

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

Petra Ribarić

Gastrointestinalni paraziti divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i grivastog skakača (*Ammotragus lervia*)

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom i na Zavodu za veterinarsku biologiju te Zavodu za lovstvo i divlje životinje Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc.dr.sc. Magde Sindičić i doc.dr.sc. Franje Martinkovića i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

	Stranica
1. UVOD	1
2. CILJEVI RADA	2
3. MATERIJALI I METODE	2
4. REZULTATI	5
5. RASPRAVA	14
6. ZAKLJUČCI	16
7. LITERATURA	17
8. SAŽETAK	20
9. SUMMARY	21
10. ZAHVALE	22

Uvod

Divokoza (*Rupicapra rupicapra*) autohtona je vrsta divljači u Republici Hrvatskoj. Pripada razredu sisavaca (Mammalia), redu parnoprstaša (Artiodactyla) te porodici goveda (Bovidae). Veličine je oveće koze – visine do 80 cm u grebenu, a dužine do 130 cm. Mužjaci su nešto veći i teži od ženki te nerijetko dosežu i preko 40 kilograma. Prirodno stanište divokoze je planinski krš i livade te je ova vrsta anatomski i bihevioralno prilagođena prirodnim ekstremima (ŠAFAREK, 2015.). Živi u manjim krdima vođenim starijom, iskusnom kozom. Ljeti, kada hrane ima u izobilju, izbirljiva je te se hrani travama i zeljastim i grmolikim biljem te raznim bobicama dok se zimi seli u niže krajeve zbog pilćeg snijega te prezimljava na mahovinama, mladicama drveća, pupoljcima te lišajevima. Prirodni su joj neprijatelji ris, vuk, čagalj, lisica te orao za mladunčad. Nalazimo je na području Male Azije, Kavkaza, Karpata, Alpa te Dinarida (JANICKI i sur., 2007.). U Hrvatskoj je nalazimo u Gorskom Kotaru, na Risnjaku, na Velebitu te Biokovu. Na Velebit i Biokovo je reintroducirana budući da je nestala početkom druge polovice dvadesetog stoljeća te su divokoze ispuštene na Biokovo vjerojatno podvrsta - *Rupicapra rupicapra balcanica* budući da su naseljene iz Bosne i Hercegovine, dok su na Velebit ispuštene divokoze iz više lokaliteta te se smatra da su podvrsta *Rupicapra rupicapra rupicapra* (FILIPETI, 2016.).

Grivast skakač (*Ammotragus lervia*) je kozolika antilopa, porijeklom iz gorja Atlas u Sjevernoj Africi. U Republiku Hrvatsku pokusno je unesem krajem 80-tih godina na otok Hvar radi komercijalnog uzgoja. Zatim je 2002. godine pet jedinki grivastog skakača nepoznatog podrijetla ispušteno na planinu Mosor (GANČEVIĆ i sur., 2016.). Također pripada redu parnoprstaša (Artiodactyla) te porodici goveda (Bovidae). Visina u grebenu mu je do 110 cm u mužjaka, dok je duljina tijela do 165 cm, a doseže masu do 150 (mužjak), odnosno 70 kilograma (ženka) (CASSINELLO, 1998.). Stanište grivastog skakača su visokoplaninske goleti i strme litice (PRPIĆ i sur., 2020.), a u hranjenju je zbog oskudnog staništa manje izbirljiv od divokoze - pojest će sve od trava i niskog raslinja pa do lišajeva i iglica crnogorice. Na području gdje je autohton, prirodni neprijatelji su mu leopard i karakal.

Grivasti skakač je sa stajališta parazitologije posebno zanimljiv budući da je u Republici Hrvatskoj alohtona vrsta, pa je i od ekološkog značaja bilo pretražiti te posljedično s time i eventualno pronaći njegove gastrointestinalne parazite. Naime, unošenje strane vrste na neko područje predstavlja rizik za autohtone vrste budući da sa stranim vrstama dolazi i njihova prirodna mikroflora i mikrofauna, pa tako i paraziti kao uzročnici bolesti. Divlje

životinje evolucijski su razvile određenu razinu prilagodbe na parazite prisutne u okolišu te ih ti paraziti u većini slučajeva, dok životinja nije invadirana velikim brojem parazita ili dok nisu prisutni komorbiditeti, neće usmrtiti (ANDERSON, 2000.). Dakako, to nije slučaj kada se u njihovom okruženju nađe nepoznati parazit što nam je u Hrvatskoj poznato iz primjera metilja *Fascioloides magna* (KONJEVIĆ i sur., 2017.; BUJANIĆ, 2020.), koji, oko 150 godina nakon prvobitnog unosa u Europu (BASSI, 1875.; MARINCULIĆ i sur., 2002.) uzrokuje značajne probleme (KONJEVIĆ i sur., 2017.; KONJEVIĆ i sur., 2018.).

Istraživanja gastrointestinalnih parazita divokoza te grivastih skakača nisu česta te je po našim trenutnim saznanjima ovo prvo ovakvo istraživanje u tih vrsta na području Republike Hrvatske. Također, postoji svega nekolicina radova objavljenih u Europi (STANCAMPIANO i sur., 2006.; HOBY i sur., 2006.; MORRONDO i sur., 2010.; CHOVANCOVÁ i sur., 2014.; MARTÍNEZ-GUIJOSA i sur., 2015.; BERRILLI i sur., 2020.) koji se bave ovom tematikom, posebice morfološkom identifikacijom, budući da ona zahtjeva prikupljanje cijelih probavnih sustava ovih životinja, što je iznimno zahtjevan zadatak. Naime, lov na divokoza je sam po sebi zahtjevna aktivnost, divokoze se love na nepristupačnom terenu do kojeg se ne može doći vozilima, pa je dostavljanje teškog probavnog sustava vrlo zahtjevno. Upravo iz tog razloga – nedostupnosti uzoraka – većina objavljenih istraživanja gastrointestinalnih parazita divokoza temeljena je na koprološkoj pretrazi (STANCAMPIANO i sur., 2001; HOBY i sur., 2006.; CHOVANCOVÁ i sur., 2014.; BERRILLI i sur., 2020.) Međutim, korištenje i koprološke pretrage i morfološke identifikacije odraslih parazita, a poglavito i molekularne metode daje najpotpuniju sliku o invadiranosti parazitima.

Ciljevi rada

Cilj je ovog istraživanja bio analizirati parazitofaunu gastrointestinalnog sustava divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i grivastog skakača (*Ammotragus lervia*) u Hrvatskoj koristeći koprološku pretragu, morfološku identifikaciju i molekularne metode.

Materijali i metode

Pregledano je ukupno 20 kompletnih probavnih sustava (predželuci – burag, kapura, sirište i knjižavac, dvanaesnik, jejunum, ileum, cekum te kolon, uključujući omentum) divokoza (*Rupicapra rupicapra*) te 15 probavnih sustava grivastog skakača (*Ammotragus*

lervia), koji su prikupljeni u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost IP 5751 „DNA kao dokaz o distribuciji i vitalnosti ugrožene balkanske divokoze“ voditelja prof.dr.sc. Nikice Šprema s Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su prikupljeni na području Splitsko-dalmatinske županije u suradnji s ovlaštenicima prava lova, a životinje su odstrijeljene u sklopu redovne provedbe lovno-gospodarskih osnova. Nakon odstrjela, probavni sustavi su izdvojeni te dopremljeni na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U sekcijskoj dvorani Zavoda za veterinarsku patologiju, probavni sustav svake životinje u potpunosti je otvoren i pregledan makroskopski. Zatim su uzeti uzorci fecesa direktno iz rektuma životinja te pohranjeni na 4 °C. Ostatak sadržaja probavnog sustava ispran je kroz dva parazitološka sita mrežica različitog promjera (0.5 i 0.2 mm) te je tako dobiven sadržaj izdvojen te pohranjen u etanol (70%).

