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od ožujka 2000. godine do travnja 2012. godine. Brojevi dupina odgovaraju oznakama pod kojima se jedinke nalaze u službenom protokolu, a brojevi označeni zvjezdicom (*) su uzorci čiji je ukupan broj oblića procijenjen poduzorkovanjem.

Broj dupina	Vrsta dupina	Godina nalaza	Ukupno <i>Anisakis</i> spp.	Mušjaci <i>Anisakis</i> spp.	Ženke <i>Anisakis</i> spp.	<i>Anisakis</i> spp. No (adulti + L4)	<i>Anisakis</i> spp. L ₃
39	<i>T. truncatus</i>	2000	1	0	0	0	1
68	<i>G. griseus</i>	2001	5	0	2	3	0
79*	<i>S. coeruleoalba</i>	2002	10 364	0	0	10 364	0
80	<i>T. truncatus</i>	2002	443	34	100	309	0
99	<i>T. truncatus</i>	2002	572	87	135	308	42
115	<i>S. coeruleoalba</i>	2004	19	0	0	12	7
136	<i>T. truncatus</i>	2005	190	74	80	36	0
141	<i>T. truncatus</i>	2005	9	1	0	8	0
142*	<i>T. truncatus</i>	2005	24 032	9 145	1 179	4 539	176
143	<i>T. truncatus</i>	2005	1 036	332	315	305	84
168	<i>T. truncatus</i>	2007	1 484	307	384	783	10
170	<i>T. truncatus</i>	2007	2 037	601	762	674	0
177*	<i>T. truncatus</i>	2007	6 112	1 702	1 825	2 509	76
203*	<i>T. truncatus</i>	2009	9 915	2 400	2 665	4 841	9
212	<i>T. truncatus</i>	2010	11 118	141	237	7 179	3 561
244	<i>S. coeruleoalba</i>	2011	8	0	0	7	1
246	<i>S. coeruleoalba</i>	2011	41	2	1	37	1
248	<i>T. truncatus</i>	2011	10	0	0	10	0
257	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	20 703	2 560	2 385	15 750	8
258	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	2	0	0	2	0
259	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	1 081	0	0	1 074	7
261	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	1 522	475	473	566	8
263	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	42	13	20	9	0
265	<i>S. coeruleoalba</i>	2012	1	0	0	1	0

3.1.4. Korelacije broja nametnika s biološkim osobinama domaćina

Ispitivanjem Spearmanove korelacije između bioloških osobina dvije vrste domaćina (Tablica 8. i 9.) i abundancije nametnika utvrđena je statistički značajna povezanost više osobina krajnjih domaćina s brojem oblića koji je u njima nađen. Vrijednosti računatih korelacija se nalaze u Tablici 10.

Tablica 8. Biološke karakteristike dvije vrste (dobri dupin, *T. truncatus* i plavobijeli dupin, *S. coeruleoalba*) kitova zubana (N=23) za koje je utvrđena brojnost nametnika *Anisakis* spp.

Broj Dupina	Vrsta dupina	Starost GLG	Spol	Masa [kg]	Dužina [cm]	Stupanj starosti lešine	Godina nalaza	Debljina masti leđa/trbuh [cm]
39	<i>T. truncatus</i>	26	F	192,00	276,00	AD	2000	1,5/1,0
79	<i>S. coeruleoalba</i>	22	F	91,00	198,00	MD	2002	0,5/0,4
80	<i>T. truncatus</i>	17	M	324,00	294,00	MD	2002	3,2/2,5
99	<i>T. truncatus</i>	12	M	249,00	256,00	F	2002	2,4/2,0
115	<i>S. coeruleoalba</i>	22	F	96,00	197,00	F	2004	1,8/1,4
136	<i>T. truncatus</i>	7	M	161,00	260,00	MD	2005	1,0/1,5
141	<i>T. truncatus</i>	18	F	197,00	282,00	MD	2005	2,3/2,0
142	<i>T. truncatus</i>	23	M	270,00	307,00	AD	2005	1,7/1,0
143	<i>T. truncatus</i>	20	F	163,50	263,00	F	2005	0,5/0,3
168	<i>T. truncatus</i>	3	M	89,00	199,00	F	2007	1,2/1,0
170	<i>T. truncatus</i>	17	M	222,00	288,00	F	2007	1,8/1,3
177	<i>T. truncatus</i>	19	M	234,00	322,00	MD	2007	1,2/1,0
203	<i>T. truncatus</i>	25	F	218,00	280,00	F	2009	2,0/1,8
212	<i>T. truncatus</i>	20	M	245,00	299,00	F	2010	2,0/1,1
244	<i>S. coeruleoalba</i>	30	M	89,00	213,00	MD	2011	2,5/2,0
246	<i>S. coeruleoalba</i>	21	M	80,00	206,00	F	2011	2,0/2,0
248	<i>T. truncatus</i>	15	F	155,00	260,00	MD	2011	1,0/1,0
257	<i>S. coeruleoalba</i>	21	M	75,00	201,00	MD	2012	1,4/1,5
258	<i>S. coeruleoalba</i>	18	M	83,00	208,00	F	2012	1,8/1,1
259	<i>S. coeruleoalba</i>	17	F	73,00	210,00	MD	2012	1,8/1,4
261	<i>S. coeruleoalba</i>	10	M	69,00	213,00	MD	2012	2,0/1,7
263	<i>S. coeruleoalba</i>	17	M	78,00	210,00	F	2012	1,4/1,2
265	<i>S. coeruleoalba</i>	17	M	89,00	198,00	F	2012	1,5/1,4

Tablica 9. Biološke karakteristike 45 od ukupno 107 jedinki dvije vrste kitova zubana (dobri dupin, *T. truncatus* i plavobijeli dupin, *S. coeruleoalba*) u kojima postmortalnim pregledom nije nađen nametnik *Anisakis* spp.

Broj dupina	Vrsta dupina	Starost GLG	Spol	Masa [kg]	Dužina [cm]	Stupanj starosti lešine	Godina nalaza	Debljina masti leđa/trbuh [cm]
1	<i>T. truncatus</i>	9	Ž	204,0	265,0	F	1990	
3	<i>T. truncatus</i>	7	M	240,0	263,0	MD	1992	2,8/3,0
6	<i>T. truncatus</i>	4	M		241,5	MD	1993	
15	<i>T. truncatus</i>	12	M	279,0	290,0	MD	1996	3,0/2,5
20	<i>T. truncatus</i>	21	Ž	241,0	288,0	F	1997	3,0/2,5
40	<i>T. truncatus</i>	13	M	288,0	288,0	MD	2000	2,0/2,0
41	<i>T. truncatus</i>	12	Ž	224,0	261,0	MD	2000	2,0/2,0
54	<i>T. truncatus</i>	17	Ž	236,0	281,0	MD	2001	2,3/2,4
55	<i>T. truncatus</i>	2	Ž	62,0	165,0	MD	2001	2,0/1,7
76	<i>T. truncatus</i>	12	M	177,5	272,0	MD	2002	1,9/0,9
87	<i>T. truncatus</i>	5	Ž	79,0	188,0	MD	2002	1,8/2,0
102	<i>T. truncatus</i>	20	Ž	216,0	262,0	MD	2002	2,6/2,4
103	<i>T. truncatus</i>	2	M	101,0	186,0	F	2003	2,3/1,9
107	<i>T. truncatus</i>	3	Ž	57,0	172,0	F	2003	1,9/1,9
131	<i>T. truncatus</i>	3	M	77,0	175,0	F	2004	1,5/1,5
150	<i>T. truncatus</i>	4	Ž	87,0	186,0	F	2006	2,0/2,5
167	<i>T. truncatus</i>	10	Ž		261,0	F	2007	1,8/1,6
169	<i>T. truncatus</i>	24	M	314,0	298,0	MD	2007	2,0/1,4
173	<i>T. truncatus</i>	21	Ž	167,0	291,0	MD	2007	1,7/1,0
183	<i>T. truncatus</i>	14	Ž	218,0	267,0	MD	2008	2,4/2,3
194	<i>T. truncatus</i>	20	M	206,0	285,0	MD	2008	1,6/1,3
216	<i>T. truncatus</i>	3	Ž	53,0	176,0	MD	2010	0,9/0,5
220	<i>T. truncatus</i>	6	Ž	89,0	218,0	MD	2010	1,1/1,7
221	<i>T. truncatus</i>	21	M	194,0	276,0	F	2010	1,5/1,0
225	<i>T. truncatus</i>	11	Ž	163,0	264,0	MD	2010	
227	<i>T. truncatus</i>	4	M	90,0	212,0	MD	2010	1,9/1,8
247	<i>T. truncatus</i>	3	M	105,0	202,0	F	2011	2,5/2,0
255	<i>T. truncatus</i>	2	M	46,0	158,0	F	2011	1,6/1,4
256	<i>T. truncatus</i>	2	Ž	57,0	159,0	MD	2011	1,5/1,9
32	<i>T. truncatus</i>	3	M		208,0	AD	1999	
91	<i>T. truncatus</i>	13	Ž		280,0	AD	2002	
104	<i>T. truncatus</i>	20	M		277,0	AD	2003	
127	<i>T. truncatus</i>	7	Ž		231,0	AD	2004	
151	<i>T. truncatus</i>	13	Ž		258,0	AD	2006	
195	<i>T. truncatus</i>	27	M		272,0	AD	2008	
27	<i>S. coeruleoalba</i>	11	M	99,0	198,0	F	1999	1,0/0,8
74	<i>S. coeruleoalba</i>	15	Ž	100,0	199,0	MD	2002	1,9/1,8
89	<i>S. coeruleoalba</i>	23	M	98,0	209,0	F	2002	2,0/1,5
249	<i>S. coeruleoalba</i>	20	M	75,0	214,0	MD	2011	1,0/0,7
81	<i>S. coeruleoalba</i>	12	M		188,0	AD	2002	

121	<i>S. coeruleoalba</i>	12	Ž		203,0	AD	2004	
179	<i>S. coeruleoalba</i>	11	M		192,0	AD	2008	
180	<i>S. coeruleoalba</i>	11	Ž		204,0	AD	2008	
29	<i>S. coeruleoalba</i>	5	Ž			AD	1999	
34	<i>S. coeruleoalba</i>	3	M			AD	1999	

Tablica 10. Rezultati Spearmanove korelacije (R) i p vrijednosti koeficijenta korelacije između parova varijabli: 1. biološka osobina domaćina 2. abundancija oblića (koeficijent korelacije statistički značajan za $p < 0,05$). Crvenom bojom su označeni statistički značajni rezultati ($p < 0,05$).

	Broj oblića roda <i>Anisakis</i>		
	Ukupan broj	Broj adulta	Broj L ₃ stadija
Dob svih kitova	R= 0,4241 p=0,0003	R=0,3915 p=0,0011	R=0,3665 p=0,0023
Dob <i>T. truncatus</i>	R= 0,3666 p=0,0104	R= 0,3145 p=0,0295	R= 0,3365 p=0,0194
Dob <i>S. coeruleoalba</i>	R= 0,4542 p= 0,0443	R= 0,4542 p= 0,0443	R= 0,3002 p= 0,1984
<i>T. truncatus</i> Tjelesna dužina [cm]	R= 0,3703 p=0,0096	R= 0,3548 p= 0,0134	R= 0,2709 p= 0,0626
<i>S. coeruleoalba</i> Tjelesna dužina [cm]	R= 0,2681 p= 0,2531	R= 0,2681 p= 0,2531	R= 0,2773 p= 0,2365
<i>T. truncatus</i> Tjelesna masa [kg]	R= 0,2796 p= 0,0892	R= 0,2775 p= 0,0916	R= 0,2126 p= 0,2001
<i>S. coeruleoalba</i> Tjelesna masa [kg]	R= -0,5891 p= 0,0266	R= -0,5891 p= 0,0266	R= -0,5437 p= 0,0445
<i>T. truncatus</i> Debljina masnog tkiva leđa	R= -0,1735 p= 0,3045	R= -0,1735 p= 0,3045	R= -0,1688 p= 0,3179
<i>T. truncatus</i> Debljina masnog tkiva trbuh	R= -0,3047 p= 0,0667	R= -0,3016 p= 0,0697	R= -0,3320 p= 0,0447
<i>S. coeruleoalba</i> Debljina masnog tkiva leđa	R= -0,0854 p= 0,7716	R= -0,0854 p= 0,7716	R= 0,3731 p= 0,1888
<i>S. coeruleoalba</i> Debljina masnog tkiva trbuh	R= 0,0660 p= 0,8226	R= 0,0660 p= 0,8226	R= 0,5043 p= 0,0659

Starost kitova zubana pokazala je statistički značajnu pozitivnu korelaciju s brojem oblića roda *Anisakis* u odraslim i ličinačkim stadijima ($R=0,37 - 0,42$; $p<0,01$). Porast broja nametnika sa starošću domaćina je utvrđen i unutar vrsta dobrih i plavobijelih dupina s izuzetkom broja ličinki 3. stadija u plavobijelih dupina. U dobrim dupina porastom tjelesne dužine značajno je rastao i broj odraslih nametnika ($R=0,35 - 0,37$; $p<0,05$), dok broj ličinki 3. stadija nije bio povezan s dužinom domaćina ($p>0,05$). U dobrim dupina nije utvrđena korelacija tjelesne mase i broja oblića, za razliku od plavobijelih dupina čija je masa tijela statistički značajno negativno korelirala s brojem oblića roda *Anisakis* ($R=-0,54$ do $-0,59$; $p<0,05$). Povezanost debljine masnog tkiva (*blubber*) domaćina s brojem nametnika je utvrđena samo u dobrim dupina (debljina masnog tkiva trbuh), pri čemu je koeficijent korelacije broja ličinki nametnika bio negativan ($R= -0,33$; $p<0,05$). Testiranjem razlike broja nametnika prema spolu domaćina, Mann-Whitney U testom, nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0,56 - 0,75$). Računanjem Spearmanove korelacije između bioloških značajki kitova (Tablica 8.) i intenziteta broja oblića (Tablica 7.) nije utvrđena statistički značajna povezanost ispitivanih varijabli. Korelacijski koeficijent (r) veći od 0,50 je utvrđen samo između jednog para varijabli koje se nalaze u Tablici 11. (broj ličinki 3. stadija i debljina masnog tkiva na trbušnoj strani u plavobijelih dupina, rezultat označen crveno). Korelacija za dvije navedene varijable ($R= 0,60$) nije bila statistički značajna zbog p vrijednosti veće od 0,05 ($p= 0,065$).

Tablica 11. Rezultati izračuna Spearmanove korelacije (R) i p vrijednosti koeficijenta korelacije između parova varijabli: 1. biološka osobina domaćina 2. intenzitet oblića u pojedinom domaćinu (koeficijent korelacije statistički značajan za $p < 0,05$). Crvenom bojom označen je jedini korelacijski koeficijent veći od 0,50 (između dvije zadnje varijable), s p vrijednosti koja nije statistički značajna.

