

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

**PRVI DOKAZ *METILJA PARAMPHISTOMUM LEYDENI* I
PARAMPHISTOMUM CERVI U JELENA OBIČNOG U HRVATSKOJ**

Marina Špehar

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za lovstvo i divlje životinje Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Magde Sindičić i izv. prof. dr. sc. Deana Konjevića.

Predstojnik: prof. dr. sc. Alen Slavica

Mentori: doc. dr. sc. Magda Sindičić i izv. prof. dr. sc. Dean Konjević

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Franjo Martinković
2. izv. prof. dr. sc. Dean Konjević
3. doc. dr. sc. Magda Sindičić
4. prof. dr. sc. Alen Slavica (zamjena)

Zahvaljujem se doc.dr.sc. Magdi Sindičić na stručnom vodstvu te ukazanoj podršci i povjerenju. Divim se Vašoj predanosti i ljubavi prema svom poslu te činjenici da uvijek uspijevate pronaći vremena kako biste pomogli studentima.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, sestri i prijateljima na razumijevanju i podršci koju su bezrezervno ustupali kroz čitav studij.

Hvala ti A. za svu potporu tijekom studiranja.

Popis i objašnjenje kratica

- BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
- DNA – deoksiribonukleinska kiselina
- ITS – internal transcribed spacers
- Pb – parova baza
- PCR – lančana reakcija polimerazom

Popis tablica i slika

- **Slika 1.** Tegumentum *P. leydeni* i *P. cervi*
- **Slika 2.** Burag odstrijeljene košute na čijoj sluznici su vidljivi metilji
- **Tablica 1.** Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom
- **Slika 3.** Slijed ITS2 regije označen kao P1
- **Slika 4.** Slijed ITS2 regije označen kao P2
- **Tablica 2.** Podudaranja sljedova P1 i P2 s uzorcima iz GenBank baze podataka

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Morfologija i razvojni ciklus parazita iz roda <i>Paramphistomum</i>	1
1.2. Biologija i ekologija jelena običnog	3
2. Hipoteza	4
3. Materijali i metode	5
3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	6
3.2. Elektroforeza	7
3.3. Identifikacija polimorfnih nukleotidnih mjesta	7
4. Rezultati	8
5. Rasprava	10
6. Zaključci.....	12
7. Literatura	13
SAŽETAK.....	16
SUMMARY	17
ŽIVOTOPIS	18

1. Uvod

Paraziti iz roda *Paramphistomum* pripadaju koljenu plošnjaka (*Platyhelminthes*), razredu metilja (*Trematoda*), redu dvorodnih metilja (*Digenea*) i porodici *Paramphistomidae*. Kao odrasli primjerci parazitiraju na sluznici buraga, kapure te iznimno knjižavca domaćih i divljih preživača, a kao juvenilni oblici parazitiraju u crijevima, na putu do predželudaca. Simptome bolesti, koja se naziva paramfistomoza, uzrokuju isključivo nezreli stadiji parazita, dok prelaskom u adulte bolest često prolazi asimptomatski (ŠOŠTARIĆ i sur., 2010.).

Rasprostranjenost, učestalost i klinički značaj paramfistomoze u Europi je slabo istražen (O'TOOLE i sur. 2014), no brojni autori navode *Paramphistomum cervi* kao najrasprostranjenijeg predstavnika ovog roda u Euroaziji (YAN i sur., 2013). U Hrvatskoj je paramfistozoza kod ovaca prvi puta opisana 2006. godine (ŠOŠTARIĆ i sur., 2006.), dok je 2010. godine zabilježena epizootija na govedima u Posavini (ŠOŠTARIĆ i sur., 2010.). No u oba slučaja dijagnostika je provedena na temelju morfoloških obilježja, te nije identificirana vrsta uzročnika oboljenja. Pregledom literature nisam pronašla podatke o paramfistomozi kod divljih životinja u Hrvatskoj.