U laboratoriju Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom prikupljeni paraziti su isprani, uklopljeni u laktofenol, zatvoreni dibutilftalat-polistiren-ksilenom (DPX) te makroskopski pregledani pod svim povećanjima (7-90x) lupe Optika SZM-LED2. Zatim su pregledani mikroskopom Olympus BX 51 pod povećanjima 40x, 100x, 200x, 400x. Paraziti su fotografirani digitalnom kamerom spojenom na mikroskop te identificirani do razine roda, ili u manjem broju i vrste, prema postojećoj literaturi (ANDERSON i sur., 1974.; LICHTENFELLS i sur., 1983.; ANDERSON, 2000.; ECKERT i sur., 2008.).

Koprološka pretraga izvedena je flotacijom s ZnSO₄, SG=1.3 koristeći centrifugu te mikroskop Olympus CX 21 (ECKERT i sur., 2008.).

DNA je izolirana iz 2 do 10 jedinki parazita svakog pojedinog roda ili vrste, ovisno o dostupnosti. Za izolaciju DNA je korišten komercijalni kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, prema uputama proizvođača.

Za umnažanje odsječaka DNA korištene su početnice navedene u Tablici 1, a za pripremu PCR smjese korišten je GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega. Svaka PCR reakcija je provedena u smjesi količine 25 µL koja je sadržavala 5 µl DNK, 2 µl otopine početnica, 12,5 µl GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega i 5,5 µl H₂O. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems koristeći sljedeći protokol i temperature vezanja početnica navedene u Tablici 1: početna denaturacija 95°C tijekom 2 min, zatim 35 ciklusa od 1 min na 94°C, 1 min za vezivanje početnica i 1 min na 72°C, završno produljivanje lanca odvijalo se 5 minuta na 72°C.

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

Tablica 1. Početnice korištenje za umnažanje sekvenci pojedinih rodova parazita

Rod	Početnica
<i>Trichuris</i>	NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') i NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (GASSER i sur. 1993.)
<i>Nematodirus</i> , <i>Oesophagostomum</i> , <i>Haemonchus</i> , <i>Chabertia</i> , <i>Trichostrongylus</i>	NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') i NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (GASSER i sur. 1993.)
<i>C. tenuicollis</i> (<i>T. Hydatigena</i>)	Thg452F (5'TGCATTTAGCTGGTGCCTCAAGTA-3') i Thg1326R (5'ACAAACACGCCGGGGTAACC-3') (FILIP i sur., 2019.)
<i>Moniezia</i>	COX-F (5'-GAT GTT TTC TTT ACA TTT ATC TGG TG-3') i COX-R (5'-GCC ACC ACA AAT CAA GTA TC-3') (HAUKISALMI i sur. 2018)
<i>Paramphistomum</i>	ITS-2 F (5' -TGTGTCGATGAAGAGCGCAG- 3') i ITS-2 R (5'-TGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3') (ITAGAKI i sur. 2003.)

Rezultati

Kombinacijom svih korištenih metoda, paraziti su pronađeni u 19 divokoza, što čini prevalenciju od 94,44% (19/20) te u 87% grivastih skakača (13/15).

Rezultati koprološke pretrage

Koprološkom pretragom u divokoza utvrđeni su sljedeći paraziti (Slika 1.): ličinke iz porodice Protostrongylidae (P=66,70%), oociste *Eimeria* sp. (P=50%), jajašca strongilidnog tipa (P=38,90%), jajašca *Nematodirus* sp. (P=27,8%), jajašca trakavice *Moniezia* sp. (P=5,6%), jajašca *Capillaria* sp. (P=5,6%) te jajašca *Trichuris* sp. (P=5,6%).

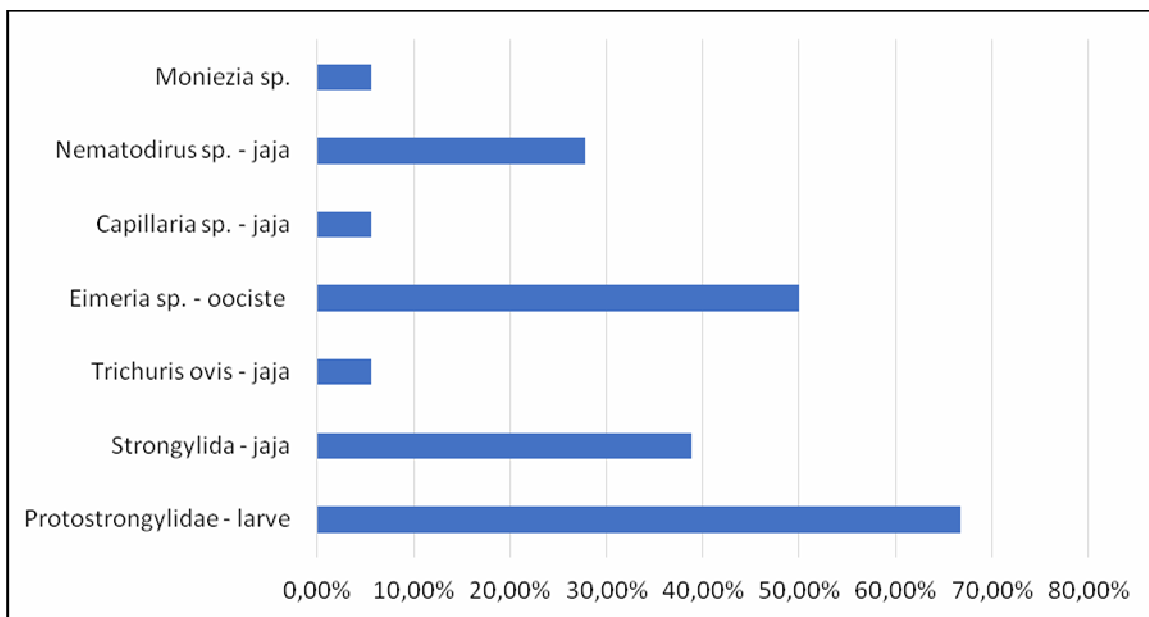
Koprološkom pretragom u grivastog skakača utvrđeni su sljedeći paraziti (Slika 2.): larve iz porodice Protostrongylidae (P=40%), oociste *Eimeria* sp. (P=27%), jajašca strongilidnog tipa (P=46,67%), jajašca *Nematodirus* sp. (P=13,33%), jajašca i članci trakavice *Moniezia* sp. (P=13,33%) te jajašca *Trichuris* sp. (P=13,33%).