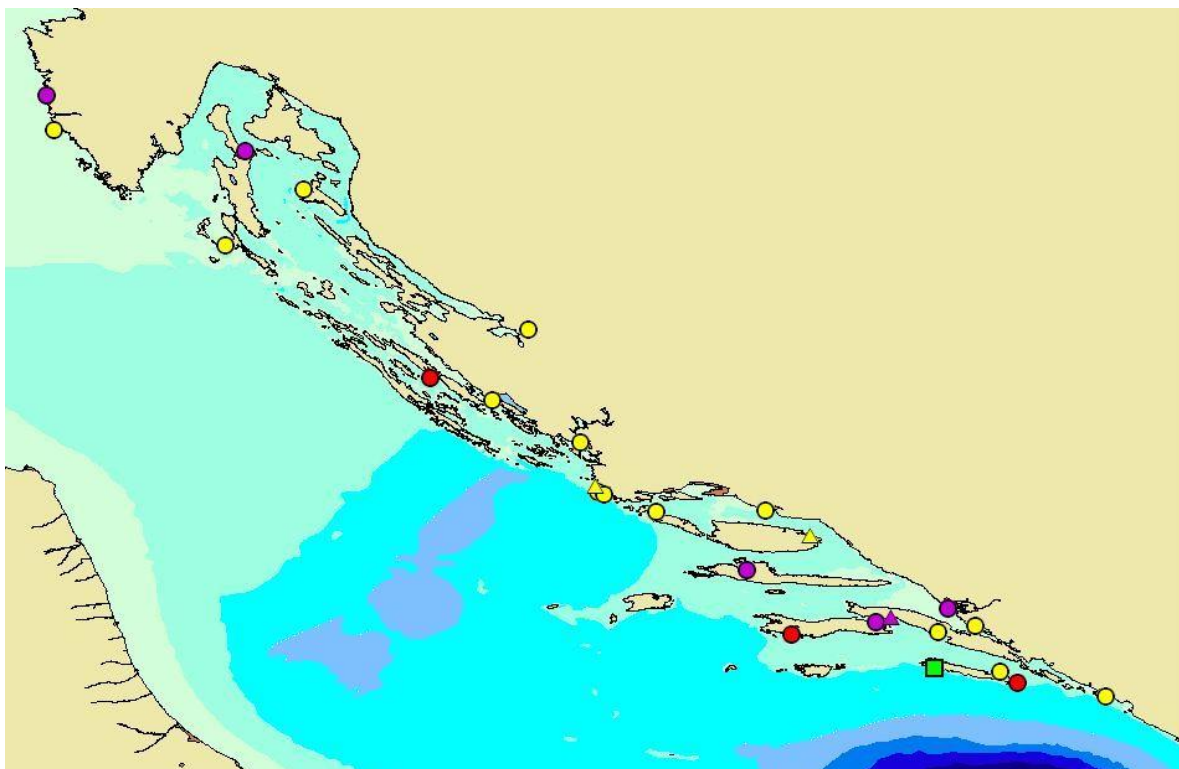
	Broj oblića roda <i>Anisakis</i>		
	Ukupan broj	Broj adulta	Broj L₃ stadija
Dob svih kitova	R= 0,066121 p=0,764	R=0,069584 p=0,752	R=0,221728 p=0,309
Dob <i>T. truncatus</i>	R= 0,2672 p=0,377	R= 0,281 p=0,3524	R= 0,4081 p=0,1663
Dob <i>S. coeruleoalba</i>	R= -0,0556 p= 0,08788	R= -0,0556 p= 0,8788	R= -0,0708 p= 0,8460
<i>T. truncatus</i> Tjelesna dužina [cm]	R= 0,4979 p=0,0833	R= 0,4759 p= 0,1002	R= 0,2717 p= 0,3693
<i>S. coeruleoalba</i> Tjelesna dužina [cm]	R= 0,0673 p= 0,8535	R= 0,0673 p= 0,8535	R= 0,1976 p= 0,5843
<i>T. truncatus</i> Tjelesna masa [kg]	R= 0,3091 p= 0,3550	R= 0,2818 p= 0,4011	R= 0,2098 p= 0,5359
<i>S. coeruleoalba</i> Tjelesna masa [kg]	R= -0,4681 p= 0,1725	R= -0,4681 p= 0,1725	R= -0,5004 p= 0,1408
<i>T. truncatus</i> Debljina masnog tkiva leđa	R= 0,0275 p= 0,9361	R= 0,0275 p= 0,9361	R= -0,1296 p= 0,7041
<i>T. truncatus</i> Debljina masnog tkiva trbuh	R= -0,2851 p= 0,3955	R= -0,2575 p= 0,4446	R= -0,4774 p= 0,1375
<i>S. coeruleoalba</i> Debljina masnog tkiva leđa	R= -0,3828 p= 0,2749	R= -0,3828 p= 0,2749	R= 0,3538 p= 0,3159
<i>S. coeruleoalba</i> Debljina masnog tkiva trbuh	R= -0,0185 p= 0,9596	R= -0,0185 p= 0,9596	R= 0,6028 p= 0,0651

3.2. Rezultati molekularne analize

3.2.1. Uspješnost i rezultati molekularne identifikacije vrsta roda *Anisakis*

Sekvencioniranje fragmenta mitohondrijske DNK dalo je pozitivne rezultate u 155 od ukupno 165 uzoraka. U 10 uzoraka od 68 čuvanih u formaldehidu sekvencioniranje nije bilo uspješno. Uzorci sačuvani fiksiranjem u etilnom alkoholu su svi uspješno sekvencionirani, no slijedovi 2 uzorka su imali vrlo lošu kvalitetu kromatograma te su isključeni iz daljnje analize. Dužina sekvencionirane regije mitohondrijske DNK u većini uzoraka iznosila je oko 630 parova baza.

Rezultati usporedbe nukleotidnih slijedova 153 istraživane sekvence s poznatim sekvencama u banci gena, pomoću BLASTn alata, ukazali su na postojanje tri vrste roda *Anisakis* u Jadranskom moru. Najveći broj oblića (148), odnosno 96,73 % uzoraka, pripadalo je vrsti *Anisakis pegreffii*, koja je već ranije utvrđena na ovom području molekularnim metodama. Vrste *A. simplex* i *A. physeteris* su ovim istraživanjem prvi puta identificirane na području Jadranskog mora. Zastupljenost oblića *A. simplex* je iznosila 1,96 % (N=3), a vrste *A. physeteris* 1,31 % (N=2). Vrste i zemljopisni položaj lešina kitova zubana iz kojih su molekularno identificirane vrste roda *Anisakis* prikazan je na Slici 24. Analizom sastava vrsta oblića prema pojedinoj vrsti domaćina utvrđena je mješana infekcija u dobrim dupina (*A. pegreffii* 97,44 % i *A. simplex* 2,56 %), plavobijelih dupina (*A. pegreffii* 97,62 % i *A. simplex* 2,38 %) i krupnozubog dupina (*A. pegreffii* 75 % i *A. physeteris* 25 %), dok su glavati dupini bili zaraženi jednom vrstom (*A. pegreffii* 100 %).



Slika 24. Geografski prikaz Jadranskog mora s oznakama mjesta nalaza lešina kitova zubana iz kojih su molekularno identificirane vrste roda *Anisakis* u razdoblju od 12. siječnja 1999. godine do 20. kolovoza 2011. godine. Crvenom bojom označeni su kitovi vrste glavati dupin (*G. griseus*), ružičastom bojom plavobijeli dupini (*S. coeruleoalba*), žutom bojom dobri dupini (*T. truncatus*) i zelenom bojom krupnozubi dupin (*Z. cavirostris*). Oblik oznake predstavlja vrstu nametnika: krug – samo *A. pegreffii*, trokut – *A. pegreffii* i *A. simplex*, kvadrat – *A. pegreffii* i *A. physeteris*. Dubina mora označena je skalom plave boje, od najsvjetlije za dubine 0-50 metara do najtamnije plave boje za dubine veće od 1 000 metara.

3.2.2. Genetska raznolikost vrste *Anisakis pegreffii* u ukupnom uzorku i u populacijama odvojenim prema vrsti domaćina

Ukupno je korišteno 148 dobivenih sekvenci oblića *Anisakis pegreffii*, a dužina sekvenci (fragmenta) mitohondrijske DNK iznosila je 561 bp. U potpunom uzorku utvrđeno je 47 polimorfnih mjesta i 38 haplotipova čije su razlike prikazane na Slici 25.

	10	20	30	40	50	60
	*	*	*	*	*	*
H1	ACTTTAATTGTAGTCTGCTTTTTGGTGTTCCTTTCTTTTGTATCTGTTATGTTTGGCTATC					
H2	.A.....					
H3C.....		
H4					
H5					
H6					
H7C.....					T.....
H8C.....					T.....
H9					T.....
H10					
H11					
H12	.T.....	T.....				T.....
H13					
H14					
H15			T.....		
H16					T.....
H17					T.....
H18					
H19					
H20					
H21C...T.....					
H22C...T.....					
H23					
H24					
H25					
H26					
H27					
H28	.T.....					T.....
H29					
H30					
H31					
H32C.....					T.....
H33					
H34					
H35					T.....
H36					T.....
H37					
H38C.....			C.....		T.....

	70	80	90	100	110	120
	*	*	*	*	*	*
H1	TTCTTTT TAGAAATTTT TATTTT AAAAGTAAGAAGATTGAGTATCAGTTTGGTGAAC TTT					
H2					
H3					
H4					
H5					
H6					
H7					
H8					
H9					
H10					
H11					
H12					
H13					
H14					
H15					
H16					
H17					
H18					
H19					
H20					
H21					
H22					
H23					
H24					
H25					
H26					
H27					
H28					
H29					
H30					
H31					
H32	..A.....					
H33					
H34					
H35					
H36					
H37					
H38					

	130	140	150	160	170	180
	*	*	*	*	*	*
H1	TATG	TAGT	ATTTTT	CCTACT	TTTAAT	TTTTGG
H2
H3
H4
H5
H6
H7
H8
H9
H10
H11
H12
H13
H14	G
H15
H16
H17
H18
H19	C
H20	C
H21
H22
H23
H24
H25
H26
H27
H28
H29
H30
H31
H32
H33	C
H34
H35
H36
H37	A
H38

	190	200	210	220	230	240
	*	*	*	*	*	*
H1	TTTATTATTATGGTTTGATGAATCTTGATAGTAATTTAACTGTTAAAGTTACTGGTCATC					
H2					
H3					
H4					
H5					
H6					
H7			C		
H8			C		
H9					
H10					
H11					
H12	A	C			
H13					
H14					
H15					
H16					
H17					
H18					
H19					
H20					
H21	A				
H22	A				
H23					
H24					
H25					
H26					
H27					
H28					
H29					
H30					
H31					
H32			C		
H33					
H34					
H35					
H36					
H37					
H38			C		

	250	260	270	280	290	300
	*	*	*	*	*	*
H1	AGTGGTATTGGAGTTATGAGTTT	TAGGGATATCCCGGGCTTAGAATTTGATTCTTATATGA				
H2
H3
H4	A.....
H5	A.....
H6
H7
H8
H9	T.....
H10
H11
H12C.....
H13C.....
H14
H15
H16	G.....
H17
H18
H19
H20
H21C.....
H22C.....
H23
H24
H25
H26	T.....
H27
H28
H29	A.....
H30
H31
H32
H33
H34	T.....
H35
H36
H37
H38

	310	320	330	340	350	360
	*	*	*	*	*	*
H1	AGTCTGTGGACCAGTTGGAGCTAGGTGAGCCTCGTCTTTTGGAGGTTGATAATCGTTGTG					
H2					
H3					
H4			A		
H5					
H6	T				
H7					
H8					
H9					
H10					
H11					
H12	T				
H13					
H14					
H15					
H16					
H17					
H18					
H19					
H20					
H21	T				
H22	T				
H23					
H24					
H25				C	
H26					
H27	T				
H28					
H29					
H30					
H31					
H32					
H33					
H34					
H35					
H36					
H37	T				
H38					

	370	380	390	400	410	420
	*	*	*	*	*	*
H1	TCG	TTC	CTT	GTG	ATATTA	ATG
H2
H3
H4
H5	.T
H6
H7
H8
H9
H10	C
H11	.T
H12	.T	C	A
H13	C
H14
H15
H16
H17	C
H18	C
H19	.T
H20
H21	.T	A
H22	.T	A
H23
H24
H25
H26
H27
H28	A	C
H29
H30	.T
H31
H32
H33	.T
H34	.T
H35
H36
H37
H38

	430	440	450	460	470	480
	*	*	*	*	*	*
H1	GGGCTTTGCCTAGGATGTCTATTAAGTTGGATGCCATGAGTGGTATTTTATCTACTGTTT					
H2					
H3					
H4C.....					
H5					
H6					
H7					
H8T.....					
H9					
H10					
H11C.....					
H12A.....T.....					
H13					
H14					
H15C.....					
H16					
H17					
H18					
H19					
H20T.....					
H21A.....T.....					
H22A.....T.....					
H23A.....					
H24					
H25					
H26A.....					
H27C.....					
H28					
H29C.....					
H30T.....C.....					
H31T.....					
H32					
H33					
H34					
H35					
H36					
H37					
H38					

	490	500	510	520	530	540
	*	*	*	*	*	*
H1	CTTATAGTTTTTCCTACTGTAGGTGTGTTTTATGGTCAATGTTTCAGAGATTTGTGGGGCTA					
H2					
H3					
H4					
H5					
H6					
H7					
H8					
H9G.....					
H10					
H11C.					
H12C.....					
H13					
H14					
H15C.					
H16					
H17					
H18					
H19					
H20					
H21C.....					
H22C.....					
H23					
H24C.....					
H25					
H26					
H27					
H28					
H29					
H30					
H31					
H32G.....					
H33					
H34					
H35					
H36					
H37					
H38					

	550	560
	*	*
H1	ACCATAGTTTTTATGCCCATTG	
H2	
H3	
H4	
H5	
H6	
H7	
H8	
H9	
H10	
H11	
H12	
H13	
H14	
H15	
H16	
H17	
H18	
H19	
H20	
H21	
H22C.....	
H23	
H24	
H25	
H26	
H27	
H28	
H29	
H30	
H31	
H32	
H33	
H34	
H35	
H36	
H37	
H38	

Slika 25. Prikaz 38 utvrđenih haplotipova 148 sekvenci vrste *Anisakis pegreffii* s označenim varijabilnim nukleotidnim mjestima.

Od ukupno 47 polimorfnih (segregirajućih) mjesta, 19 su bila singeltoni s dvije moguće varijante. U 28 filogenetski informativnih (*parsimony informative*) mjesta, 27 su imala dvije varijante, a jedno mjesto tri varijante. Divergencija sekvenci (Tamura i Nei udaljenost) između haplotipova se kretala od minimalne vrijednosti 0 % (0,2 %) do maksimalno 9,1 % s prosječnom vrijednosti 0,7 %.

Definiranih 38 haplotipova u najvećem postotku (66 %) su činili jedinstveni haplotipovi (25) zastupljeni s jednom jedinkom. Najveći postotak jedinstvenih haplotipova vrste *A. pegreffii* (72 %) nađen je u populaciji 1 (Pop 1, *Tursiops truncatus*), a ostali jedinstveni haplotipovi (28 %) su se nalazili u populaciji 2 (Pop 2, *Stenella coeruleoalba*).

Haplotip 1 (H1) je pokazao najveću ukupnu učestalost (frekvenciju) u potpunom uzorku (60 %), najveću frekvenciju u svakoj od 4 populacije (Tablica 12.), te je ujedno i jedini zajednički haplotip svim populacijama. Najviše zajedničkih haplotipova (9) je nađeno između populacije 1 i populacije 2. Pripadnost sekvenci, odnosno uzoraka, određenom haplotipu nalazi se u Tablici 13.

Računanjem genetskih indeksa raznolikosti dobivena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) $0,6360 \pm 0,0471$, te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) $0,004520 \pm 0,002706$. Ukupan srednji broj razlika između parova slijedova (k) iznosio je $2,535760 \pm 1,371660$. Vrijednosti izračunatih osnovnih indeksa raznolikosti ukupno i po populacijama prikazuje Tablica 14.

Analizom je utvrđen i sastav nukleotida (Tablica 15.) u ukupnom uzorku i pojedinačno za svaku populaciju. Najmanju relativnu vrijednost zastupljenosti je imao citozin s 11,94 %, a najveću timin s 45,10 %.

Tablica 12. Frekvencije haplotipova 148 sekvenci vrste *Anisakis pegreffii* u ukupnom uzorku i zasebno po populacijama odvojenim prema vrsti krajnjeg domaćina.