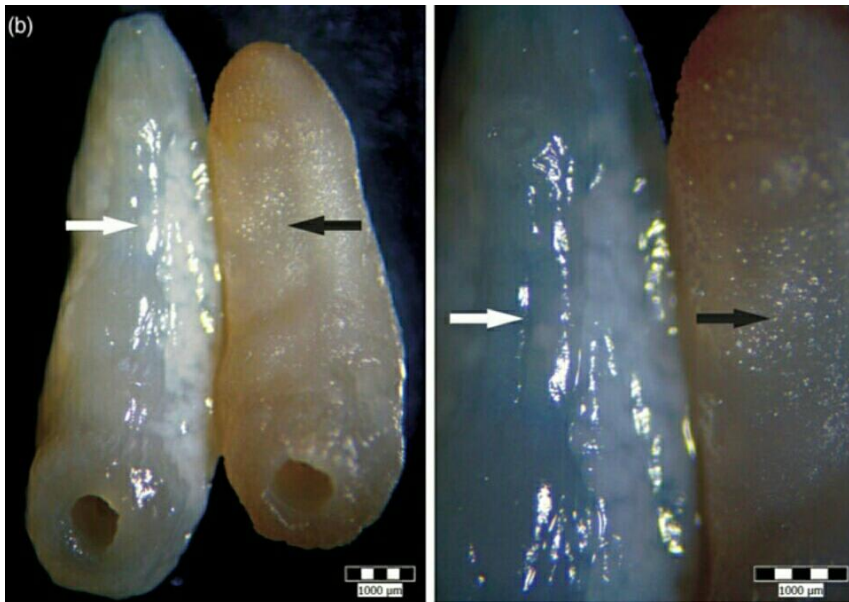
1.1 Morfologija i razvojni ciklus parazita iz roda *Paramphistomum*

Tijelo parazita iz roda *Paramphistomu* ne prelazi više od 5 mm duljine te je prekriveno tegumentom koji služi za zaštitu i mjesto je gdje se nalaze osjetne papile. Jedna od najvažnijih morfoloških osobitosti ovog roda su prijanjaljke čija je uloga prihvaćanje za podlogu, odnosno uzimanje hrane. Na prednjoj strani tijela nalazi se usna, dok je na ventralnoj strani veća, trbušna prijanjaljka koja je razvijena samo u odraslih parazita. Karakteristika spolnog sustava je hermafroditizam pa su tako i muški i ženski spolni organi smješteni na posteriornoj regiji tijela.

Razlikovanje vrsta iz roda *Paramphistomum* na temelju morfoloških obilježja je vrlo teško i neprecizno. Determinira se izgled i tip ždrijela, genitalnog otvora, trbušne siske i prisunost tegumentnih papila adultnih stadija (NIKANDER, 1992.). No razvoj modernih tehnologija i molekularne biologije otvorio je nove mogućnosti razlikovanja vrsta. Jedna od najučinkovitijih metoda je analiza vrstno specifičnih odsječaka DNA koji se umnažaju lančanom reakcijom polimerazom (PCR) pomoću vrstno specifičnih početnica. U ovu su se svrhu kod parazita pokazali vrlo uspješni dijelovi ribosomske DNA koji kodiraju strukturne komponente

ribosoma. Posebice ITS1 i ITS2 regija (*internal transcribed spacers*) jer im je raznolikost unutar vrste zanemariva, dok je raznolikost između vrsta izražena. Za identifikaciju metilja najboljim se pokazala ITS2 regija (BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2010.; LOFTY i sur., 2010.).

Na temelju morfoloških obilježja opisan je veći broj vrsta iz roda *Paramphistomum*, no s godinama su istraživanja pokazala da se radi o istim vrstama s različitim nazivima, te se danas razvrstavanje roda revidira pomoću molekularnih metoda. Danas se smatra da rod obuhvaća ukupno pet vrsta. Analizom ribosomske DNA potvrđeno da su *Paramphistomum cervi* i *Paramphistomum leydeni* odvojene vrste (MA i sur., 2015.).



Slika 1. Prikaz *P. cervi* i *P. leydeni*, bijelom strelicom označen je tegumentum *P. cervi* (odsutstvo papila), crnom strelicom prikazan je *P. leydeni* (papile) (autor fotografije doc. dr. sc. Franjo Martinković)

Vrste iz roda *Paramphistomum* su dikseni paraziti. Jajašca izlučena izmetom domaćina u povoljnim uvjetima embrioniraju u okolišu, te zatim trepetljikava ličinka (miracidij) ulazi u posrednika, puževe iz roda *Bulinus*, *Planorbis* i *Pseudosuccinea*. Ličinka s repićem (cerkarija) napušta puža te se prihvaća na vlati trave ili ostaje slobodna u vodi i prelazi u invazivni oblik (metacerkariju). Konačni nositelji, odnosno domaći ili divlji preživaci, invadiraju se jedući biljke na kojima su metacerkarije. U konačnom domaćinu parazit prolazi kroz sluznicu crijeva i migrira do buraga ili kapure u kojima nastavlja razvoj do spolno zrelog oblika, odnosno