Rezultati morfološke identifikacije

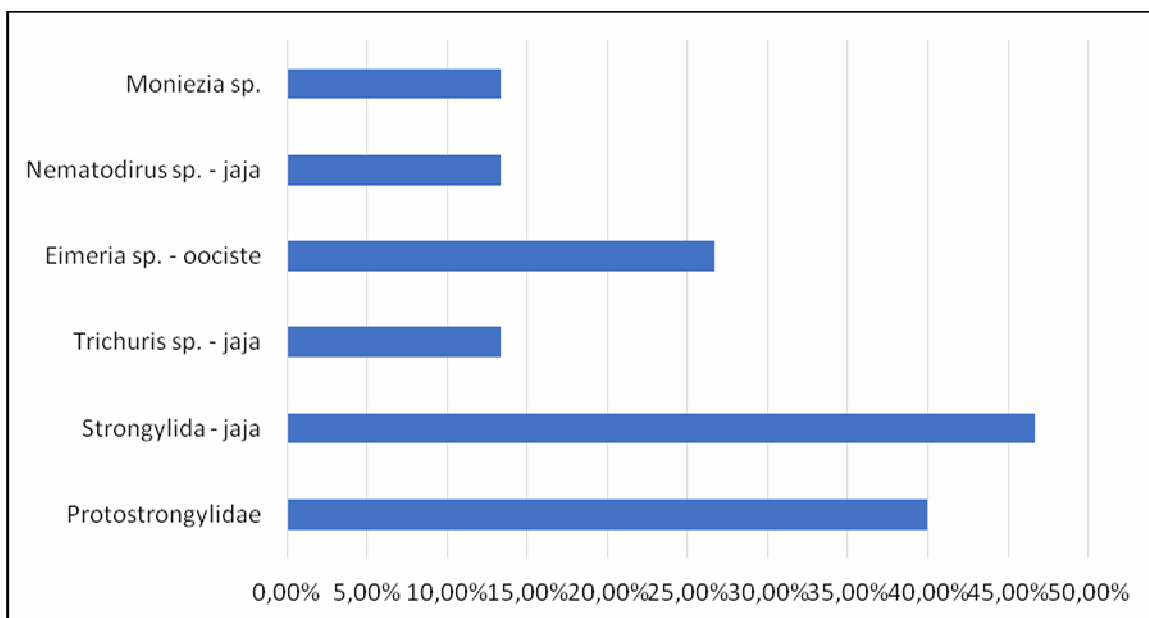
Morfološkom identifikacijom parazita pronađenih u probavnom sustavu divokoze utvrđeni su sljedeći paraziti (Slika 3.): *Oesophagostomum venulosum* (P=45%), *Trichuris* sp. (P=35%), *Cysticercus tenuicollis* – razvojni oblik trakavice *Taenia hydatigena* (P=25%), *Haemonchus contortus* (P=20%), *Chabertia ovina* (P=10%), *Moniezia* sp. (P=10%), *Nematodirus helvetianus* (P=5%), *Ostertagia* sp. (P=5%) , *Cooperia* sp. (P=5%) te *Paramphistomum* sp. (P=5%).

Morfološkom identifikacijom u grivastog skakača utvrđeni su sljedeći paraziti (Slika 4.): *C. ovina* (P=26,67%), *Trichuris* sp. (P=20%), *Moniezia* sp. (P=20%), *Cysticercus tenuicollis* – razvojni oblik trakavice *T. hydatigena* (P=13,34%), *Nematodirus spathiger* (P=13,34%), *O. venulosum* (P=13,34%), *H. contortus* (P=6,67%) te *Trichostrongylus* sp. (P=6,67%).

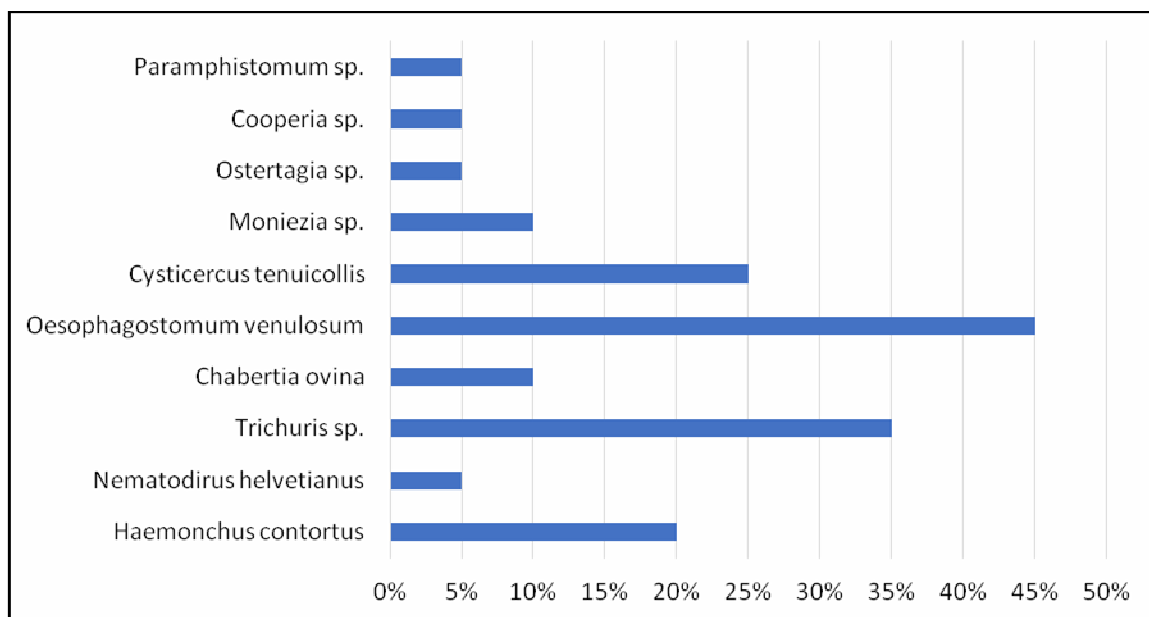
Cysticercus tenuicollis – razvojni oblik trakavice *Taenia hydatigena* se u obje vrste nalazio na omentumu.



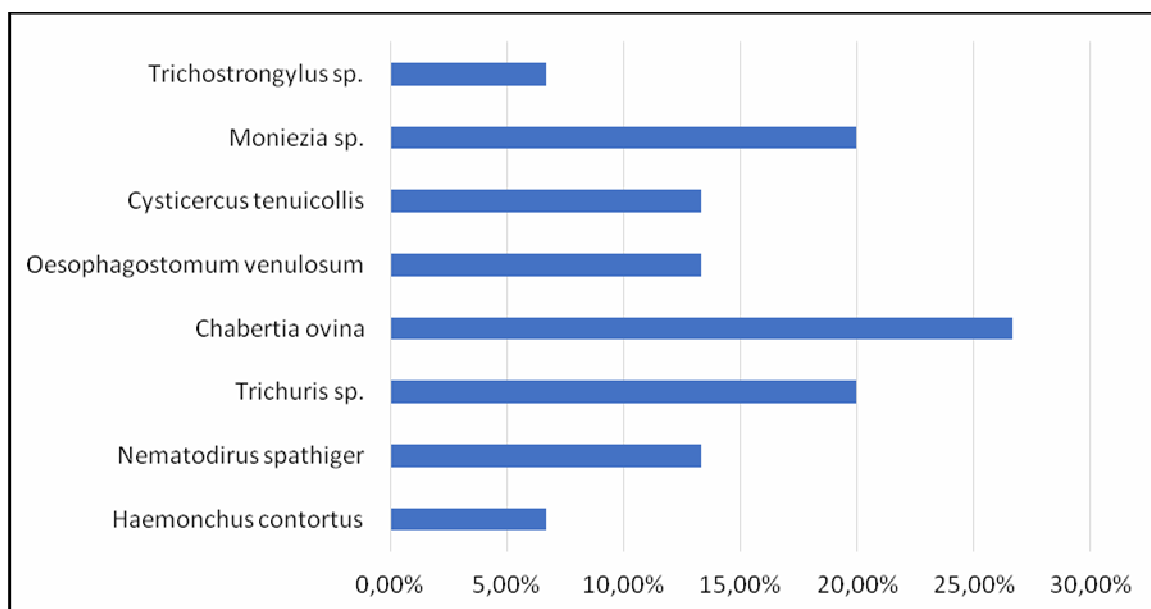
Slika 1. Rezultati koprološke pretrage uzoraka divokoze