Haplotip	Ukupna frekvencija (148)	Frekvencija Pop 1 (76)	Frekvencija Pop 2 (41)	Frekvencija Pop 3 (25)	Frekvencija Pop 4 (6)
H1	89	38	24	21	6
H2	4	1	0	3	0
H3	2	0	1	1	0
H4	2	1	1	0	0
H5	2	1	1	0	0
H6	2	1	1	0	0
H7	2	1	1	0	0
H8	1	0	1	0	0
H9	1	1	0	0	0
H10	1	1	0	0	0
H11	1	1	0	0	0
H12	1	1	0	0	0
H13	1	1	0	0	0
H14	1	1	0	0	0
H15	1	1	0	0	0
H16	1	1	0	0	0
H17	1	1	0	0	0
H18	1	1	0	0	0
H19	3	3	0	0	0
H20	1	1	0	0	0
H21	7	5	2	0	0
H22	1	1	0	0	0
H23	1	1	0	0	0
H24	1	1	0	0	0
H25	2	1	1	0	0
H26	1	1	0	0	0
H27	2	1	1	0	0
H28	1	1	0	0	0
H29	1	1	0	0	0
H30	1	1	0	0	0
H31	1	0	1	0	0
H32	1	0	1	0	0
H33	1	0	1	0	0
H34	1	0	1	0	0
H35	2	1	1	0	0
H36	1	0	1	0	0
H37	1	0	1	0	0
H38	4	4	0	0	0

Tablica 13. Podjela uzoraka (sekvenci) vrste *Anisakis pegreffii* prema haplotipu kojem pripadaju. Prva dva slova svakog uzorka označavaju prva slova imena domaćina (kita) iz kojeg su oblici izolirani (Tt- *T. truncatus*, Sc- *S.coeruleoalba*, Gg-G. *griseus*, Zc- *Z. cavirostris*). Brojevi predstavljaju oznaku dupina pod kojom se vodi u protokolu, a zadnje slovo (iza broja) označava uzorak nametnika.

Haplotip Pripadajući uzorci

H1	Tt168A Tt23B Tt23C Tt23D Tt23E Tt38A Tt38B Tt38C Tt38D Tt38E Tt120B Tt136A Tt143A Tt168C Tt168D Tt177A Tt203B Tt203C Tt203E Tt203H Tt203K Tt203L Tt211A Tt211D Tt211F Tt212A Tt228A Tt228C Tt228D Tt228G Tt241E Tt241H Tt248A Tt248B Tt254A Tt254E Tt254H Tt168BSc71B Sc71C Sc71D Sc79B Sc79C Sc79D Sc79E Sc79F Sc79G Sc79H Sc79I Sc115C Sc115E Sc115F Sc244A Sc244C Sc244E Sc246A Sc246H Sc246J Sc246M Sc246N Sc146A Sc146BGg68B Gg68C Gg68D Gg68E Gg69B Gg69C Gg69D Gg69E Gg69F Gg69I Gg69J Gg84A Gg84B Gg84C Gg84D Gg84E Gg84F Gg84G Gg84H Gg84I Gg84J Zc116C Zc116D Zc116E Zc116F Zc116G Zc116H
H2	Tt23A Gg69A Gg69G Gg69H
H3	Gg68A Sc79J
H4	Sc115A Tt211B
H5	Sc115B Tt211J
H6	Sc115D Tt177C
H7	Sc115G Tt211H
H8	Sc115H
H9	Tt120A
H10	Tt136B
H11	Tt142A
H12	Tt142B
H13	Tt203D
H14	Tt203F
H15	Tt203G
H16	Tt203I
H17	Tt203J
H18	Tt211C
H19	Tt211E Tt228H Tt254F
H20	Tt211G
H21	Tt212B Tt212D Sc246G Sc244D Tt241D Tt241I Tt241J
H22	Tt212C
H23	Tt228B
H24	Tt228E
H25	Tt228F Sc246B
H26	Tt232A
H27	Tt241A Sc246C
H28	Tt241B
H29	Tt241C
H30	Tt241F
H31	Sc244B
H32	Sc246D
H33	Sc246E
H34	Sc246F
H35	Sc246I Tt254B
H36	Sc246L
H37	Sc246O
H38	Tt254C Tt254D Tt254G Tt254I

Tablica 14. Vrijednosti osnovnih indeksa genetske raznolikosti ukupno i za svaku populaciju vrste *Anisakis pegreffii* odvojenu prema vrsti krajnjeg domaćina.

Vrsta Domaćina	Populacija nametnika	N	H	S	h	π	k
<i>Tursiops truncatus</i>	Pop 1	76	30	42	0,7467 +/- 0,0547	0,006226 +/- 0,003556	3,492982 +/- 1,800191
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Pop2	41	17	27	0,6622 +/- 0,0864	0,004256 +/- 0,002625	2,387805 +/- 1,325746
<i>Grampus griseus</i>	Pop3	25	3	2	0,2900 +/- 0,1095	0,000535 +/- 0,000643	0,300000 +/- 0,323671
<i>Ziphius cavirostris</i>	Pop4	6	1	0	0,0000 +/- 0,0000	0,000000 +/- 0,000000	0,000000 +/- 0,000000
	Ukupno	148	38	47	0,6360 +/- 0,0471	0,004520 +/- 0,002706	2,535760 +/- 1,371660

N, broj uzoraka; H, broj haplotipova; S, broj polimorfnih mjesta; h, raznolikost haplotipova (\pm S.D.); π , nukleotidna raznolikost (\pm S.D.); k, srednji broj razlika između parova slijedova (\pm S.D.)

Tablica 15. Sastav nukleotida u ukupnom uzorku (148) sekvenci i u svakoj populaciji vrste *Anisakis pegreffii* odvojenoj prema vrsti krajnjeg domaćina iz kojeg je izolirana.

SASTAV NUKLEOTIDA				
Populacije nametnika	C	T	A	G
Pop 1	11,95 %	45,09 %	20,38 %	22,58 %
Pop 2	11,92 %	45,12 %	20,36 %	22,59 %
Pop 3	11,93 %	45,09 %	20,34 %	22,64 %
Pop 4	11,94 %	45,10 %	20,32 %	22,64 %
Ukupno	11,94 %	45,10 %	20,37 %	22,60 %

3.2.3. Genetska struktura populacija *Anisakis pegreffii* s obzirom na vrste domaćina

Fiksacijskim indeksom F_{ST} se ispitivalo postojanje i mjera genetske diferencijacije između populacija oblića. Ukupna određena vrijednost fiksnacijskog indeksa F_{ST} je iznosila – 0,0221 s p vrijednošću koja nije statistički značajna (0,9784), što upućuje na nepostojanje genetske strukturiranosti između ispitivanih populacija. Sve vrijednosti dobivene testom usporedbe genetske diferencijacije (F_{ST}) između parova populacija (Tablica 16.) su bile negativne i bez statističke značajnosti ($p > 0,05$).

Tablica 16. Vrijednosti fiksnacijskog indeksa F_{ST} utvrđene testom usporedbe genetske diferencijacije između parova populacija (donji dio tablice, ispod dijagonale) i p vrijednosti egzaktnog testa diferencijacije populacija (gornji dio tablice, iznad dijagonale) između populacija *Anisakis pegreffii* odvojenih prema vrsti domaćina.

	Pop 1	Pop2	Pop3	Pop4
Pop1	*	0,91605	0,89752	1,00000
Pop2	-0,01630	*	0,69521	1,00000
Pop3	-0,00973	-0,00159	*	1,00000
Pop4	-0,08700	-0,09004	-0,04178	*

Statistička značajnost je testirana s 10 000 permutacija.

Rezultate fiksnacijskog indeksa između populacija potvrdila je i razdioba genetske varijacije utvrđena analizom molekularne varijance. AMOVA analizom dobivena je vrijednost -2,21 % varijance između populacija (V_a) s p vrijednošću (0,97842) koja nije statistički značajna (Tablica 17.). Takvi rezultati ukazuju na nepostojanje genetske razlike između populacija nametnika odvojenih prema vrsti domaćina. U skladu s time utvrđeno je da se ukupan postotak varijacije (V_b) nalazi unutar samih populacija (102,21 %).

Tablica 17. Rezultati analize molekularne varijance (AMOVA) sekvenci mtDNK za populacije vrste *Anisakis pegreffii*.

	Stupnjevi slobode (n-1)	Suma kvadrata	Komponente varijance	% ukupne varijance	F_{ST}	$p(F_{ST})$
Između populacija	3	1,966	-0,04301 Va	-2,21	-0,02208	0,97842
Unutar populacija	144	286,701	1,99098 Vb	102,21		
Ukupno	147	288,668	1,94797			

Rezultati egzaktnog testa diferencijacije populacija (Tablica 16.) također nisu pokazali značajne razlike između parova populacija. P vrijednost ne-diferencijacije egzaktnog testa za cijeli uzorak nije bila statistički značajna (0,98523). Na temelju ovih rezultata se hipoteza panmiksije populacija vrste *Anisakis pegreffii* na ispitivanom području ne može odbaciti.

3.2.4. Demografska povijest

U ukupnom uzorku prosječan broj razlika između parova sekvenci je bio veći od broja polimorfničkih mjesta što se očitovalo ukupno statistički značajnom ($p < 0,5$) i negativnom vrijednosti Tajima D (-2,127). Rezultati Tajima D testa neutralne evolucije s pripadajućim p vrijednostima te rezultati F_u -ove F_s statistike i p vrijednosti su prikazani u Tablici 18. Navedene vrijednosti nije bilo moguće izračunati za populaciju 4 zbog premalog uzorka ($N=6$). Dobivena D vrijednost testa ukazuje na veći broj rijetkih alela u usporedbi s očekivanim brojem pri neutralnoj evoluciji. Rezultati Tajima D testa su bili negativni za svaku ispitivanu populaciju i statistički su značajno odstupali od modela neutralne evolucije osim populacije 3. Drugi test neutralnosti mutacija, F_u -ov F_s je također pokazao negativne i statistički značajne vrijednosti rezultata, ukupno i za svaku populaciju, osim populacije 3 čija F_s vrijednost nije bila statistički značajna. Na osnovi oba testa neutralnosti, nulta hipoteza neutralne evolucije je odbačena za sve populacije (razina značajnosti $p < 0,01$) osim za populaciju nametnika izdvojenih iz glavatih dupina (populacija 3).

Tablica 18. Rezultati Tajima D i Fu-ovog F_s testa sa pripadajućim p vrijednostima za ispitivane sekvence vrste *Anisakis pegreffii*.

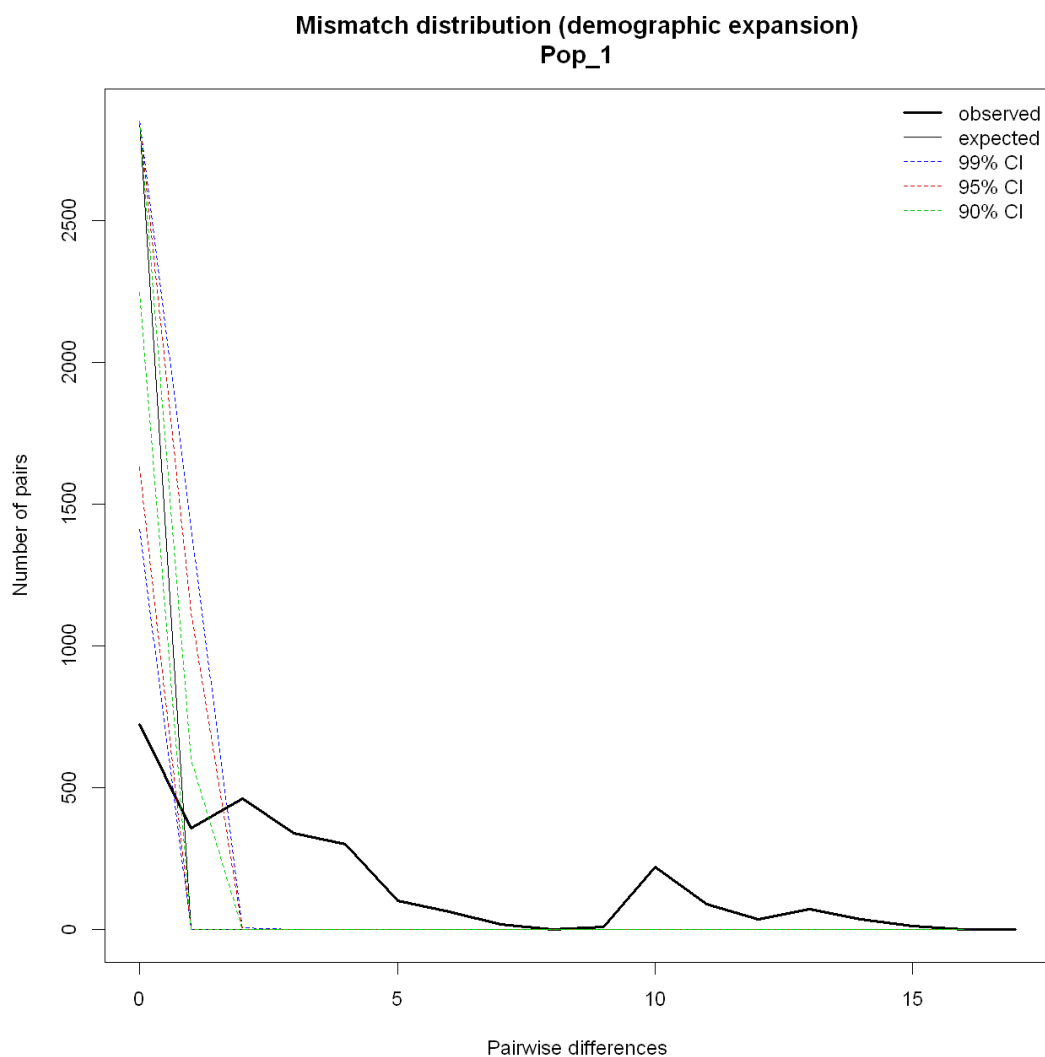
	Tajima's D		Fu's F_s	
	D	P	F_s	P
Pop 1	-1,91723	0,00585	-18,92957	0,00000
Pop 2	-2,11169	0,00365	-9,43973	0,00005
Pop 3	-0,94066	0,19395	-1,00397	0,16450
Ukupno	-2,12690	0,00110	-26,77220	0,00000

Tablica 19. Procjenjeni parametri neusklađene distribucije, vrijednosti SSD i HRI testova s pripadajućim p vrijednostima za mitohondrijsku DNK populacija vrste *Anisakis pegreffii*.