odraslog parazita (BOWMAN, 2008.). Sama migracija uključuje i posljedično oštećenje sluznice što dovodi do primarnih simptoma ove parazitske bolesti - enteritisa i proljeva u kojem se katkad nalaze primjese krvi. Kao rezultat učestalih proljeva, javlja se poremećaj elektrolita i gubitak proteina, koji s vremenom dovode do nastanka generaliziranog edema i, u rijetkim slučajevima, anemije (SANABRIA i ROMERO, 2008.). Simptome uzrokuju isključivo nezreli stadiji parazita, dok prelaskom u adulte bolest često prolazi asimptomatski (ŠOŠTARIĆ i sur., 2010.). Osim navedenih gastroenteroloških promjena, čest nalaz na invadiranim životinjama prigodom razudbe je oštećeno i hemoragično tkivo jetre. U kasnijim stadijima bolesti, koja se naziva paramfistomoza, tkivo jetre može biti zahvaćeno opsežnom nekrozom ili fibrozom.

1.2. Biologija i ekologija jelena običnog

Prema zoološkoj klasifikaciji, jelen je sisavac iz reda parnoprstaša (*Artiodactyla*), te pripada podredu preživača (*Ruminantia*), porodici jelena (*Cervidae*) i rodu jelen (*Cervus*). Prema Zakonu o lovstvu (ANONYMUS, 2005.), jelen obični u Hrvatskoj pripada krupnoj divljači zaštićenoj lovostajom, dok prema tradicionalnoj lovnoj klasifikaciji jelen pripada divljači visokog lova (JANICKI i sur., 2007.). Mužjak se naziva jelen, ženka košuta, a pomladak oba spola se do kraja ožujka druge kalendarske godine naziva tele ili jelenče. Od ovog perioda pa sve do prvog teljenja, mlade ženke nazivaju se košutice, a mladi mužjaci čišćenjem prvih rogova postaju jelenčići. (TROHAR, 2004.)

U izgledu jelena uočava se da je greben nešto viši nego križa te visoke noge. Ovakva građa tijela pogoduje dugom trčanju. Boja dlake mijenja se ovisno o godišnjem dobu, tako je od proljeća do jeseni ona rđasto crvena, dok zimi postaje tamnosmeđe do sive boje. Također, zimska je dlaka gušća i dulja. Razlike među spolovima se, osim u veličini, očituju i u nošenju rogova i grive, koje košuta nosi samo iznimno (JANICKI i sur., 2007.). Jeleni su punorošci, odnosno imaju godišnji ciklus rasta i odbacivanja rogova. U ciklus rasta roga ubrajaju se rast rogova, okoštavanje rogova, skidanje čupe te odbacivanje rogova. Svake godine u veljači ili ožujku jelen odbacuje rogove, kojima je potrebno narednih 120 dana kako bi ponovno narasli. U dobi od 9 do 12 godina, jelenska divljač postiže maksimalan razvoj roga, nakon dvanaeste godine kvaliteta rogovlja opada. (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.).

Tjelesna masa odraslih mužjaka iznosi između 200 i 250 kg, dok ženke dosežu maksimalno 150 kg. Od gubice do korijena repa, odrasli primjerci dugi su od 225 do 275 cm, a u grebenu su visoki do 150 cm (ČEOVIĆ, 1940.)

Prehrana jelena bazira se isključivo na hrani biljnoga porijekla te se sastav obroka razlikuje ovisno o godišnjem dobu i dostupnosti određene krme. Osnovu obroka čine zeljaste biljke, djetelina, pupovi, plodovi voća. Količina dnevnog obroka iznosi 6 do 8 kilograma po grlu (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.). Potraga za hranom najizraženija je u zoru i navečer u suton.

U područjima s dobrim uvjetima i mnogobrojnim izvorima hrane, košute spolnu zrelost dosežu s 15 mjeseci, u suprotnom, zrelost se može očekivati tek s navršениh 30-35 mjeseci starosti. Parenje započinje rikom, specifičnim glasanjem mužjaka koji na taj način pokazuju svoj autoritet te zastrašuju ostale mužjake. Rika započinje polovicom rujna i traje oko 4 tjedna. Graviditet košuta traje 240 dana, dakle do svibnja ili lipnja (DURANTELE, 2003.). Jelen je iznimno socijalna životinja stoga uvijek žive u krdimama. Jedan tip krda čine košute s teladi ili jednogodišnjim jelenima, drugi tip krda obuhvaća jelene ostalih starosti predvođene mladim jelenima. Izvan krda mogu se uočiti jedino posve stare jединke. Osnovnu obiteljsku strukturu čine košuta, tele i prošlogodišnje mladunčice. Nekoliko ovakvih struktura zajedno čine krdo koje obično predvodi odrasla košuta.