Slika 2. Rezultati koprološke pretrage uzoraka grivastog skakača



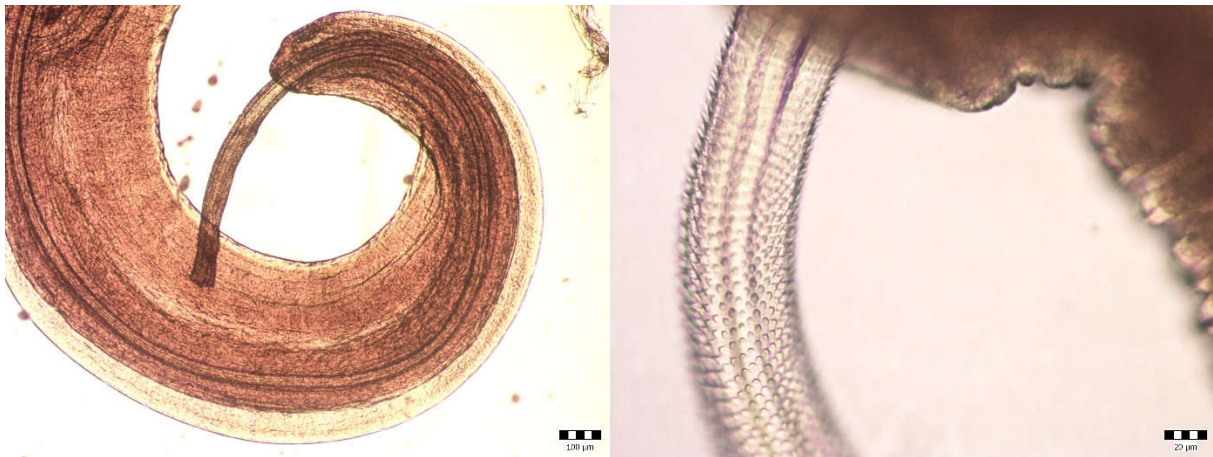
Slika 3. Rezultati morfološke identifikacije parazita probavnog sustava divokoze



Slika 4. Rezultati morfološke identifikacije parazita probavnog sustava grivastog skakača



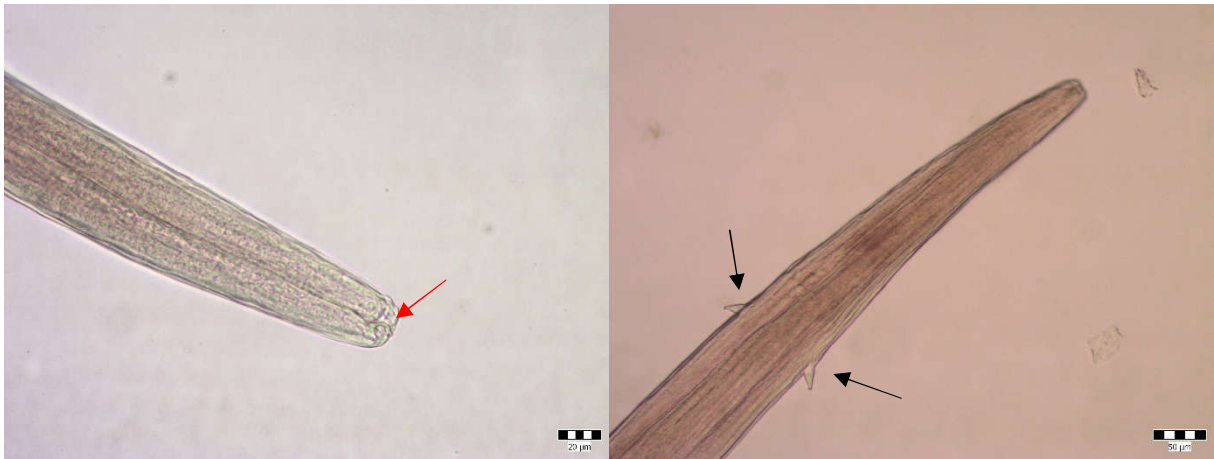
Slika 5. Mužjak *Oesophagostomum venulosum*, prednji kraj (lijevo) i stražnji kraj, spikuli (označeno crvenom strelicom) (desno). Skala = 50 µm (lijevo) i 100 µm (desno)



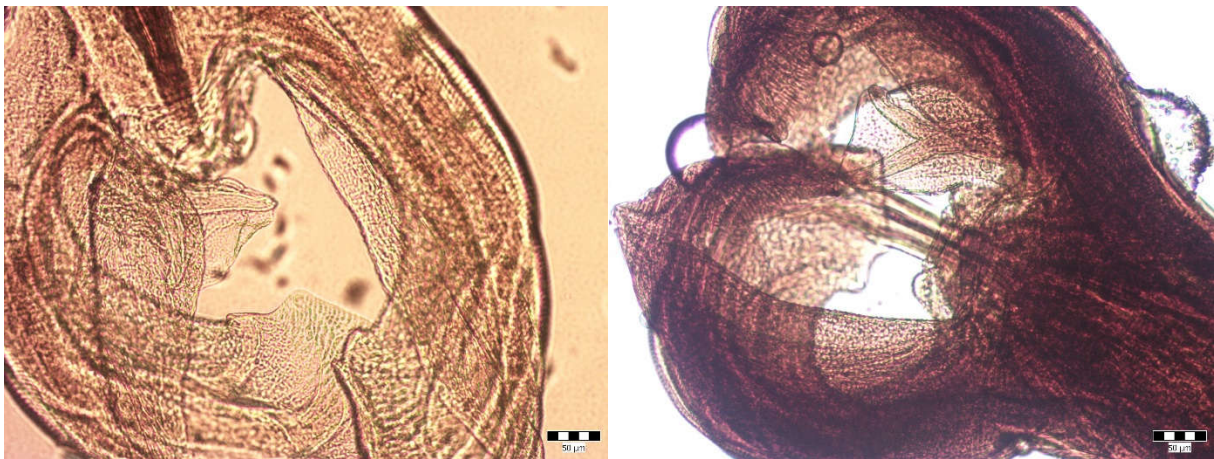
Slika 6. Mužjak *Trichuris* sp., prednji kraj (skala = 100 µm) i spikul (skala = 20 µm).