	Neusklađena (<i>mismatch</i>) distribucija			Test usklađenosti (<i>goodness-of-fit</i>)			
	τ	θ_0	θ_1	SSD	P	HRI	P
Pop1	0,000	0,000	99 999,000	0,63482	0,00000	0,03360	1,00000
Pop2	0,000	0,000	93,600	0,51884	0,00000	0,04168	1,00000
Pop3	3,000	0,000	0,430	0,00781	0,39970	0,25790	0,59830
Ukupno	0,000	0,000	99 999,000	0,47206	0,00010	0,05418	0,99990

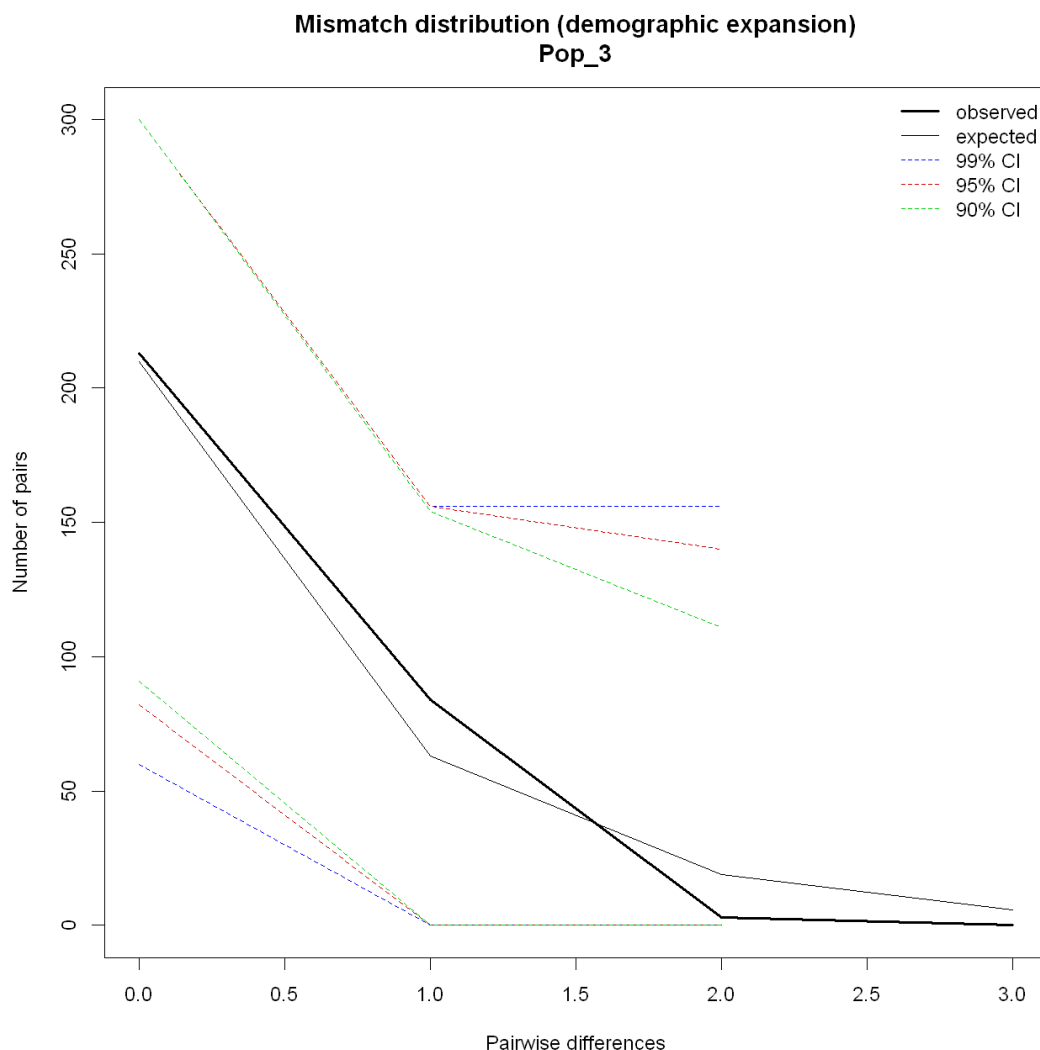
SSD , suma kvadrata devijacija; HRI , Harpending-ov indeks nazubljenosti

U istraživanju demografske povijesti vrste *A. pegreffii* populacija 4 je isključena iz analize zbog male veličine uzorka. Test usklađenosti (*goodness of fit*) je pokazao dvojake rezultate neusklađene distribucije (*mismatch distribution*) i odstupanja od predviđenog modela nagle ekspanzije populacija. Niska vrijednost Harpending indeksa (Tablica 19.) ukazala je na poklapanje ispitivanih podataka s predviđenim vrijednostima modela nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992), uz visoku p vrijednost pomoću koje se pretpostavljeni model ne može odbaciti. Rezultati sume kvadrata devijacija (SSD) su ukupno, te za populaciju 1 i 2, značajno odstupali od predviđenog modela nagle ekspanzije Rogersa i Harpendinga (1992). Dobivena bimodalna krivulja distribucije razlika između parova haplotipova, za populacije 1 (Slika 26.) i 2, bila je smještena izvan intervala pouzdanosti 95 %. Na osnovi rezultata oba testa nulta hipoteza nagle ekspanzije populacija se odbacuje za prve dvije populacije.



Slika 26. Krivulja (bimodalan oblik) distribucije razlika između parova haplotipova populacije 1, vrste *Anisakis pegreffii*. Puna crna linija označava uočenu krivulju, siva linija očekivanu liniju pod pretpostavkom modela nagle ekspanzije populacije, a isprekidane linije u boji označavaju granice pojedinog intervala pouzdanosti.

Testiranjem neusklađenosti distribucije populacije 3 dobivene su visoke p vrijednosti sume kvadrata devijacija i Harpendingovog indeksa. Krivulja neusklađene distribucije populacije 3 je bila unimodalnog oblika (Slika 27.) smještena unutar intervala pouzdanosti 99 % što dodatno potvrđuje nedavnu ekspanziju populacije 3.



Slika 27. Krivulja (unimodalan oblik) distribucije razlika između parova haplotipova populacije 3, vrste *Anisakis pegreffii*. Puna crna linija označava uočenu krivulju, siva linija očekivanu liniju pod pretpostavkom modela nagle ekspanzije populacije a isprekidane linije u boji označavaju granice pojedinog intervala pouzdanosti.

Velike razlike inicijalne populacije prije ekspanzije (parametar θ_0) i populacije nakon ekspanzije (parametar θ_1) su ukazivale na naglu ekspanziju populacija 1 i 2 (Tablica 19.). Međutim tau (τ) parametar vremena divergencije (ekspanzije) prvih dviju populacija s vrijednošću 0 je ukazao na ne postojanje nedavnog rasta spomenutih populacija. Rezultati navedenih parametara za populaciju 3 su potvrdili njenu ekspanziju, a različito vrijeme divergencije od ostale dvije populacije je sugeriralo na različiti povijesni period u kojem se ekspanzija odvila. Ukupno neusklađena distribucija populacija značajno odstupa od predviđenih vrijednosti modela nagle ekspanzije populacija, te se nulta hipoteza odbacuje.

U Tablici 20. su navedena sva nukleotidna mjesta (47) u sekvencama na kojima su utvrđene mutacije zajedno s najvećim brojem mutacija. Najčešće su bile prisutne pojedinačne mutacije 78,72 % , zatim dvostruke mutacije s 12,76 % , a 8,51 % mjesta je imalo najviše tri mutacije.

Tablica 20. Statistički podaci filogenetske mreže haplotipova vrste *A. pegreffii* s oznakama pojedinih mjesta u sekvenci i najvišim brojem mutacija po mjestu.

Mjesto u sekvenci	Najveći broj mutacija po mjestu	Mjesto u sekvenci	Najveći broj mutacija po mjestu
2	3	63	1
455	3	8	1
56	3	212	1
362	3	34	1
38	2	461	1
321	2	539	1
383	2	203	1
416	2	257	1
500	2	284	1
278	2	134	1
143	1	167	1
449	1	545	1
533	1	11	1
353	1	381	1
272	1	413	1
458	1	473	1
275	1	171	1
431	1	15	1
55	1	200	1
149	1	248	1
311	1	401	1
341	1	446	1
266	1	494	1
447	1		

3.2.6. Rezultati BI (*Bayesian inference*) analize

Korištenjem rezultata BI analize izrađeno je konsezusno stablo (Slika 29.) koje prikazuje filogenetsku povezanost između sekvenci (N=153) izoliranih ovim istraživanjem (Prilog 1.) i referentnih sekvenci (N=11) vrsta rodova *Anisakis* i *Pseudoterranova* preuzetih iz GenBank baze podataka (Prilog 2.). Dvije glavne grane stabla koje su odvojile vrste roda *Anisakis* na skupine *Anisakis* tip 1 (*A. simplex* (*sensu stricto*), *A. pegreffii*, *A. simplex C*, *A. typica*, *A. ziphidarum* i *A. nascettii*) i *Anisakis* tip 2 (*A. physeteris*, *A. brevispiculata* i *A. paggiae*) su potvrdile do sada utvrđenu topologiju vrsta unutar roda *Anisakis*. Nadalje, topologija stabla je plitka i nerazriješena, s nedostatkom klasteriranih i dobro definiranih grupa. Populacije su raspršene kroz čitavo stablo, a grupiranje je jedino uočeno za 3 skupine sekvenci vrste *A. pegreffii* (pri vrhu stabla) koje čine dva i više haplotipova (skupina 1: H21 i H12; skupina 2: H38, H7, H8 i H32; skupina 3: H4 i H29), te za klastere vrsta *A. simplex* i *A. physeteris*. Najveći dio sekvenci (N=148) izoliranih iz kitova zubana Jadranskog mora pripadao je vrsti *A. pegreffii* i na stablu se rasporedio u zajedničku skupinu s referentnom sekvencom te vrste (DQ116428.1). Dvije sekvence vrste *A. physeteris* izolirane iz krupnozubog dupina uginulog u Jadranskom moru su pokazale grupiranje sa sestrinskom grupom te vrste (Slika 29., grupa sekvenci zaokružena zelenom bojom) koju predstavlja referentna sekvenca *A. physeteris* (DQ116432.1). Tri sekvence izolirane iz dobrih i plavobijelog dupina Jadranskog mora koje pripadaju vrsti *A. simplex s.s.* su se grupirale sa sestrinskom skupinom referentne sekvence (Slika 29., sekvence zaokružene plavom bojom) *A. simplex s.s.* (AJ132189.1).

Vrsta *Pseudoterranova ceticola* (rod *Pseudoterranova*) je korištena kao vanjska grupa za ukorjenjivanje stabla roda *Anisakis*. Posteriorne vrijednosti (*posterior probability*) koje označavaju vjerojatnost pojedinog grananja ili monofiletske skupine sekvenci (*clade*), a u idealnom slučaju su bliže broju 1, su se nalazile u rasponu vrijednosti od 0,57 do 0,98 (Slika 29., brojčane vrijednosti i boje linija od žute za niže vrijednosti do crvene za najviše vrijednosti).

Slika 29. Konsezusno stablo s pravilom 50 % većine izrađeno na temelju rezultata BI (Bayesian inference) analize 153 sekvence (fragment mitohondrijske DNK, lokus citokrom oksidaze podjedinice 2 (COII), dužine 561 bp) vrsta roda *Anisakis* izoliranih iz 4 vrste kitova zubana (dobri dupin, *T. truncatus*; plavobijeli dupin, *S. coeruleoalba*; glavati dupin, *G. griseus*, i krupnozubi dupin, *Z. cavirostris*) uginulih u Jadranskom moru u razdoblju od 1999. – 2011. godine i 11 referentnih sekvenci rodova *Anisakis* i *Pseudoterranova* (na slici označene punim nazivom vrsta) preuzetih iz GenBank baze podataka. Posteriorne vrijednosti (*posterior probability*) su prikazane bročanim vrijednostima i bojom (od žute boje koja označava niže vrijednosti do crvene za najviše vrijednosti), a označavaju vjerojatnost pojedinog grananja ili monofiletske skupine sekvenci (*clade*). Stablo je ukorijenjeno korištenjem vrste *Pseudoterranova ceticola* kao vanjske grupe. Sekvence vrste *A. physeteris* se nalaze unutar zelene kružnice, a sekvence vrste *A. simplex* s.s. unutar plave kružnice.

4. RASPRAVA

4.1. Populacijska dinamika oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora

Prevalencija nametnika *Anisakis* spp. prema Mladineo (2003) i Mladineo i sur. (2003; 2012), u nekoliko istraženih vrsta riba Jadranskog mora, kao parateničnih domaćina je dosta visoka (oslić, *M. merluccius* - 88 %; šarun, *T. trachurus* - 50 %; skuša, *S. scombrus* - 92 %; lokarda, *S. japonicus* - 54 % i inćun, *E. encrasicolus* - 76 % do 100 %). U 4 vrste kitova kao krajnjih domaćina ukupna prevalencija nametnika od 31,9 %, utvrđena ovim istraživanjem, je niža od spomenutih vrijednosti za paratenične domaćine. Razdvajanjem mjera populacijske dinamike prema vrsti krajnjeg domaćina uočene su značajne razlike u prevalenciji nametnika između dobrih (26,9 %) i plavobijelih dupina (52 %), no vrijednosti srednjeg intenziteta (4 381,5 i 3 378,3) i abundancije oblića (1 186,7 i 1 778,1) su u obje vrste dupina bile visoke i bez značajne razlike. Iako su utvrđene prevalencije oblića u glavatim i krupnozubim dupinima (50 %) također bile znatno više od vrijednosti za dobre dupine, statistička značajnost razlike je izostala vjerojatno zbog malog uzorka glavatih (6) i krupnozubih (2) dupina. Jedan od čimbenika koji određuje veličinu populacija vrsta roda *Anisakis* je broj jaja koja ispuštaju morski sisavci, što je povezano s brojem zaraženih krajnjih domaćina na tom području. Budući da utvrđena prevalencija nametnika u dobrim dupina Jadranskog mora je relativno niska, da brojnost dobrih dupina u čitavom Jadranskom moru do danas nije utvrđena, a u hrvatskom djelu Jadranskog mora se procjenjuje na oko 250 jedinki (Gomerčić i sur., 2004), visoka prevalencija oblića *Anisakis* spp. u parateničnim domaćinima može upućivati da plavobijeli dupini koji povremeno dolaze u Jadransko more u većim skupinama također pridonose rasprostranjenju jaja ovog nametnika. Veličinu populacija vrsta roda *Anisakis* osim broja jaja koja se nađu u okolišu, određuje i sezonalno povećanje biomase planktona (Strømnes i Andersen, 2000; Chou i sur, 2011), pri čemu oba čimbenika variraju kroz godišnja doba. Iz tog razloga vrijednosti prevalencije, intenziteta i abundancije nametnika se ne bi smjele smatrati stalnim i ne promjenjivim, te bi istraživanja populacijske dinamike trebalo provoditi u istom vremenskom razdoblju i paralelno u sve tri skupine domaćina. Visoka vrijednost srednje abundancije oblića *Anisakis* spp. u krajnjim domaćinima u Jadranskom moru ukazuje na uspješnost ovog nametnika u tom području gdje veći broj jedinki ove vrste uspješno zaokružuje svoj životni ciklus.

Prema Mattiucci i Nascetti (2008) prevalencija vrste *A. pegreffii* u dobrim dupina iz Sredozemnog mora iznosi 10 %, što je niže od prevalencije za dobre dupine (26,9 %) utvrđene u Jadranskom moru. Intenzitet i abundancija su vrlo niski (I=1 - 15, A=10,5) u usporedbi s rezultatima (I=4 381; A=1 187) ovog istraživanja. Prevalencija oblića plavobijelih dupina od 2 % za Sredozemno more pokazuje veliku razliku od rezultata za plavobijele dupine (52 %) koji su uginuli u Jadranskom moru. Intenzitet (1-30) i abundancija (15) navedeni ovim radom su gotovo zanemarivi kada se usporede s vrijednostima u Jadranskom moru (I=3 378; A=1 778). Prema istraživanjima ekologije dobrih dupina u različitim djelovima svijeta (Wells i Scott, 2002) može se pretpostaviti da i u Jadranskom moru postoje populacije (odnosno skupine jedinki) ove vrste koje pokazuju vjernost nekom području. Takav način života jednog dijela čitave populacije Jadranskog mora bi mogao objasniti razliku u prevalenciji nametnika između dobrih dupina Jadranskog i Sredozemnog mora. Plavobijeli dupini prema istraživanjima dolaze samo povremeno u Jadransko more, no nije poznato koliko dugo se tu zadržavaju. Vrlo velika razlika prevalencije nametnika *Anisakis* spp. između jedinki uginulih u Sredozemnom moru i hrvatskom djelu Jadranskog mora može ukazivati na duži boravak i hranjenje ove vrste dupina u Jadranu, no navedena hipoteza se može utvrditi tek budućim opsežnijim istraživanjima. Budući da iz rada Mattiucci i Nascetti (2008) nije poznat točan broj kitova na kojima su utvrđene spomenute vrijednosti populacijske dinamike nametnika *Anisakis* spp. u Sredozemnom moru, razlika prevalencije može biti posljedica premalog uzorka na jednom ili oba područja. Razlika prevalencije od 50 % u plavobijelih dupina može biti i posljedica pristranosti određivanja prevalencije iz lešina u ove grupe jedinki. Naime, poznato je da je velik dio pregledanih jedinki plavobijelih dupina u Jadranskom moru (Đuras Gomerčić i sur., 2012) uginuo od bolesti zasada ne utvrđenog uzročnika. Iz tog razloga ova grupa jedinki može predstavljati dio populacije lošijeg stanja imunosnog sustava i podložnijeg nakupljanju većeg broja nametnika.

Tijekom postmortalnog pregleda 80 kitova zubana nađenih uz sjeverozapadnu obalu Španjolske, Abollo i sur. (1998) su također pronašli nametnike roda *Anisakis* u jednjaku i ždrijelu određenog broja pregledanih lešina. Takav nalaz je bio prisutan samo u dobrim dupina i jedne patuljaste ulješure (*Kogia breviceps*), dok su u plavobijelih dupina nametnici nađeni samo u želucu, što se podudara s nalazima pregledanih kitova iz Jadranskog mora. Prevalencija *Anisakis* spp. koju su utvrdili je bila viša u dobrim dupina (60 %), a niža u plavobijelih dupina (37,5 %), u odnosu na utvrđene prevalencije nametnika iz dobrih i plavobijelih dupina nađenih u Jadranskom moru. U lešina (N=2) glavatih dupina nisu utvrdili

prisutnost oblića *Anisakis* spp. za razliku od visoke prevalencije (N=6; P= 50 %) nametnika u ovoj vrsti u Jadranskom moru.

Najveće organizirano istraživanje nametnika kitova su proveli Gibson i sur. (1998) postmortalnim pregledom 300 lešina koje su pripadale 13 vrsta kitova pronađenim uz obale Engleske i Walesa. U navedenom istraživanju utvrđena je prevalencija oblića roda *Anisakis* dobrih dupina od 67 %, i plavobijelih dupina 57 %, no veličina uzorka na kojem su prevalencije određene je bila vrlo mala (N=3; N=14). Slično rezultatima ovog istraživanja, Gibson i sur. (1998) su tijekom pregleda pronašli nametnike u jednjaku 5 % zaraženih kitova, te u ustima 0,5 % lešina, no nije navedeno na koje vrste kitova se takvi nalazi odnose. Autori pretpostavljaju da je takav nalaz nametnika posljedica njihove postmortalne migracije.

Mattiucci i Nacetti (2008) navode vrlo visoku abundanciju i intenzitet nametnika roda *Anisakis* u krajnjih domaćina Antarktika i subantarktičke regije, gdje je tipičan broj nametnika po pojedinom domaćinu veći od 10^5 . U krajnjih domaćina Arktika i subarktičke regije isti parametri su puno niži, manje od 10^2 nametnika po domaćinu. Vrijednosti srednje abundancije (1 210) i intenziteta (3 781) nametnika kitova Jadranskog mora u usporedbi s okvirnim vrijednostima dvije navedene regije se nalaze u srednjem rasponu vrijednosti između ta dva područja.

Rezultati računatih agregacijskih indeksa nametnika roda *Anisakis* (omjer varijance i srednje abundancije nametnika, eksponent k negativne binomne razdiobe i indeks nepodudarnosti D) su potvrdili tipičnu distribuciju broja nametnika u nekoj populaciji domaćina. Takvu distribuciju predstavlja lijevo pomaknuta krivulja agregacije nametnika u domaćinu. Sukladno tome najveći broja domaćina je bio parazitiran malim brojem nametnika, dok je mali broj domaćina nosio najveći udio nametnika od ukupne brojnosti.

Ispitivanjem povezanosti abundancije nametnika *Anisakis* spp. s biološkim osobinama domaćina utvrđena je slaba, ali statistički značajna pozitivna korelacija s dobi obje vrste dupina ($R= 0,37 - 0,42$, $p<0,05$). Budući da Spearmanov koeficijent korelacije ima relativno nisku vrijednost može se pretpostaviti da na povezanost ove dvije varijable utječu i drugi zasada nepoznati čimbenici. Iz podataka o abundanciji nametnika je vidljivo da su najveći broj nametnika imali dupini 3. starosne grupe obje vrste (15 do 22 godine), dok se u najstarijih dupina (23 do 30) taj broj smanjuje. Promatranjem prevalencije nametnika uočava se isti uzorak, pri čemu najviše vrijednosti prevalencije nametnika *Anisakis* spp. imaju dobri i plavobijeli dupini 3. starosne dobi (dobri dupini 15 do 21 godinu, plavobijeli dupini 16 do 22 godine). Hudson i Dobson (1995) odnos starosti domaćina s prevalencijom i intenzitetom

nametnika kategoriziraju u tri tipa. U odnosu tipa 1 (nema vertikalnog prijenosa ni razmnožavanja nametnika u domaćinu) nametnici se nakupljaju iz okoliša kroz vrijeme, te se srednji intenzitet povećava s dobi domaćina. Tip 2 podrazumijeva stalan omjer mortaliteta nametnika i njihovog nakupljanja, tako da prosječan broj nametnika po domaćinu se povećava do asimptotske vrijednosti koja predstavlja ravnotežu novo unešenih i uginulih nametnika. Interakciju domaćina i nametnika tipa 3 prikazuje konveksna krivulja, u kojoj broj nametnika ne dostiže asimptotsku vrijednost, nego pada nakon inicijalnog povećanja. Prema opisanoj prevalenciji i abundanciji nametnika koje rastu do određene dobi domaćina, a zatim padaju, odnos dupina i oblića roda *Anisakis* se podudara s konveksnom krivuljom tipa 3. Wilson i suradnici (2002) navode više mehanizama koji mogu utjecati na ovakav odnos domaćina i nametnika: smrtnost domaćina uzrokovana nametnikom, stjecanje imuniteta domaćina, promjene u predispoziciji na zarazu povezane sa starošću, promjene u izloženosti domaćina nametniku vezane za starost domaćina i vjerojatnost točnog utvrđivanja zaraženosti koja je vezana s dobi domaćina. Konveksna krivulja odnosa starosti dupina s prevalencijom i intenzitetom *Anisakis* spp. može biti povezana s dva opisana mehanizma. Moguće je da se porastom dobi domaćina mijenja vrsta plijena ili područje na kojem se hrani, što bi sa starošću moglo povećavati ili snižavati izloženost nametniku. Drugi mehanizam koji može utjecati na pojavu konveksne krivulje u ovom istraživanju je pogreška u procjeni stvarne prevalencije i abundancije zadnje starosne grupe domaćina zbog male veličine uzorka.

Dužina dobrih dupina je pokazala slabu pozitivnu korelaciju ($R=0,35 - 0,37, p<0,05$) s abundancijom odraslih i L_4 oblića, no ne i s brojem ličinki L_3 ($R= 0,27, p= 0,06$). Budući da su dužina i starost dupina povezane, ova korelacija je očekivana. Razlog ne postojanja korelacije s brojem ličinki može biti puno kraći vremenski rok u kojem je obličje moguće naći u stadiju ličinke prije prelaska u idući stadij (4 do 7 dana u laboratorijskim uvjetima) i veća mogućnost pogreške u određivanju njihove prisutnosti i ukupnog broja zbog male veličine, posebno u slučaju želuca dupina koji je pun sadržaja. Dužina plavobijelih dupina nije pokazala značajnu korelaciju s abundancijom nametnika vjerojatno zbog korištenja manjeg uzorka ($N=18$) od onog koji je upotrebljen ($N=20$) za određivanje korelacije starosti i broja nametnika (za dvije jedinice nisu postojali podaci dužine). Zbog isključivanja iz analize te dvije jedinice koje su bile vrlo mlade (starost 5 i 3 godine), raspon dužina je bio nizak (L srednje= 203,39 +/- 7,53 cm) obuhvaćajući većinom odrasle jedinice.

Spearmanov koeficijent korelacije mase plavobijelih dupina i abundancije nametnika je ukazao na srednju jačinu veze ($R= -0,54$ do $-0,59, p<0,05$) te dvije varijable, pri čemu je

odnos mase i broja nametnika obrnuto proporcionalan. Takav rezultat može upućivati na nakupljanje većeg broja nametnika kao posljedicu lošijeg zdravstvenog stanja domaćina. Jedina veza između debljine masnog tkiva i broja nametnika je utvrđena u dobrim dupina, pri čemu je koeficijent korelacije debljine masnog tkiva na truhu i broja ličinki bio negativan i vrlo nizak ($R = -0,33$, $p < 0,05$). Struntz i sur. (2004) su utvrdili da se debljina potkožnog masnog tkiva (*blubber*) u dobrim dupina mijenja kroz ontogenetski razvoj, između jedinki različitog reproduktivnog statusa i stanja uhranjenosti, ali i geografskog područja u kojem borave. Iz toga proizlazi da je uzorak dobrim dupina za koje je računata ova korelacija vrlo raznolik s obzirom na čimbenike koji utječu na debljinu masnog tkiva, zbog čega nije moguće objasniti ovu vrlo slabu vezu s brojem ličinki nametnika.

Poulin (1996) je brojnim istraživanjima utvrdio da općenito mužjaci sisavaca imaju značajno veće vrijednosti prevalencija i intenziteta nametnika od ženki. Analizirajući ovu vezu posebno po koljenima nametnika, u oblića je utvrdio visoku statističku značajnost veće prevalencije i intenziteta u mužjaka sisavaca kao domaćina. Usporedbom prevalencije nametnika roda *Anisakis* prema spolu domaćina, u ovom istraživanju je uočena veća prevalencija u mužjaka dupina, no ona nije bila statistički značajna ($p = 0,0887$).

4.2. Genetska struktura oblića *Anisakis* spp. izoliranih iz kitova zubana (Odontoceti) Jadranskog mora

Ukupna vrijednost nukleotidne raznolikosti fragmenta mitohondrijske DNK (*cox2*) vrste *Anisakis pegreffii* u Jadranskom moru ($\pi = 0,004520 \pm 0,002706$) je nešto niža od vrijednosti do sada istraženih sekvenci iste vrste u Sredozemlju ($\pi = 0,009 \pm 0,005$) koju navodi Mattiucci (2009). Utvrđena nukleotidna raznolikost populacija *A. pegreffii* subantarktičkog područja ($\pi = 0,020 \pm 0,006$) je općenito viša od one u sredozemnih populacija, pa tako i od populacija *A. pegreffii* Jadranskog mora. Vrijednosti nukleotidne raznolikosti se razlikuju između populacija *A. pegreffii* u Jadranskom moru odvojenih prema vrsti domaćina. Vrijednost bližu prosjeka populacija Sredozemnog mora je imala populacija nametnika iz dobrim dupina ($\pi = 0,006226 \pm 0,003556$), dok je vrijednost populacije iz plavobijelih dupina ($0,004256 \pm 0,002625$) bila niža od prosjeka zabilježenih u Sredozemnom moru. Populacija *A. pegreffii* iz glavatih dupina je pokazala znatno nižu nukleotidnu raznolikost ($0,000535 \pm 0,000643$) od one zabilježene u Sredozemnom moru. Budući da je vrijednost nukleotidne raznolikosti koju navodi Mattiucci (2009) prosjek na

osnovi svih do sada istraženih sekvenci u Sredozemnom moru, vjerodostojnije bi bilo usporediti pojedinačne vrijednosti populacija na navedenom području iz istih vrsta krajnjih domaćina, ukoliko takvi podaci postoje. Logično je za pretpostaviti da nukleotidna raznolikost nametnika ima veze sa širinom niše koju domaćin koristi, odnosno s (ne) postojanjem prepreka slobodnom protoku gena, pogotovo u slučaju generalističkog roda *Anisakis* čije vrste preferiraju različite paratenične i krajnje domaćine.

Ukupna vrijednost haplotipske raznolikosti sekvenci mtDNK kitova zubana uginulih u Jadranskom moru ($h=0,6360 \pm 0,0471$) se podudara s prosječnom vrijednosti (0,67) za Sredozemno more koju navodi Mattiucci (2009). Vrijednosti raznolikosti haplotipova po populacijama izdvojenim iz različitih domaćina u Jadranu se razlikuju, pri čemu populacija oblića iz dobrih dupina ima višu vrijednost ($0,7467 \pm 0,0547$) od prosjeka istih u Sredozemnom moru i bližu prosjeku utvrđenom u subantarktičkim područjima (0,80). Haplotipska raznolikost populacija iz plavobijelih dupina ($0,6622 \pm 0,0864$) odgovara prosjeku utvrđenom na području Sredozemnog mora, a najnižu vrijednost slično nukleotidnoj raznolikosti ima populacija *A. pegreffii* iz glavatih dupina ($0,2900 \pm 0,1095$). U skladu s rasporedom vrijednosti genetske raznolikosti populacija je i broj utvrđenih jedinstvenih haplotipova, koji je najveći (72 %) u populaciji *A. pegreffii* iz dobrih, a niži (28 %) u plavobijelih dupina. Mali broj općenito utvrđenih zajedničkih (3) i ne postojanje jedinstvenih haplotipova unutar populacije oblića glavatih dupina može upućivati na moguću povezanost s malim brojem vrsta kojim se ovi kitovi hrane, ali može biti i posljedica manjeg uzorka istraženih jedinki nametnika.

Općenito visoka raznolikost haplotipova i niska nukleotidna raznolikost koje su utvrđene ovim istraživanjem za vrstu *A. pegreffii* u Jadranskom moru ukazuju da su razlike između haplotipova male jer ih u najvećem broju čini razlika samo jednog nukleotida. To potvrđuje i rekonstruirana filogenetska mreža haplotipova iz koje je vidljivo da je najčešći broj mutacija po nukleotidnom mjestu, mutacija jednog nukleotida, pri čemu je najveći broj mutacija po mjestu nizak i iznosi 3. Kombinacija visoke haplotipske i niske nukleotidne raznolikosti može upućivati na naglu demografsku ekspanziju koju je prošla početna mala populacija ove vrste kroz svoju demografsku povijest.

Prema alozimskoj analizi Mattiucci i Nascetti (2008) većina genetske raznolikosti određene vrste *Anisakis* spp. se nalazi unutar samih populacija, a ne između njih. To potvrđuju i rezultati testova genetske diferencijacije populacija *A. pegreffii* (AMOVA, F_{ST} i egzaktni test diferencijacije haplotipova između populacija) obuhvaćenih ovim istraživanjem,

na osnovi regije za citokrom oksidazu 2 mtDNK. Ne postojanje genetske strukture između populacija nametnika odvojenih prema vrsti domaćina ukazuje na panmiksiju vrste *A. pegreffii* u Jadranskom moru, odnosno da su sve četiri populacije poduzorci jedne te iste populacije te vrste. Razlog genetske nestrukturiranosti populacija i iz vrlo udaljenih područja je vrlo visok protok gena između populacija koji omogućuju njihovi široko rasprostranjeni paratenični i više ili manje migratorni krajnji domaćini.

Utvrđeni sastav nukleotida sekvenci mtDNK obuhvaćenih ovim istraživanjem je pokazao najmanju relativnu zastupljenost citozina (11,94 %), i najveću timina (45,10 %). Takva zastupljenost nukleotida i uočena prednost baza A i T (65,47 %) su u skladu s tipičnom zastupljenošću nukleotida u oblića, koju opisuju Kim i sur. (2006) nakon sekvencioniranja čitave mitohondrijske DNK nametnika *A. simplex*.