Slika 7. Ženka *Trichuris* sp., uterus s jajščima i vulva (označeno crvenom strelicom) (lijevo) i stražnji kraj (desno). Skala = 100 µm



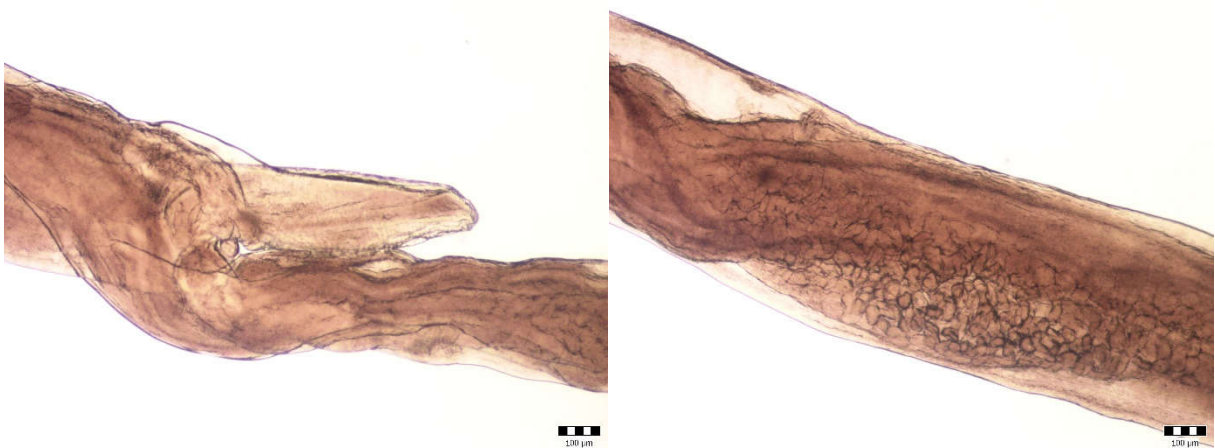
Slika 8. *Haemonchus contortus* - prednji kraj, karakterističan zubić (označeno crvenom strelicom) i cervikalne papile (označeno crnim strelicama). Skala = 20 μm (lijevo) i 50 μm (desno)



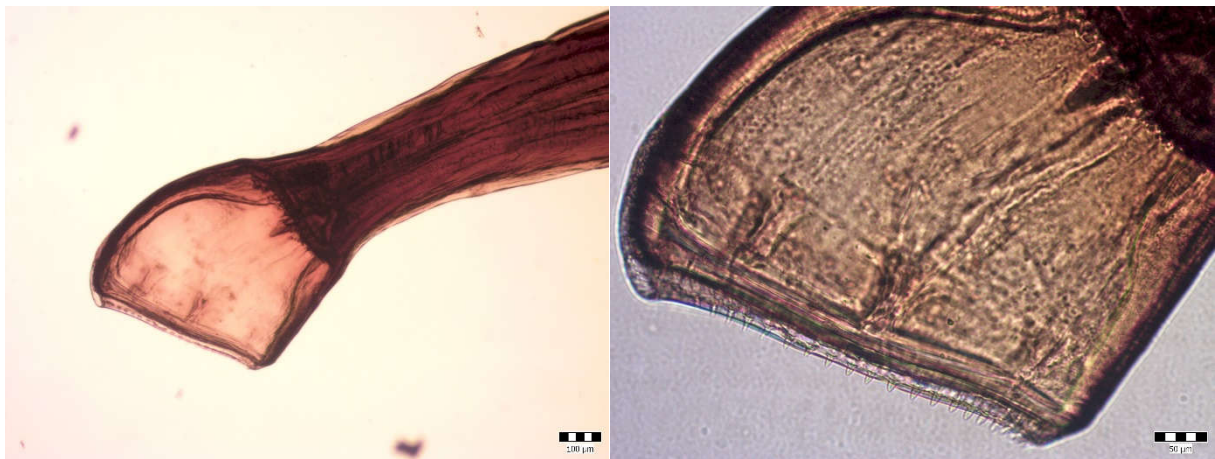
Slika 9. Mužjak *H. contortus* - asimetrični dorzalni režanj kopulacijske burze-obrnuto slovo "Y"



Slika 10. Stražnji kraj *H. contortus* ženka (lijevo) i mužjak (desno). Skala = 100 μm



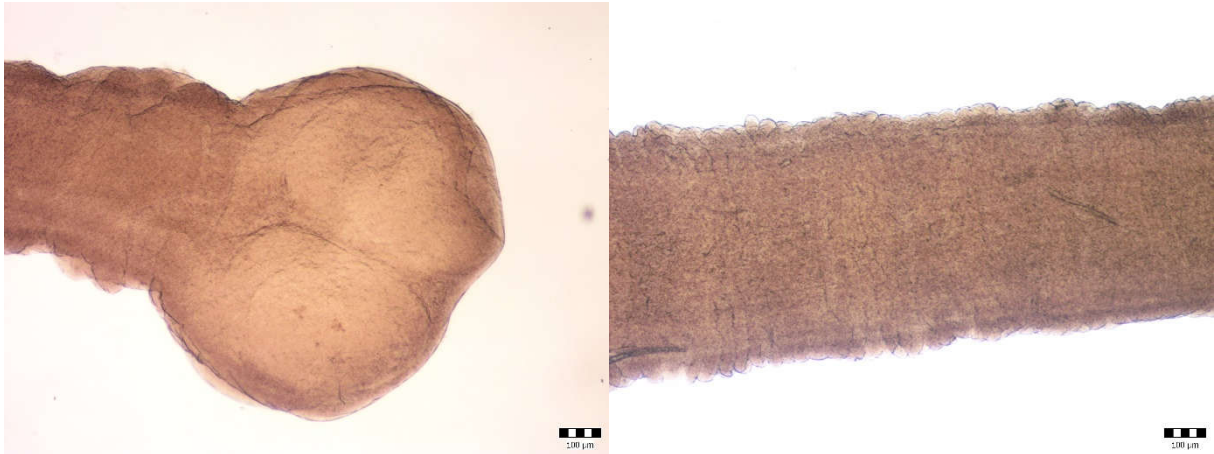
Slika 11. Ženka *H. contortus* – vulvarni zalistak (lijevo) i uterus (desno). Skala = 100 µm



Slika 12. *Chabertia ovina* – prednji kraj. Skala = 100 µm (lijevo) i 50 µm (desno)



Slika 13. *C. ovina* – stražnji kraj mužjaka s dobro izraženim spikulima (označeno crnom strelicom) (lijevo) i ženke (desno) s vulvom (označeno crvenom strelicom). Skala = 100 µm