Analiza demografske povijesti populacija *A. pegreffii* u Jadranskom moru pomoću četiri testa je dala na prvi pogled oprečne rezultate. Tajima *D*, Fu-ov *F_s* test (Tablica 18.) i Harpendingov indeks (test usklađenosti, Tablica 19.) su ukazali na nedavni rast populacija *A. pegreffii* iz dobrih i plavobijelih dupina, dok bimodalna krivulja i statistički značajna suma kvadrata devijacija (*SSD*) su prikazale slabu usklađenost podataka s modelom nagle ekspanzije populacija. Za populaciju oblića iz glavatih dupina Tajima *D* i Fu-ov *F_s* su bili negativni, no preniski da bi statistički značajno upućivali na rast populacije. Nasuprot tome, test usklađenosti (*goodness of fit*) i neusklađene distribucije populacije *A. pegreffii* iz glavatih dupina su potvrdili naglu ekspanziju populacije vrijednostima *HRI* i *SSD* koje nisu bile statistički značajne da bi se pretpostavljeni model odbacio. Objašnjenje ovakvih rezultata se može naći u rezultatima komparativnih istraživanja statističke snage spomenutih testova demografske povijesti (Fu, 1997; Ramos-Onsins i Rozas, 2002). Prema tom istraživanju Fu-ov *F_s* test je naj snažniji i najpouzdaniji u otkrivanju selektivne neutralnosti mutacija i rasta populacija, a iza njega slijedi Tajima *D*. Testovi usklađenosti (*goodness of fit*) i neusklađene distribucije (*mismatch distribution*) imaju slabiju statističku moć i mogu pokazati drugačiji rezultat za iste podatke od prethodna dva testa iz više razloga. Jedan razlog je model postepene (stupnjevite) ekspanzije kojeg test pretpostavlja, a koji može biti neodgovarajući za neke populacije (populacije mogu rasti i eksponencijalno) što rezultira pristranom i nepotpunom procjenom demografske povijesti. Drugi razlog je potreba analize neusklađene distribucije za parom gena (razlika sekvenci) koji su neovisni i slučajno odabrani iz populacije, što ne mora biti slučaj u populaciji nastaloj nedavnom i naglom ekspanzijom koja može nasljeđem dijeliti veći dio gena, odnosno razlika u sekvencama.

Iz svega navedenog proizlazi da su populacije *A. pegreffii* iz dobrih i plavobijelih dupina u svojoj demografskoj povijesti prošle naglu ekspanziju, ali vjerojatno po drugačijem modelu od stupnjevite ekspanzije kojeg pretpostavlja neusklađena distribucija (*mismatch distribution*). Tome u prilog ide i statistički značajna vrijednost sume kvadrata devijacija koja prikazuje slabu usklađenost promatrane s očekivanom distribucijom. Male razlike oblika distribucije isto tako utječu na vrijednosti procjenjenih parametara (τ , θ_0 , θ_1) neusklađene distribucije (Schneider i Excoffier, 1999), što može biti jedan od razloga nultog vremena ekspanzije (τ) unatoč utvrđenim razlikama inicijalnih populacija (parametar θ_0) i populacija nakon ekspanzije (parametar θ_1). Još jedan mogući razlog je veća točnost procjene parametara starijih (vremenski udaljenijih) ekspanzija od procjene parametara za populacije koje su nedavno narasle.

Mala veličina uzorka (N=25) iz glavatih dupina je mogući razlog nedovoljno velike negativne vrijednosti Fu-ovog *F_s* testa, koja bi bila statistički značajna. Osjetljivost Fu-ovog *F_s* testa na veličinu uzorka navode Ramos-Onsins i Rozas (2002), objašnjavajući da je test pouzdaniji na većim uzorcima. U svom istraživanju Pilkington (2008) potvrđuje ovakvu pojavu, smanjenjem originalnog uzorka na 20, pri čemu je *F_s* vrijednost postala „manje“ negativna od vrijednosti koju je dobila za čitav uzorak. Vrijednosti testa usklađenosti, unimodalna krivulja i parametri neusklađene distribucije populacije *A. pegreffii* glavatih dupina su ukazale na nagli rast populacije, pa se može pretpostaviti da bi na osnovi većeg uzorka, vrijednosti Tajima *D* i Fu-ova *F_s* bile također negativne. Rezultati filogenetske analize odnosa haplotipova vrste *A. pegreffii* potvrđuju povijesnu demografsku ekspanziju populacija zbog karakterističnog oblika mreže čvorova (haplotipova) koji se nalaze radijalno oko najbrojnijeg osnivačkog haplotipa.

Različito vrijeme ekspanzije populacija 1 i 2 od populacije 3 se može tumačiti kao različiti povijesni period u kojem se odvio nagli rast populacija, no to se ne može reći sa sigurnošću bez procjene točnijeg vremena ekspanzije prvih dviju populacija korištenjem nekog prikladnijeg testa ili analize fosiliziranih ostataka nametnika. Budući da demografska povijest *A. pegreffii* u Sredozemnom moru još nije istražena za sada se ovi rezultati ne mogu usporediti s populacijama na bližem području. Objašnjenje nedavne demografske ekspanzije populacija *A. pegreffii* se podudara sa široko uočenim uzorkom ekspanzije populacija organizama različitih taksonomskih skupina nakon posljednjeg glacijalnog razdoblja, koje je završilo prije oko 12 500 godina.

Neutralnu selekciju molekularnih mutacija i konstantnu veličinu populacija *A. pegreffii* je dosada ispitala Baldwin (2010) na području zapadne obale Sjeverne Amerike, koristeći Tajima *D* test u istraživanju oblića roda *Anisakis* iz pacifičkih sardina. Vrijednost Tajima *D* u navedenom istraživanju je bila negativna, sugerirajući nagli rast populacija kroz demografsku povijest, no rezultat nije bio statistički značajan da bi se mogao odbaciti model neutralne evolucije i stalne veličine populacija vrste *A. pegreffii* na području pacifičke obale sjeverne Amerike. Uzorak koji je koristila Baldwin (2010) je bio dovoljno velik ($n=76$) da pokaže pouzdane rezultate testa, no budući da nije korišten nijedan drugi test u ispitivanju demografske povijesti ostaje nejasno da li postoji stvarna razlika s rezultatima istraživanja u Jadranu.

Poznato je da se populacijska genetika nametnika, odnosno genetske varijacije unutar vrste mogu koristiti kao biološki indikatori. Iz toga proizlazi da bi se do odgovora na neka pitanja ekologije i kretanja kitova moglo doći usporedbom podataka ovog istraživanja s takvim podacima za vrstu *A. pegreffii* iz drugih mora koja su u dodiru s Jadranskim. Do danas takvi podaci ne postoje za područje Sredozemnog mora, što ukazuje da je općenito takav pristup istraživanja zanemaren, a u budućim istraživanjima ga preporučuje i Mattiucci (2005), no za potrebe identifikacije ribljih stokova.

Analizirane sekvence mtDNK vrste *A. pegreffii* iz krupnozubih dupina nisu pokazale nikakvu genetsku raznolikost vjerojatno zbog malog broja jedinki nametnika ($N=6$) koje su prikupljene iz istog domaćina. Budući da su istom domaćinu utvrđene dvije jedinke nametnika *A. physeteris*, koji nije zabilježen u nijednom drugom domaćinu iz Jadranskog mora, može se pretpostaviti da ova vrsta nametnika potječe iz Sredozemnog mora s područja Tirenskog mora gdje su ga ranije otkrili Mattiucci i sur. (2008) istraživanjem šaruna (*T. trachurus*), također u mješanoj infekciji s vrstom *A. pegreffii*. To upućuje da je domaćin ove jedinke „donio“ u Jadransko more putem svoje migracije. Promatrajući životni stadij svih jedinki nametnika u ovom kitu utvrđeno je da su jedinke *A. physeteris* ($N=2$) i jedna jedinka *A. pegreffii* bili odraslog stadija, dok su ostalih 5 jedinki *A. pegreffii* bile ličinke 4. stadija. Podjednak životni stadij svih jedinki nametnika u jednom domaćinu ukazuje da ih je domaćin unio tijekom istog hranjenja ili u vrlo kratkom vremenskom razmaku. No kako nametnik može boraviti u domaćinu od 2 do 3 mjeseca analizirane jedinke *A. pegreffii* mogu potjecati iz Sredozemnog mora, ali isto tako i iz Jadrana ukoliko se ova jedinka kita hranila u Jadranskom moru i boravila ovdje određeno vrijeme prije uginuća. Budući da se radi o relativno velikoj vrsti kita zubana koja se u Jadranu rijetko viđa, te da za ovu jedinku ne postoje informacije o

kretanju u Jadranu prije uginuća, i da je lešina nađena dosta južno (Soline, otok Mljet) vjerojatnije je da svi nametnici iz ovog kita potječu izvan Jadranskog mora. Nadalje, sekvence *A. pegreffii* iz krupnozubog dupina pripadaju prvom haplotipu koji se po filogenetskim rezultatima smatra osnivačkim i najstarijim haplotipom i koji je također utvrđen na području Sredozemnog mora, što dodatno upućuje da su nametnici nađeni u krupnozubom kitu došli s njim, vjerojatno iz Tirenskog mora. Kretanje ove jedinice krupnozubog dupina mogu potvrditi i rezultati istraživanja vrsta plijena koje su pronađene u njegovom želucu. Spomenutim istraživanjem su Kovačić i sur. (2010) utvrdili 7 vrsta glavonožaca, među kojima dvije vrste dubokomorskih glavonožaca (*Octopoteuthis sicula* i *Galiteuthis armata*) koje do sada nisu utvrđene u Jadranskom moru, već samo na području Sredozemnog mora.

Nalaz vrste *Anisakis simplex s.s.* u Jadranskom moru se može smatrati očekivanim iz više razloga. Prvi razlog je visoka mobilnost kitova (krajnjih domaćina) koji bez problema prelaze udaljenosti od 1 000 i više kilometara, a drugi je također visoka mobilnost parateničnih domaćina. Wells i Scott (2002) navode da je u populacija dobrih dupina koji se više zadržavaju na pučini (više migratorne populacije) zabilježeno dnevno kretanje od 33 do 89 km tijekom ukupnog putovanja od 4 200 km. Isto tako autori opisuju i duža putovanja dobrih dupina koji većinu vremena provode u područjima bliže obali (manje migratorne populacije), pri čemu populacije uz obale Argentine rade 600 km dugo kružno putovanje kao odgovor na promjene u okolišu uzrokovane El Nino-om. Općenito se područje Gibraltara smatra granicom rasprostranjenja nametnika vrste *A. simplex s.s.* iz Atlantika prema Sredozemnom moru, no prisutnost ove vrste je također zabilježena u više analiziranih pelagičnih riba (plavoperajna tuna, *T. thynnus*; skuša, *S. scombrus* i šarun, *T. trachurus*) iz Alboranskog mora (Mattiucci i Nascetti 2008). Vrsta *A. simplex s.s.* se na tom području najčešće nalazi u mješanoj infekciji s vrstom *A. pegreffii*, a Mattiucci i sur. (2008) su takvu mješanu infekciju utvrdili u čak 61,5 % zaraženih šaruna (*T. trachurus*) iz Alboranskog mora. Autori takav rezultat objašnjavaju visokom mobilnošću male pelagične ribe, šaruna, iz Atlantika u Sredozemno more. Budući da je vrsta *A. simplex s.s.* do sada u parateničnim domaćinima zabilježena jedino na krajnjem zapadu Sredozemnog mora, vjerojatno postoje čimbenici koji sprečavaju njeno širenje na čitavo područje Sredozemnog mora. U skladu s time nalaz te vrste u malom postotku (1,96 %) u kitovima koji su uginuli u Jadranskom moru ne mora značiti da *A. simplex s.s.* u Jadranu uspješno završava svoj životni ciklus, sve dok se ne utvrdi njegova prisutnost opsežnijim uzorkovanjem intermedijarnih i parateničnih domaćina iz Jadranskog mora. Kako se dobri dupini smatraju rezidentnom vrstom u Jadranu

prva pretpostavka bi bila da druge vrste kitova koje povremeno dolaze u velikom broju (poput plavobijelih dupina) iz Sredozemnog mora „donose“ ovu vrstu nametnika. No uzimajući u obzir ekologiju dobrih dupina, i genetsko istraživanje njihovih populacija u Jadranu kojim je Galov (2007) ukazala na dobar protok gena između populacija dobrih dupina u Jadranu i Sredozemnom moru, ta prva pretpostavka nije točna. Rezultati ovog istraživanja prema tome mogu također ukazivati na kretanja dobrih dupina između Jadranskog i Sredozemnog mora jer su nametnici *A. simplex* s.s. utvrđeni u dva dobra dupina i jednom plavobijelom dupinu. Hipotezu o „dolasku“ *A. simplex* s.s. u Jadran pomoću krajnjih domaćina koji su bili u Sredozemnom moru podupire i ekologija dobrih dupina, jer su obje jedinke bili odrasli mužjaci (starosti 19 i 22 godine) za koje se zna da u toj dobi često žive solitarno i prelaze veće udaljenosti. Nedavnim istraživanjem roda *Anisakis* iz nekoliko vrsta riba, Vardić Smrzlić i sur. (2012) su također identificirali vrstu *A. simplex* s.s. u mješanoj infekciji s vrstom *A. pegreffii* iz uzoraka dva šaruna (*T. trachurus*) Jadranskog mora. Takav nalaz može ukazivati na stalnu prisutnost ove vrste nametnika u Jadranu, no kako je riba korištena za uzorkovanje u tom istraživanju kupljena na tržnici pri čemu točna lokacija ulova unutar Jadrana nije poznata, potrebna je sigurnija procjena. Neobjavljeno istraživanje Poljaka i sur. (u pripremi), prema kojem je vrsta *A. simplex* utvrđena u malom postotku barem dvije vrste riba uzorkovanih na poznatim lokacijama u Jadranskom moru, bi moglo dati barem dio odgovora o stvarnoj rasprostranjenosti ove vrste nametnika.

Mattiucci i Nascetti (2008) navode da su nametnici roda *Anisakis* dobri indikatori stabilnosti hranidbene mreže i poremećaja staništa morskih ekosustava. Putevi prijenosa oblića ovog roda su usko povezani s hranidbenom mrežom njihovih domaćina, te su na taj način oblići „ugrađeni“ u samu hranidbenu mrežu. Kao posljedica takve veze, nametnicima ovog roda je potrebna stabilna hranidbena mreža za uspješan završetak životnog ciklusa. Poremećajima u ekosustavu poput zagađenja, smanjenja broja krajnjih domaćina i prelova parateničnih domaćina, veličina populacija ovih nametnika se može smanjiti. Smanjenje broja nametnika može rezultirati većom vjerojatnošću genetskog drifta i posljedično smanjenjem genetske raznolikosti. Više vrijednosti prevalencije, intenziteta i genetske raznolikosti roda *Anisakis* u antarktičkom i subantarktičkom području od drugih geografskih regija, autori tumače kao mogući pokazatelj manjeg poremećaja staništa tog područja, što rezultira stabilnijim hranidbenim mrežama i zdravijim ekosustavom. Vrijednosti prevalencije i intenziteta ovih nametnika u Jadranu su puno veće od vrijednosti zabilježenih u Sredozemnom moru, te bi se na osnovi toga moglo reći da su staništa u Jadranskom moru

manje poremećena od Sredozemnog mora. No genetska raznolikost nametnika ovog područja nema višu vrijednost što može upućivati da je već došlo do poremećaja u stabilnosti ekosustava i smanjenja veličina populacija nametnika koje su možda u prošlosti imale više vrijednosti. Istraživanjem uzoraka vrste *A. pegreffii* koji su prikupljeni u dužem vremenskom razdoblju (24 godine) na području Sredozemnog mora je već primjećen gubitak raznolikosti (genetska erozija) na određenim alozimskim lokusima, za razliku od rezultata istog istraživanja za južni Pacifik i australske populacije koje su održale jednak stupanj genetske raznolikosti (Mattiucci i Nascetti, 2008). Iz svega navedenog se može zaključiti da bi se sustavnim praćenjem genetske raznolikosti i populacijske dinamike vrste *A. pegreffii* u Jadranskom moru mogle dobiti vrijedne informacije o stabilnosti hranidbenih mreža i narušavanju „zdravlja“ ekosustava Jadranskog mora.

5. ZAKLJUČCI

1. Prevalencija oblića roda *Anisakis* u uginulim kitovima zubanima (N=181) pronađenim u hrvatskom dijelu Jadranskog mora od listopada 1990. godine do travnja 2012. godine, iznosila je 28,73 % (95 % interval pouzdanosti od 22,5 % do 35,9 %), a prevalencija nametnika računata bez mladih kitova (N=163) starosti do godinu dana iznosila je 31,90 % (95 % interval pouzdanosti 25,1 % do 39,5 %).

2. Srednja abundancija oblića u 163 domaćina iznosila je 1 209,96 (95 % interval pouzdanosti 510,4 – 2 764,9), dok je srednji intenzitet oblića iznosio 3 781,13 (95 % interval pouzdanosti 1 778,9 – 7 128,4).

3. Omjer varijance i srednje abundancije oblića iz 163 domaćina je iznosio 14 228,12 s indeksom nepodudarnosti (*discrepancy*) $D= 0,911$. Eksponent negativne binomne razdiobe k iznosio je 0,048, te se na temelju utvrđenih rezultata podaci istraživanja podudaraju s teoretskim modelom negativne binomne razdiobe. Vrijednosti navedenih agregacijskih indeksa nametnika roda *Anisakis* opisuju tipičnu distribuciju nametnika koju predstavlja lijevo pomaknuta krivulja agregacije nametnika u domaćinu, zbog malog broja domaćina koji je parazitiran s velikim brojem nametnika.

4. Srednji intenzitet nametnika roda *Anisakis* po domaćinu (3 781) u Jadranskom moru je viši od tipičnih vrijednosti Sredozemnog mora i subarktičke regije (< 100).

5. Prevalencija nametnika je statistički značajno različita u dobrim dupina (26,92 %) od prevalencije nametnika plavobijelih dupina (52 %). U glavatih (N=6) i krupnozubih dupina (N=2) prevalencija nametnika je iznosila 50 %.

6. Prevalencija nametnika roda *Anisakis* u dobrim (26,92 %) i plavobijelim dupinima (52 %) pronađenim u Jadranskom moru je viša od prevalencija utvrđenih (10 % i 2 %) za te vrste u Sredozemnom moru.

7. Mlade jedinice dobrih i plavobijelih dupina (0 do 7 i 0 do 5 godina) imaju značajno manju prevalenciju nametnika roda *Anisakis* od odraslih jedinki (15 do 21 i 16 do 22 godine).

8. Utvrđena statistički značajna razlika između prevalencije lešina kitova zubana koje su bile svježije (F) i srednjeg stupnja raspadanja (MD, 51,35 %) od prevalencije lešina s uznapredovalim stupnjem raspadanja (AD, 15,73 %) ukazuje na veću pouzdanost ispitivanja populacijske dinamike nametnika iz svježih i srednje starih lešina.

9. Postotak zaraženih plavobijelih dupina s erozijama želuca (92,31 %) je statistički značajno različit ($p=0,04$, 95 % interval pouzdanosti 1,18 % do 48,42 %) i veći od postotka zaraženih dobrih dupina kojima su uz oblike utvrđene i erozije želuca (61,76 %).

10. Nema značajne razlike između prevalencija nametnika roda *Anisakis* s obzirom na spol krajnjih domaćina.

11. Najmanji utvrđen broj nametnika roda *Anisakis* u krajnjim domaćinima Jadranskog mora iznosio je 1, a najveći broj je iznosio 24 032.

12. Slaba korelacija postoji između starosti dobrih i plavobijelih dupina i abundancije nametnika ($R=0,37 - 0,42$, $p<0,05$), dužine dobrih dupina i abundancije odraslih i L_4 stadija nametnika ($R=0,35 - 0,37$; $p<0,05$), a debljina masnog tkiva na trbuhu dobrih dupina je u obrnutom odnosu s abundancijom ličinki L_3 ($R=-0,33$; $p<0,05$). Masa tijela plavobijelih dupina negativno korelira s abundancijom oblića roda *Anisakis* ($R=-0,54$ do $-0,59$; $p<0,05$).

13. U probavnom sustavu četiri vrste kitova zubana (dobri dupin, *Tursiops truncatus*; plavobijeli dupin, *Stenella coeruleoalba*; glavati dupin, *Grampus griseus* i krupnozubi dupin, *Ziphius cavirostris*) u Jadranskom moru, molekularnom identifikacijom su utvrđene tri vrste nametnika roda *Anisakis*: *Anisakis pegreffii* sa najvećom zastupljenošću (96,73 %), zatim *A.simplex* (1,96 %) i *A.physeteris* s najmanjom zastupljenošću (1,31 %).

14. Visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0,6360 +/- 0,0471 i niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0,004520 +/- 0,002706 ukazuje na nedavnu naglu ekspanziju populacija *A. pegreffii*, koja se podudara sa široko uočenim uzorkom ekspanzije populacija organizama različitih taksonomskih skupina nakon posljednjeg glacijalnog razdoblja, završenog prije oko 12 500 godina.

15. Analizom 148 sekvenci vrste *A. pegreffii*, na lokusu citokrom oksidaze podjedinice 2, mitohondrijske DNK, dužine 561 bp, utvrđeno je 47 polimorfni mjesta i 38 haplotipova. Definiranih 38 haplotipova u najvećem postotku (66 %) su činili jedinstveni haplotipovi (25) zastupljeni s jednom jedinkom. Najveći postotak jedinstvenih haplotipova vrste *A. pegreffii* (72 %) nađen je u populaciji nametnika iz dobrih dupina (*T. truncatus*), a ostali jedinstveni haplotipovi (28 %) su se nalazili u populaciji nametnika iz plavobijelih dupina (*S. coeruleoalba*).

16. Razdvajanjem populacija *A. pegreffii* prema vrsti krajnjeg domaćina, nije utvrđena genetska strukturiranost populacija, te se genetske razlike nalaze unutar samih populacija.

17. Na osnovi rezultata testova demografske povijesti i rekonstrukcije filogenetskih odnosa haplotipova vrste *A. pegreffii* utvrđeno je da su populacije te vrste prošle naglu demografsku ekspanziju.

18. Sve populacije vrste *A. pegreffii* dijele najstariji i osnivački haplotip dok se najnoviji haplotip nalazi samo u populacijama nametnika iz dobrih i plavobijelih dupina.

6. LITERATURA

- Abollo E, Lopez A, Gestal C, Benavente P, Pascual S. 1998. Macroparasites in cetaceans stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 227-231.
- Applied Biosystems Inc., 2005. Sequence Scanner Software v1.0 (Copyright 2005 Applied Biosystems). <http://www.appliedbiosystems.com>
- Archer FI II. 2002. Striped Dolphin *Stenella coeruleoalba*. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 1201-1202.
- Audicana MT, Del Pozo MD, Iglesias R, Ubeira FM. 2003. *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. U: Learmonth R, Milliotis MD. (urd.), *International handbook of foodborne pathogens*, 1st ed. Marcel Dekker Inc., New York, str. 613-636.
- Audicana MT, Kennedy MW. 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 360–379.
- Aznar FJ, Balbuena JA, Fernandez M, Raga JA. 2001. Living together: the parasites of marine mammals. U: Evans PGE, Raga JA. (urd.), *Marine Mammals Biology and Conservation*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, str. 385-423.
- Bader JM. 1998. Measuring genetic variability in natural populations by allozyme electrophoresis. U: *Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, Karcher SJ. (urd.), Association for Biology Laboratory Education, Cleveland, str. 25-42.
- Baird RW. 2002. Risso's Dolphin *Grampus griseus*. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 1037-1039.
- Baldwin REB. 2010. Using parasite community data and population genetics for assessing pacific sardine (*Sardinops sagax*) population structure along the west coast of North America. Disertacija, Oregon State University, 207 str.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.

- Barnes LG. 2002. Cetacea, Overview. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 204-208.
- Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, Patel NH. 2007. Evolution. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 833 str.
- Bearzi G, Notarbartolo di Sciara G. 1995. A comparison of the present occurrence of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, and common dolphins, *Delphinus delphis*, in the Kvarnerić (northern Adriatic Sea). Annales, Series Historia Naturalis, 2: 61-68.
- Berland B. 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia, 2: 1-50.
- Berland B. 2006. Musings on nematode parasites (*Fisken oghavet*). Havforskningsinstituttet, Bergen, 26 str.
- Bliss CI, Fisher RA. 1953. Fitting negative binomial distribution to biological data. Biometrics, 9: 176-200.
- Brusina S. 1889. Sisavci Jadranskog mora. Preštampano iz XCV. knjige Rada Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti, Dionička tiskara, Zagreb, 98 str.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. Journal of Parasitology, 83: 575-583.
- Chou YY, Wang CS, Chen HG, Chen HY, Chen SN, Shih HH. 2011. Parasitism between *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larvae and the spotted mackerel *Scomber australasicus* with regard to the application of stock identification. Veterinary Parasitology, 177: 324-331.
- Cockcroft VG, Ross GJB. 1990. Age, growth and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the East coast of Southern Africa. Fishery Bulletin, 88: 289-302.
- Committee on Taxonomy. 2011. List of marine mammal species and subspecies. Society for Marine Mammalogy. www.marinemammalscience.org.
- Connor RC, Mann J, Tyack PL, Whitehead H. 1998. Social evolution in toothed whales. Trends in Ecology and Evolution, 13: 228-231.
- Ćurković S, Gomerčić T, Đuras Gomerčić M, Lucić H, Gomerčić H, Škrtić D, Vuković S. 2003. Procjena starosti dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora prema broju zona prirasta u zubnom dentinu i usporedba s duljinom tijela i tjelesnom masom životinje. U: Zbornik sažetaka Osmog hrvatskog biološkog kongresa, Eighth Croatian

- Biological Congress, Besendorfer V, Kopjar N. (urd.), Hrvatsko biološko društvo 1885, Zagreb, str. 272-273.
- Davey JT. 1971. A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridida). *Journal of Helminthology*, 45: 51-72.
- Đuras Gomerčić M. 2006. Rast, spolni dimorfizam i morfometrijske značajke dobrog dupina (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821) iz Jadranskoga mora. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 108 str.
- Đuras Gomerčić M, Galov A, Gomerčić T, Škrtić D, Ćurković S, Lucić H, Gomerčić H. 2008. Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) depredation resulting in larynx strangulation with gill-net parts. *Marine Mammal Science*, 25: 392-401.
- Đuras Gomerčić M, Gomerčić T, Galov A, Lucić H, Škrtić D, Ćurković S, Brzica H, Špiranec K, Alić I. 2012: Povećani broj uginulih plavobijelih dupina (*Stenella coeruleoalba*) tijekom 2012. godine u Jadranskome moru. U: Zbornik sažetaka Jedanaestog hrvatskog biološkog kongresa, 11. Hrvatski biološki kongres, Jelaska S, Klobučar G, Šerić Jelaska L, Leljak Levanić D, Lukša Ž. (urd.), Hrvatsko biološko društvo 1885, Zagreb, str. 203-204.
- Environmental Systems Research Institute, 1992-1999. ArcView GIS: Release 3.2. Redlands, California: Environmental Systems Research Institute.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Galov A. 2007. Genetička raznolikost populacije dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) s osvrtom na druge vrste kitova (Cetacea) Jadranskog mora. Disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 105 str.
- Gibson DI, Harris EA, Bray RA, Jepson PD, Kuiken T, Baker T, Simpson VR. 1998. A survey of the helminth parasites of cetaceans stranded on the coast of England and Wales during the period 1990-1994. *Journal of Zoology*, 244: 563-574.
- Gomerčić H, Đuras M, Lucić H, Gomerčić T, Huber Đ, Škrtić D, Ćurković S, Galov A, Vuković S. 2002. Cetacean mortality in Croatian part of the Adriatic Sea in period

- from 1990 till February 2002. U: Proceedings of 9th International Congress on the Zoogeography and Ecology of the Greece and adjacent regions, The Hellenic Zoological Society, Thessaloniki, str. 42.
- Gomerčić T, Đuras Gomerčić M, Gomerčić H, Škrtić D, Ćurković S, Lucić H, Galov A, Vuković S, Huber Đ. 2004. Vrste, brojnost i rasprostranjenost morskih sisavaca u hrvatskom dijelu Jadranskog mora. U: Zbornik radova Prvog hrvatsko-slovenskog simpozija o egzotičnim i divljim životinjama, Vlahović K, Marinculić A.(urd.). Hrvatsko veterinarsko društvo 1893, Zagreb, str.16.
- Gomerčić H, Huber Đ. 1989. Istraživanja i zaštita morskih sisavaca Jadrana. U: Plenarni referati i izvodi saopštenja Četvrte konferencije o zaštiti Jadrana, Grgić P. (urd.), Savjet Republičke konferencije SSRN BiH za zaštitu čovjekove okoline i Organizacioni odbor Četvrte konferencije o zaštiti Jadrana, Neum, str. 191.
- Gomerčić H, Huber Đ, Gomerčić T. 1994. Dupini Jadranskog mora: današnje stanje i prijedlog za njihovu zaštitu. Studija dostavljena Ministarstvu graditeljstva i zaštite okoliša Republike Hrvatske, Zagreb, 10 str.
- Gomerčić H, Huber Đ, Gomerčić A, Gomerčić T. 1998. Geographical and historical distribution of the cetaceans in Croatian part of the Adriatic Sea. U: 35th CIESM Congress Proceedings, Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la mer Méditerranée 35, str. 440-441.
- Grabda J. 1976. Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured in vitro. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 6: 119-139.
- Harpending HC. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. Human Biology, 66: 591–600.
- Heyning JE. 2002. Cuvier's Beaked Whale *Ziphius cavirostris*. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 305-307.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 2. izdanje, 497 str.
- Højgaard DP. 1998. Aspects of the life-cycle of whaleworm, *Anisakis simplex*, and its infection of saithe, *Pollachius virens* (L.). Disertacija, University of Copenhagen, 100 str.

- Hooker SK. 2002. Toothed Whales, Overview. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 1252-1255.
- Hotez P, Capello M, Hawdon J, Beckers C, Sakanari J. 1994. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *The Journal of Infectious Diseases*, 170: 918–926.
- Hudson PJ, Dobson AP. 1995. Macroparasites: observed patterns. U: Grenfell BT, Dobson AP. (urd.), Ecology of infectious diseases in natural populations. Cambridge University Press, Cambridge, str. 144-176.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Hwang UW, Kim W, Tautz D, Friedrich M. 1998. Molecular phylogenetics at the Felsenstein zone: approaching the Strepsiptera problem using 5.8S and 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 470-480.
- Jagar I. 2005. Spolno sazrijevanje ženki dobrog dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora. Studentski rad nagrađen nagradom Rektora Sveučilišta u Zagrebu. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 13 str.
- Jefferson TA, Leatherwood S, Webber MA. 1993. FAO species identification guide: Marine mammals of the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, str. 83-165.
- Kim KH, Eom KS, Park JK. 2006. The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *International Journal for Parasitology*, 36: 319-328.
- Kliks MM. 1986. Human anisakiasis: an update. *The Journal of the American Medical Association*, 255: 2605.
- Klimpel S, Palm HW, Rückert S, Piatkowski U. 2004. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology Research*, 94: 1-9.
- Kovačić I, Đuras Gomerčić M, Gomerčić H, Lucić H, Gomerčić T. 2010. Stomach contents of two Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) stranded in the Adriatic Sea. *Marine Biodiversity Records*, 3: 1-4.