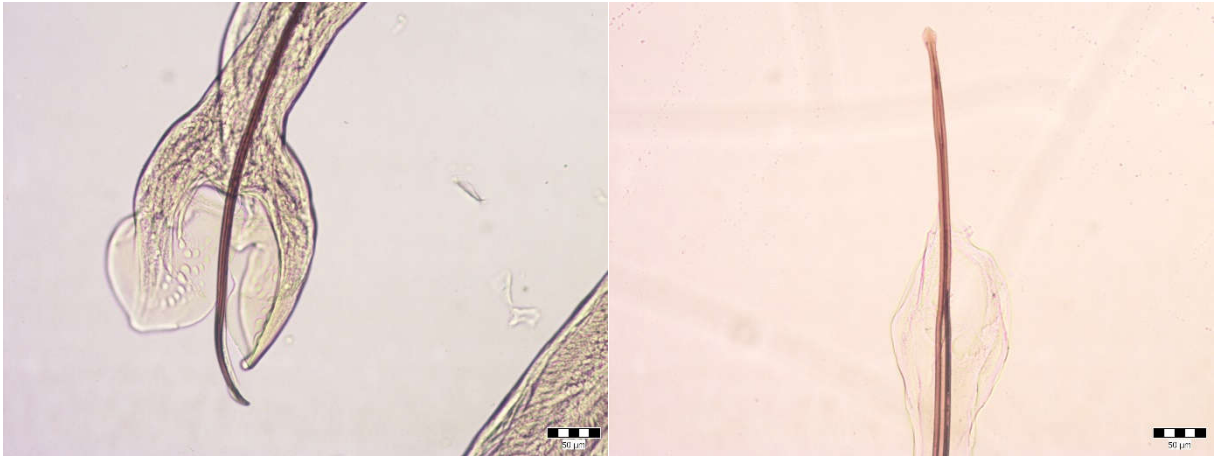
Slika 14. *Moniezia* sp., skoleks (lijevo) i dio strobile (desno); Skala = 100 µm



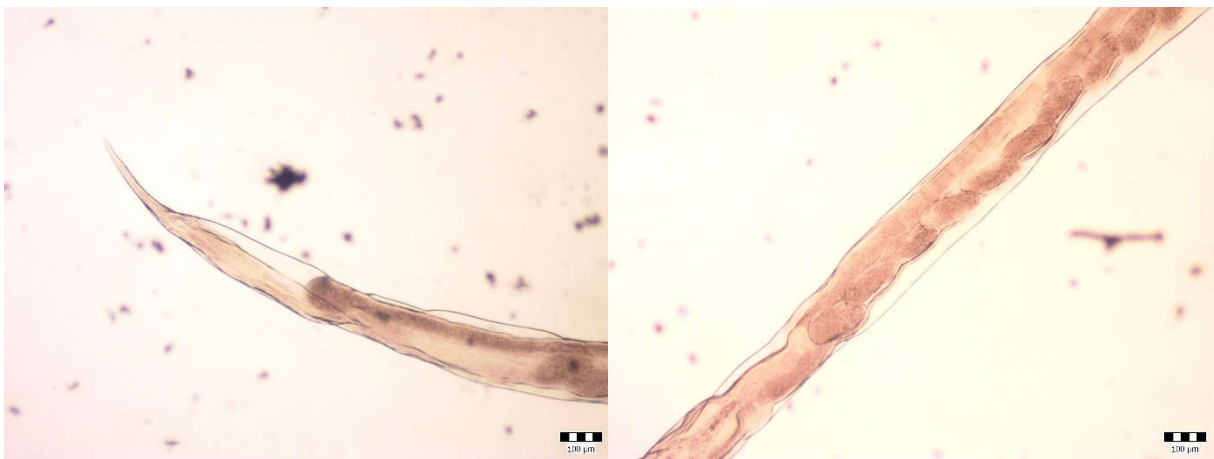
Slika 15. *Ostertagia* sp., prednji (lijevo) i stražnji kraj mužjaka s dobro izraženim spikulima (označeno crvenom strelicom) (desno). Skala = 50 µm



Slika 16. *Nematodirus* sp., prednji i stražnji kraj mužjaka; spikuli (označeni crvenom strelicom); cefalički bulbus (označen crnom strelicom). Skala = lijevo 50 µm i desno 100 µm



Slika 17. *Nematodirus* sp., spikuli i kopulacijska burza. Skala = 50 µm



Slika 18. *Cooperia* sp., ženka, stražnji kraj (lijevo) i uterus s jajašcima(desno). Skala = 100 µm



Slike 20 i 21. *Cysticercus tenuicollis*.

Rezultati molekularne identifikacije

Analizom dobivenih sekvenci potvrdili smo morfološku identifikaciju sljedećih vrsta parazita – *O. venulosum*, *H. Contortus*, *C. ovina* te *N. spathiger*.

Pregledom morfoloških obilježja kod parazita iz roda *Trichuris* sp., *Trichostrongylus* sp. nije sa sigurnošću identificirana vrsta, dok je analizom DNA utvrđeno da se radi o vrstama *Trichuris discolor* (grivasti skakač), *Trichuris ovis* (divokoza) te *Trichostrongylus vitrinus* (kod grivastog skakača).

5. Rasprava

Rezultati iz ovog istraživanja u skladu su s do sada objavljenim podacima o parazitofauni gastrointestinalnog sustava divokoza i grivastog skakača u Europi (STANCAMPIANO, 2001.; STANCAMPIANO, 2006.; HOBY i sur., 2006.; MORRONDO i sur., 2010.; CHOVANCOVÁ i sur., 2014.; MARTÍNEZ-GUIJOSA i sur., 2015.). Također, svi identificirani paraziti su već utvrđeni u drugih vrsta životinja (domaćih i divljih) u Republici Hrvatskoj, ali po prvi puta su pronađeni u divokoze i grivastog skakača.

U istraživanju su korištene tri različite metode, dok je u većini istraživanja parazitofaune divokoze i grivastog skakača uglavnom korištena samo jedna metoda, najčešće koprološka (STANCAMPIANO i sur., 2001.; HOBY i sur., 2006.; CHOVANCOVÁ i sur., 2014.; BERRILLI i sur., 2020.). Više je prednosti kombinirane upotrebe koprološke pretrage, morfološke identifikacije te molekularne metode za identifikaciju parazita, a korištenjem samo jedne metode nemoguće je dobiti potpuni uvid u parazitofaunu gastrointestinalnog sustava. Primjerice, pronađene ličinke iz porodice Protostrongilidae su zapravo razvojni oblik malih plućnih vlasaca te ih je moguće pronaći samo koprološkom pretragom (adulte nalazimo samo u plućima). Nadalje, oociste kokcidije roda *Eimeria* nalazimo samo koprološkom pretragom zbog specifičnosti razvojnog ciklusa kokcidija, koje za svoje razmnožavanje koriste enterocite, te bi za pronalazak ostalih razvojnih oblika bilo potrebno pregledati nativne ili obojane strugotine sluznice crijeva ili histološka pretraga sluznice crijeva (ECKERT i sur., 2008.). Koristeći i morfološku i molekularnu analizu, nađene vrste parazita bilo je moguće identificirati do razine vrste ili roda što koprološkom pretragom gotovo nikad nije moguće. Na primjer, koprološkom pretragom identificirali smo jajašca strongilidnog tipa, budući da je vrstu i rod, izuzev u roda *Nematodirus*, nemoguće odrediti standardnom koprološkom pretragom. Problem korištenja isključivo koprološke pretrage je i u tome što je potrebno imati vrlo svježe uzorke fecesa (neposredno prikupljene na terenu), kako bi se spriječio daljnji razvoj parazita iz jajašca u larvu i time otežala identifikacija (KASSA i sur., 2016.). Stoga preporučujemo kada god je moguće kombinirati sve tri metodologije.

Koristeći više metoda, utvrđen je i larvalni stadij trakavice *T. hydatigena* – *Cysticercus tenuicollis*, koji se nalazio na omentumu te ga je bilo moguće pronaći samo pri pregledu cjelokupnog probavnog sustava. Ni divokoza ni grivasti skakač nisu nositelji trakavice *T. hydatigena*, već samo posrednici, te bi bilo zanimljivo istražiti porijeklo jajašaca trakavice *T. hydatigena* u okolišu divokoza i grivastih skakača, s obzirom da nije utvrđena visoka prevalencija te trakavice u vukova s istog područja (HERMOSILLA i sur., 2017.).

Kod sljedećih parazita nismo uspjeli dobiti PCR proizvod, stoga molekularna identifikacija nije bila moguća: *Moniezia* sp., *Cysticercus tenuicollis*, te *Paramphistomum* sp. Jedini pronađeni primjerak parazita *Nematodirus helvetianus* konzerviran je laktofenolom što je onemogućilo izolaciju DNA.

S obzirom na relativno malen broj pretraženih uzoraka, te potencijalnu opasnost koju grivasti skakač predstavlja kao alohtona vrsta, preporuka je nastaviti istraživanje na većem broju uzoraka kako bi se dobio detaljniji uvid da li je i na koji način unos grivastog skakača utjecao na ekologiju parazita na području koje dijeli s autohtonim vrstama.

Zaključci

1. Analizom rezultata tri metode pretrage probavnog sustava dobiven je cjelokupan uvid u parazitofaunu probavnog sustava divokoza i grivastih skakača pri čemu je bitno za napomenuti da jedna metoda pretrage nadopunjuje drugu.
2. Osim parazita probavnog sustava, kombinacijom svih metoda pronađeni su i paraziti koji potječu iz sustava koji komuniciraju s probavnim sustavom, ali se njihove ličinke izlučuju izmetom kao što je to kod plućnih vlasa ili se nalaze na probavnom sustavu izvana, kao što je to bio slučaj kod larvalnih stadija trakavice *T. hydatigena*. Utvrđeni paraziti: protisti *Eimeria* sp., trakavice *Cysticercus tenuicollis* (ličinka *T. hydatigena*), *Moniezia* sp., oblići porodica Protostrongylidae, *O. venulosum*, *C. ovina*, *H. contortus* (kod obje vrste); *N. helvetianus*, *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp., *Capillaria* sp., *T. ovis*, (samo kod vrste *R. rupicapra* – divokoza); *N. spathiger*, *T. discolor* i *T. vitrinus* (samo kod vrste *A. lervia* – grivasti skakač) govore konkretno o načinu života dotičnih divljih životinja, tj. o njihovoj ishrani. Naime svi pronađeni paraziti su posljedica pašne invazije.
3. Prevalencija invazije gastrointestinalnim parazitima u pretraženih divokoza (*Rupicapra rupicapra*) iznosi 94,44%, dok u pretraženih grivastih skakača (*Ammotragus lervia*) iznosi 87%.

Popis literature

ANDERSON, R. C., G. A. CHABAUD, S. WILLMOTT (1974): CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, Farnham Royal, Bucks, England: Commonwealth Agricultural Bureaux.

ANDERSON, R.C. (2000): Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. 2nd ed. Cambridge: University Press.

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

BERRILLI, F., M. MONTALBANO DI FILIPPO, C. DE LIBERATO, I. MARANI, P. LANFRANCHI, N. FERRARI, T. TROGU, N. FORMENTI, F. FERRETTI, L. ROSSI, S. D'AMELIO, A. GIANGASPERO (2020): Diversity of *imeria* Species in Wild Chamois *Rupicapra* spp.: A Statistical Approach in Morphological Taxonomy. Front Vet Sci. 2020; 7: 577196. doi:10.3389/fvets.2020.577196

BUJANIĆ, M. (2019): Raznolikost gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti jelena običnoga (*Cervus elaphus* L.) u odnosu na invaziju metiljem *Fascioloides magna*. Doktorski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

CASSINELLO, J. (1998): *Ammotragus lervia*: A review on systematics, biology, ecology and distribution. Ann. Zool. Fenn. 35:149-162.

CHOVANCOVÁ, B., Z. HURNÍKOVÁ, M. MITERPÁKOVÁ, T.Z. KOZICA (2014): Gastro-intestinal parasites in Tatra chamois (*Rupicapra rupicapra tatraica*). Chamois International Congress, 17-20 June 2014. Lama dei Peligni – Majella National Park, Abruzzo, Italija.

ECKERT, J., K. T. FRIEDHOFF, H. ZAHNER, P. DEPLAZES (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag Stuttgart, 2. Aufl., 632 str.

FILIP K.J., A.M. PYZIEL, W. JEŻEWSKI, A.W. MYCZKA, A.W. DEMIASZKIEWICZ, Z. LASKOWSKI (2019): First molecular identification of *Taenia hydatigena* in wild ungulates in Poland. Ecohealth 16(1):161–170.

FILIPETI, B. (2020): Gospodarenje divokozom u državnom lovištu broj: XVII/1 – „BIOKOVO“. Diplomski rad. Fakultet agrobiotehničkih znanosti, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

- GANČEVIĆ, P., N. ŠPREM, K. JERINA (2016): Space use and activity patterns of introduced Barbary sheep (*Ammotragus lervia*) in Southern Dinarides, Croatia. 6th World congress on mountain ungulates and 5th International symposium on mouflon: Abstracts, 29 August.-1 September. Nicosia, Cipar. Str. 31-31.
- GASSER, R.B., N.B. CHILTON, H. HOSTE and I. BEVERIDGE (1993): Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Res.* 21 (10):2525-2526.
- GASSER, R.B., L.A. STEVENSON, N.B. CHILTON, P. NANSEN, D.G. BUCKNELL, I. BEVERIDGE (1996): Species markers for equine strongyles detected in intergenic spacer rDNA by PCR-RFLP. *Mol. Cell. Prob.* 10, 371–378.
- HERMOSILLA, C., S. KLEINERTZ, L.M.R. SILVA, J. HIRZMANN, Đ. HUBER, J. KUSAK, A. TAUBERT (2017): Protozoan and helminth parasite fauna of free-living Croatian wild wolves (*Canis lupus*) analyzed by scat collection. *Vet. Parasitol.* 233:14-19. doi:10.1016/j.vetpar.2016.11.011.
- HOBYS, S., F. SCHWARZENBERGER, M.G. DOHERR, N. ROBERT, C. WALZER (2006): Steroid hormone related male biased parasitism in chamois, *Rupicapra rupicapra rupicapra*. *Vet. Parasitol.* 138,337–348.
- HAUKISALMI, V., S. LAAKSONEN, A. OKSANEN, K. BECKMEN, A. HALAJIAN, T. YANAGIDA, M. NAKAO (2018): Molecular taxonomy and subgeneric classification of tapeworms of the genus *Moniezia* Blanchard, 1891 (Cestoda, Anoplocephalidae) in northern cervids (*Alces* and *Rangifer*). *Parasitol Int.* 67(2): 218-224. doi: 10.1016/j.parint.2017.12.006.
- JANICKI, Z., A. SLAVICA, D. KONJEVIĆ, K. SEVERIN (2007): *Zoologija divljači*, 1. izdanje. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb. Str. 43-48.
- KASSA, D., A. MENGESTIE, N. AYALEW, A. BELAYNEW, Z. MEBRIE, T. METADEL (2016): A Review on Diagnostic Techniques in Veterinary Helminthology. *Nat Sci* 14(7):109-118. doi:10.7537/marsnsj140716.15.
- KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, V. ERMAN, A. GUDAN KURILJ, T. ŽIVIČNJAK, K. SEVERIN, S. TOMIĆ, F. MARTINKOVIĆ (2017): New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). *Helminthologia.* 54, 77-80.