- Køie M, Berland B, Burt MDB. 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudotetranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 134-139.
- Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S. 2011. Adaptive radiation within marine Anisakid nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. *PLoS ONE*, 6(12): e28642.
- Kuiken T, Hartmann MG. 1991. Standard protocol for the basic postmortem examination and tissue sampling of small cetaceans. U: Proceedings of the first ECS workshop on cetacean pathology: Dissection techniques and tissue sampling. ECS newsletter No. 17 (Special Issue), Leiden, str. 26–39.
- Larget B, Simon DL. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 750–759.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Mattiucci S. 2009. The ring trial for the detection of Anisakidae larvae in fish fillets. U: Fourth Workshop of National Reference Laboratories for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Rome, 49 str. http://www.iss.it/binary/crlp/cont/S._Mattiucci_.pdf
- Mattiucci S, Abaunza P, Farina V, Damiano S, Nascetti G. 2005. Parasites of the genus *Anisakis* as „biological tags“: their genetic identification for horse mackerel stock definition in a multidisciplinary approach. U: Proceedings of the ICES Annual Science Conference, International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, K:19, str. 1-17. <http://www.ices.dk/products/CMdocs/2005/CM2005.pdf>
- Mattiucci S, Farina V, Campbell N, MacKenzie K, Ramos P, Pinto AL, Abaunza P, Nascetti G. 2008. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research*, 89: 146–151.
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bratley J, Webb SC, D'Amelio S, Orecchia P, Bullini L. 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 83: 401-416.
- Mattiucci S, Nascetti G. 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite*, 13: 99–113.

- Mattiucci S, Nascetti G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, 66: 47–148.
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC. 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, 74: 199-217.
- McClelland G. 2005. Nematoda (roundworms). U: Rhode K. (urd.), *Marine parasitology*, CABI Publishing, Wallingford, str. 104-115.
- McDonald JH. 2009. *Handbook of Biological Statistics* (2. Izdanje). Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, 319 str.
- Mead JG. 1984. Survey of reproductive data for the beaked whales (Ziphiidae). *Reports of the International Whaling Commission, Special Issue*, 6: 95.
- Mladineo I. 2003. *Anisakis simplex* in Adriatic Sea. *Periodicum Biologorum*, 105: 389-392.
- Mladineo I. 2006. Parasites of Adriatic cage reared fish. *Acta Adriatica*, 47: 23-26.
- Mladineo I, Šimat V, Miletić J, Beck R, Poljak V. 2012. Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 224-229.
- Myers BJ. 1976. Research then and now on the Anisakidae nematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 95: 137-42.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L. 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *International Journal for Parasitology*, 16: 633-640.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 str.
- Notarbartolo Di Sciara G. 1993. I cetacei del Mediterraneo. XIX seminario sulla evoluzione biologica e i grandi problemi della biologia. *Accademia nazionale dei Lincei, Roma*, str. 39-52.
- Notarbartolo Di Sciara G, Demma M. 1994. *Guida dei mammiferi marini del Mediterraneo*. F. Muzzio, Padova, 262 str.

- Pascual S, Abollo E. 2005. Whaleworms as a tag to map zones of heavy-metal pollution. *Trends in Parasitology*, 21: 204-206.
- Perrin WF. 2009. World Cetacea Database. Izvor: <http://www.marinespecies.org/cetacea>.
- Petrić M, Mladineo I, Krstulović Šifner S. 2011. Insight into short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? *Journal of Parasitology*, 97: 55–62.
- Pilkington MM. 2008. An apportionment of African genetic diversity based on mitochondrial, Y chromosomal, and X chromosomal data. Disertacija, The University of Arizona, 231 str.
- Poldan I. 2004. Analiza čeljusti glavonožaca (Cephalopoda) iz želudaca dobrih dupina (*Tursiops truncatus*) iz Jadranskog mora. Studentski rad nagrađen Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 16 str.
- Polzin T, Daneschmand SV. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31:12-20.
- Poulin R. 1993. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. *International Journal for Parasitology*, 23: 937–944.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253-1256.
- Raga JA, Fernandez M, Balbuena JA, Aznar FJ. 2009. Parasites. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, str. 821-830.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092-2100.
- R Core Team. 2012. R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Raymond M, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280–1283.
- Reiczigel J. 2003. Confidence intervals for the binomial parameter: some new considerations. *Statistics in Medicine*, 22: 611-621.
- Reiczigel J, Rózsa L. 2005. *Quantitative Parasitology 3.0*. Budapest.
- Reiczigel J, Abonyi-Tóth Z, Singer J. 2008. An exact confidence set for two binomial proportions and exact unconditional confidence intervals for the difference and ratio of proportions. *Computational Statistics and Data Analysis*, 52: 5046-53.

- Reynolds JE III, Eide SD, Wells RS. 2000. The Bottlenose Dolphin: Biology and Conservation. University Press of Florida, Gainesville, 288 str.
- Rózsa L, Reiczigel J, Majoros G. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*, 86: 228-232.
- Rogers AR. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Schneider S, Excoffier L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise distances when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079–1089.
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6: 461-464.
- Simard M. 1997. Population dynamics of *Anisakis simplex* in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from the Gulf of St. Lawrence. Magistarski rad, McGill University, 186 str.
- Smith JW, Wootten R. 1978. *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in Parasitology*, 16: 93-163.
- StatSoft Inc. 2011. Statistica: A system for statistical data analysis, including a wide range of analytical procedures and methods. www.statsoft.com
- Strømnes E, Andersen K, 2000. Spring rise of whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea) third-stage larvae in some fish species from Norwegian waters. *Parasitology Research*, 86: 619–624.
- Struntz DJ, McLellan WA, Dillaman RM, Blum JE, Kucklick JR, Pabst DA. 2004. Blubber development in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Morphology*, 259: 7-20.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437–467.
- Tajima F. 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739.

- 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.
- Ugland KI, Strømnes E, Berland B, Aspholm PE. 2004. Growth, fecundity and sex ratio of adult whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in three whale species from the North-East Atlantic. *Parasitology Research*, 92: 484-189.
- Vachot AM, Monerot M. 1996. Extraction, amplification and sequencing of DNA from formaldehyde-fixed specimens. *Ancient Biomolecules*, 1: 3-16.
- Vardić Smrzlić I, Valić D, Kapetanović D, Kurtović B, Teskeredžić E. 2012. Molecular characterisation of Anisakidae larvae from fish in Adriatic Sea. *Parasitology Research*, 111: 2385-2391.
- Wells RS, Scott MD. 2002. Bottlenose dolphins: *Tursiops truncatus* and *T. aduncus*. U: Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM. (urd.), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, str. 122-128.
- Williams H, Jones A. 1994. Fish worms and man. U: Williams H, Jones A. (urd.), *Parasitic worms of fish* (1. izdanje). Taylor and Francis, London, str. 371-443.
- Wilson K, Bjørnstad ON, Dobson AP, Merler S, Poglayen G, Randolph SE, Read AF, Skorping A. 2002. Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. U: Hudson PJ, Rizzoli AP, Grenfell BT, Heesterbeek JAP, Dobson AP. (urd.), *The Ecology of Wildlife Diseases*. Oxford University Press, Oxford, str. 6-44.
- Žilić J, Mladineo I. 2006. Učestalost nalaza nametnika *Anisakis simplex* (Anisakidae, Nematoda) u plavoperajnoj tuni (*Thunnus thynnus*) iz kaveznog uzgoja. *Meso*, 8: 229-233.

Internet stranice:

- <http://arhiv.slobodnadalmacija.hr/20061209/spektar03.asp>
- <http://hawaiihumpbackwhale.noaa.gov/explore/striped.html>
- <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- http://www.espacotalassa.com/03_gb/16_species/docs/z_cavirostris.htm
- <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>
- <http://www.sanctuarycruises.com/dolphins.html>

7. PRILOZI

7.1. Prilog 1

Tablica 21. Popis 153 sekvence (fragment mitohondrijske DNK, lokus citokrom oksidaze podjedinice 2 (COII), dužine 561 bp) nametnika roda *Anisakis* izoliranih iz kitova zubana (dobri dupin, *T. truncatus*; plavobijeli dupin, *S. coeruleoalba*; glavati dupin, *G. griseus*, i krupnozubi dupin, *Z. cavirostris*) uginulih u Jadranskom moru u razdoblju od 1999. do 2011. godine, a koje su dodane u GenBank bazu podataka pod pristupnim brojevima od KC479891 do KC480043.

	Oznaka sekvence	Pristupni broj sekvence u GenBank bazi podataka	Vrsta krajnjeg domaćina	Vrsta roda <i>Anisakis</i>
1.	Tt23A	KC479892	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
2.	Tt23B	KC479893		
3.	Tt23C	KC479894		
4.	Tt23D	KC479895		
5.	Tt23E	KC479896		
6.	Tt38A	KC479897	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
7.	Tt38B	KC479898		
8.	Tt38C	KC479899		
9.	Tt38D	KC479900		
10.	Tt38E	KC479901		
11.	Gg68A	KC479902	<i>G. griseus</i>	<i>A. pegreffii</i>
12.	Gg68B	KC479903		
13.	Gg68C	KC479904		
14.	Gg68D	KC479905		
15.	Gg68E	KC479906		
16.	Gg69A	KC479907	<i>G. griseus</i>	<i>A. pegreffii</i>
17.	Gg69B	KC479908		
18.	Gg69C	KC479909		
19.	Gg69D	KC479910		
20.	Gg69E	KC479911		
21.	Gg69F	KC479912		
22.	Gg69G	KC479913		
23.	Gg69H	KC479914		
24.	Gg69I	KC479915		
25.	Gg69J	KC479916		
26.	Sc71B	KC479917	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
27.	Sc71C	KC479918		
28.	Sc71D	KC479919		
29.	Sc79B	KC479920	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
30.	Sc79C	KC479921		

31.	Sc79D	KC479922		
32.	Sc79E	KC479923		
33.	Sc79F	KC479924		
34.	Sc79G	KC479925		
35.	Sc79H	KC479926		
36.	Sc79I	KC479927		
37.	Sc79J	KC479928		
38.	Gg84A	KC479929	<i>G. griseus</i>	<i>A. pegreffii</i>
39.	Gg84B	KC479930		
40.	Gg84C	KC479931		
41.	Gg84D	KC479932		
42.	Gg84E	KC479933		
43.	Gg84F	KC479934		
44.	Gg84G	KC479935	<i>G. griseus</i>	<i>A. pegreffii</i>
45.	Gg84H	KC479936		<i>A. pegreffii</i>
46.	Gg84I	KC479937		
47.	Gg84J	KC479938		
48.	Sc115A	KC479939	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
49.	Sc115B	KC479940		
50.	Sc115C	KC479941		
51.	Sc115D	KC479942		
52.	Sc115E	KC479943		
53.	Sc115F	KC479944		
54.	Sc115G	KC479945		
55.	Sc115H	KC479946		
56.	Zc116A	KC479947	<i>Z. cavirostris</i>	<i>A. physeteris</i>
57.	Zc116B	KC479948		<i>A. physeteris</i>
58.	Zc116C	KC479949		<i>A. pegreffii</i>
59.	Zc116D	KC479950		
60.	Zc116E	KC479951		
61.	Zc116F	KC479952		
62.	Zc116G	KC479953		
63.	Zc116H	KC479954		
64.	Tt120A	KC479955	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
65.	Tt120B	KC479956		
66.	Tt136A	KC479957	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
67.	Tt136B	KC479958		
68.	Tt142A	KC479959	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
69.	Tt142B	KC479960		
70.	Tt143A	KC479961	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
71.	Sc146A	KC479962	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
72.	Sc146B	KC479963		
73.	Tt168A	KC479891	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
74.	Tt168B	KC480040		
75.	Tt168C	KC479964		
76.	Tt168D	KC479965		
77.	Tt177A	KC479966	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
78.	Tt177B	KC480041		<i>A. simplex</i>

79.	Tt177C	KC479967		<i>A. pegreffii</i>
80.	Tt203B	KC479968	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
81.	Tt203C	KC479969		
82.	Tt203D	KC479970		
83.	Tt203E	KC479971		
84.	Tt203F	KC479972		
85.	Tt203G	KC479973		
86.	Tt203H	KC479974		
87.	Tt203I	KC479975		
88.	Tt203J	KC479976		
89.	Tt203K	KC479977		
90.	Tt203L	KC479978	<i>A. pegreffii</i>	
91.	Tt211A	KC479979	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
92.	Tt211B	KC479980		
93.	Tt211C	KC479981		
94.	Tt211D	KC479982		
95.	Tt211E	KC479983		
96.	Tt211F	KC479984		
97.	Tt211G	KC479985		
98.	Tt211H	KC479986		
99.	Tt211J	KC479987		
100.	Tt212A	KC479988		
101.	Tt212B	KC479989		
102.	Tt212C	KC479990		
103.	Tt212D	KC479991		
104.	Tt228A	KC479997	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
105.	Tt228B	KC479998		
106.	Tt228C	KC479999		
107.	Tt228D	KC480000		
108.	Tt228E	KC480001		
109.	Tt228F	KC480002		
110.	Tt228G	KC480003		
111.	Tt228H	KC480004		
112.	Tt232A	KC480005	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
113.	Tt241A	KC480006	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
114.	Tt241B	KC480007		
115.	Tt241C	KC480008		
116.	Tt241D	KC479994		
117.	Tt241E	KC480009		
118.	Tt241F	KC480010		
119.	Tt241G	KC480043		
120.	Tt241H	KC480011		
121.	Tt241I	KC479995		
122.	Tt241J	KC479996		
123.	Sc244A	KC480012	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
124.	Sc244B	KC480013		
125.	Sc244C	KC480014		
126.	Sc244D	KC479993		

127.	Sc244E	KC480015		
128.	Sc246A	KC480016	<i>S. coeruleoalba</i>	<i>A. pegreffii</i>
129.	Sc246B	KC480017		
130.	Sc246C	KC480018		
131.	Sc246D	KC480019		
132.	Sc246E	KC480020		
133.	Sc246F	KC480021		
134.	Sc246G	KC479992		
135.	Sc246H	KC480022	<i>A. pegreffii</i>	
136.	Sc246I	KC480023		
137.	Sc246J	KC480024		
138.	Sc246K	KC480042	<i>A. simplex</i>	
139.	Sc246L	KC480025	<i>A. pegreffii</i>	
140.	Sc246M	KC480026		
141.	Sc246N	KC480027		
142.	Sc246O	KC480028		
143.	Tt248A	KC480029	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
144.	Tt248B	KC480030		
145.	Tt254A	KC480031	<i>T. truncatus</i>	<i>A. pegreffii</i>
146.	Tt254B	KC480032		
147.	Tt254C	KC480033		
148.	Tt254D	KC480034		
149.	Tt254E	KC480035		
150.	Tt254F	KC480036		
151.	Tt254G	KC480037		
152.	Tt254H	KC480038		
153.	Tt254I	KC480039		

7.2. Prilog 2

Tablica 22. Popis 11 referentnih sekvenci (fragment mitohondrijske DNK, lokus citokrom oksidaze podjedinice 2 (COII), dužine oko 600 bp) rodova *Anisakis* i *Pseudoterranova* koje se nalaze u GenBank bazi podataka, a koje su korištene u poravnanju i BI (*Bayesian inference*) analizi sekvenci vrsta roda *Anisakis* izoliranih iz kitova zubana (dobri dupin, *T. truncatus*; plavobijeli dupin, *S. coeruleoalba*; glavati dupin, *G. griseus*, i krupnozubi dupin, *Z. cavirostris*) uginulih u Jadranskom moru u razdoblju od 1999. do 2011. godine.

Oznaka sekvence u GenBank bazi podataka	Utvrđena vrsta roda <i>Anisakis</i>
DQ116433.1	<i>Anisakis brevispiculata</i>
DQ116434.1	<i>Anisakis paggiae</i>
DQ116428.1	<i>Anisakis pegreffii</i>
DQ116432.1	<i>Anisakis physeteris</i>
DQ116429.1	<i>Anisakis simplex C</i>
DQ116426.1	<i>Anisakis simplex 1</i>
DQ116427.1	<i>Anisakis typica</i>
DQ116430.1	<i>Anisakis ziphidarum</i>
AJ132189.1	<i>Anisakis simplex</i>
DQ116431.1	<i>Anisakis</i> sp. SM-2005
DQ116435.1	<i>Pseudoterranova ceticola</i>