- KONJEVIĆ, D., M. BUJANIĆ, A. BECK, T. ŽUGLIĆ, Z. JANICKI (2018): New data on roe deer as aberrant host of *Fascioloides magna*. Proceedings of scientific contributions and abstracts. Prokeš, Marian (ur.). Košice, p. 42.
- LICHTENFELS J. R., P. A. PILITT (1983): Cuticular Ridge Patterns of Nematodirus (Nematoda: Trichostrongyloidea) Parasitic in Domestic Ruminants of North America, with a Key to Species. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 50, 261-274.
- MARINCULIĆ, A., N. DŽAKULA, Z. JANICKI, Z. HARDY, S. LUČINGER, T. ŽIVIČNJAK (2002): Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia. – a case report. Vet. Arh. 72, 319-325.
- MARTÍNEZ-GUIJOSA, J., C. MARTÍNEZ-CARRASCO, J.R. LÓPEZ-OLVERA, X. FERNÁNDEZ-AGUILAR, A. COLOM-CADENA, O. CABEZÓN, G. MENTABERRE, D. FERRER, R. VELARDE, D. GASSÓ, M. GAREL, L. ROSSI, S. LAVÍN AND E. SERRANO (2015): Male-biased gastrointestinal parasitism in a nearly monomorphic mountain ungulate. Parasites Vectors 8:165. doi:10.1186/s13071-015-0774-9.
- MORRONDO, P., L. VÁZQUEZ, P. DIEZ-BAÑOS (2010): Parasitic infections of wild ruminants in Spain with special attention to roe deer and chamois. Parasitologia 52, 1 -2.
- PRPIĆ, A.M., P. GANČEVIĆ, T. SAFNER, K. KAVČIĆ, K. JERINA, N. ŠPREM (2020): Activity patterns of aoudad (*Ammotragus lervia*) in a Mediterranean habitat. J. Vertebr. Biol. 69(4): 20055. doi: 10.25225/jvb.20055.
- STANCAMPIANO, L., V. GUBERTI (2006): Models of parasite biocoenosis dynamic: host density and gastrointestinal parasites in alpine chamois. Parasitologia 48 (1-2):47-49.
- STANCAMPIANO, L., S. SERRA, G. BATTELLI (2001): Gastro-intestinal nematode infections in four Alpine chamois herds: influence of host density on helminth egg output. Parasitologia 43 (3):123-130.
- ŠAFAREK, G. (2015): Životinje Hrvatske, 2. izdanje. Mozaik knjiga d.o.o. Zagreb. Str. 178-179.

Sažetak

Gastrointestinalni paraziti divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i grivastog skakača (*Ammotragus lervia*)

Petra Ribarić

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog istraživanja bio je dobiti uvid u gastrointestinalnu parazitofaunu divokoze (*Rupicapra rupicapra*) i grivastog skakača (*Ammotragus lervia*), što je učinjeno po prvi puta za ove vrste u Republici Hrvatskoj. Korištene su koprološka pretraga, morfološka identifikacija te molekularna identifikacija budući da se navedene metode međusobno nadopunjuju i time daju potpuniji uvid u parazitofaunu određene vrste. Pregledano je 20 probavnih sustava divokoza (*Rupicapra rupicapra*) te 15 probavnih sustava grivastih skakača (*Ammotragus lervia*) otvaranjem te ispiranjem kroz parazitološka sita. Na taj način prikupljeni uzorci identificirani su morfološki i molekularno. Feces je uzet direktno iz rektuma te je izvedena koprološka pretraga flotacijom sa ZnSO₄ (SG=1.3). Prevalencija invazije gastrointestinalnim parazitima u ovom istraživanju iznosi 94,44% kod divokoza te 87% kod grivastih skakača. Utvrđeni su sljedeći paraziti: protisti *Eimeria* sp., trakavice *Cysticercus tenuicollis* (ličinka *T. hydatigena*), *Moniezia* sp., oblici porodica Protostrongylidae, *O. venulosum*, *C. ovina*, *H. contortus* (kod obje vrste); *N. helvetianus*, *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp., *Capillaria* sp., *T. ovis*, (samo kod vrste *R. rupicapra* – divokoza); *N. spathiger*, *T. discolor* i *T. vitrinus* (samo kod vrste *A. lervia* – grivasti skakač). Rezultati istraživanja podudaraju se sa ostalim studijama gastrointestinalnih parazita u Europi.

Ključne riječi: divokoza, (*Rupicapra rupicapra*), grivasti skakač, (*Ammotragus lervia*), paraziti, gastrointestinalni sustav.

Summary

Gastrointestinal parasites of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and barbary sheep (*Ammotragus lervia*)

Petra Ribarić

Veterinary Faculty, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

The goal of this study was to gain insight into the gastrointestinal parasitofauna of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and barbary sheep (*Ammotragus lervia*). Which was done for the first time in these species in the Republic of Croatia. The methods used are coprological examination, morphological identification, and molecular identification, since they mutually complete each other and, in that way, give a more complete image of a certain species' parasitofauna. In this study, 20 gastrointestinal systems of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and 15 gastrointestinal systems of barbary sheep (*Ammotragus lervia*) were examined by opening them and rinsing them through parasitological sieves. In this way collected samples were identified morphologically and molecularly. Feces was collected directly from the rectum and a coprological examination was performed by floatation with ZnSO₄ (SG = 1.3). The prevalence of invasion with gastrointestinal parasites calculated in this study is 94,44% in chamois and 87% in barbary sheep. The following parasites were determined: protista *Eimeria* sp., tapeworm *Cysticercus tenuicollis* (larva of *T. hydatigena*), *Moniezia* sp., nematodes of family Protostrongylidae, *O. venulosum*, *C. ovina*, *H. contortus* (in both species); *N. helvetianus*, *Ostertagia* sp., *Cooperia* sp., *Capillaria* sp., *T. ovis*, (only in *R. rupicapra* – chamois); *N. spathiger*, *T. discolor* and *T. vitrinus* (only in *A. lervia* – barbary sheep).

Key words: chamois, (*Rupicapra rupicapra*), barbary sheep, (*Ammotragus lervia*), parasites, gastrointestinal system.

Zahvale

Zahvaljujem mentorima doc.dr.sc. Magdi Sindičić te doc. dr. sc. Franji Martinkoviću na vodstvu prilikom svakog dijela izrade ovoga rada te na ljubaznosti, strpljenju i prenešenom znanju.

Zahvaljujem dr. sc. Miljenku Bujaniću, prof.dr.sc Deanu Konjeviću, dipl. ECZM, na iznimnoj pomoći pri sekciji probavnih sustava divokoza te na pruženoj mogućnosti da počnem raditi na ovome istraživanju.

Zahvaljujem prof. Dr. sc. Nikici Špremu na ustupljenim uzorcima za ovaj rad. Zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za parazitologiju i invazijske bolesti te Zavoda za veterinarsku biologiju Veterinarskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu na pomoći i iznimnoj ljubaznosti pri mom boravku u laboratoriju.