Točna procjena starosti jedinke može se utvrđivati prema izgledu zubala do navršene dvije i pol godine. Nakon toga, procjena se ne može smatrati potpuno točnom, obzirom da se tada određuje prema brzini trošenja zubne plohe, koja se uvelike razlikuje među jedinkama (DARABUŠ i JAKELIĆ, 2002.). Jelen ima 34 zuba te zubna formula glasi I 0/4, C1/0, P 3/3, M 3/3.

Stanište jelena običnog u Europi najčešće predstavljaju šumska područja u blizini velikih vodotoka Rajne, Majne, Odre, Dunava i drugih velikih rijeka, no također nalazimo ga u brdskim i planinskim šumama diljem Europe. U Hrvatskoj, jelen obični pretežno zauzima područje Slavonije, Baranje te Gorskog Kotara. (SEVERIN, 2009.).

2. Hipoteza

Budući u znanstvenoj literaturi postoji malo podataka o pojavnosti parazita iz roda *Paramphistomum*, osobito kod divljih preživaca, cilj našeg istraživanja bio je utvrditi koja vrsta metilja se javlja u buragu jelena običnog (*Cervus elaphus*) u Hrvatskoj. Naša pretpostavka je bila da je u Hrvatskoj prisutan metilj *Paramphistomum cervi*, budući da ga se smatra uobičajenim parazitom divljih preživaca u Europi. No s obzirom da je morfološka identifikacija nedostatna, dodatni cilj nam je bio identificirati vrstu pomoću molekularnih metoda, odnosno umnažanjem ITS2 regije lančanom reakcijom polimeraze.

3. Materijali i metode

Istraživanje sam provela na 24 uzorka metilja prikupljenih iz buraga košute jelena običnoga (*Cervus elaphus*), odstrijeljene u sklopu redovite provedbe lovnogospodarske osnove u državnom otvorenom lovištu br. III/39 "OPEKE II" kod Lipovljana (Slika 1). Uzorci su prikupljeni u sklopu znanstvenog projekta "Molekularna epidemiologija izabranih parazitarnih bolesti divljih životinja" Hrvatske zaklade za znanost voditelja doc. dr. sc. Deana Konjevića.

Za izolaciju DNA iz uzoraka metilja koristile smo komercijalni kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega. Izolacija DNA rađena je prema protokolu proizvođača.



Slika 2. Burag odstrijeljene košute, na sluznici su vidljivi metilji (jedan primjerak označen strelicom)

3.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za umnažanje ITS2 regije lančanom reakcijom polimerazom (PCR) korištene su početnice GA1 (AGAACATCGACATCTTGAAC) (ANDERSON i BARKER, 1998.) i BD2 (TATGCTTAAATTCAGCGGGT) (LUTON i sur., 1992.).

Za pripremu PCR smjese korišten je GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega. PCR reakcija provedena u smjesi količine 25 µL koja je sadržavala 5 µl DNA, 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 uvjete navedene u Tablici 1.

Tablica 1. Reakcijski uvjeti lančane reakcije polimerazom

	Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
Aktivacija polimeraze	95	2 min	1
Denaturacija kalupa	94	0,5 min	35
Prianjanje početnica	55	1 min	
Produženje lanca	72	0,5 min	
Završno produženje	72	10 min	1

3.2. Elektroforeza

Prisutnost PCR proizvoda provjeravala sam elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. Gel je pripremljen otapanjem 0,75 g agaroze (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad) u 50 ml 1 X TBE pufera. U agarozu je dodano 5 µl SYBR Safe Gel stain, Invitrogen. Na parafilmu sam izmiješala 5 µl PCR proizvoda i 2 µl pufera (LB pufer, engl. loading buffer), koji sadrži 0,25% bromfenol plavila, 0,25% ksilencijanол fluorofosfata i 15% fikola, te sam ih nanijela u jažice u gelu. Elektroforezom sam provjerila da li je došlo da umnažanja željenog slijeda, te da li su se pojavili dodatni, nespecifični fragmenti. Elektroforezu sam provela na sobnoj temperaturi, pri naponu od 90 V u trajanju od 40 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru.

3.3. Identifikacija polimorfnih nukleotidnih mjesta

PCR proizvodi poslani su na sekvenciranje u servis Macrogen Europe u Amsterdamu, Nizozemska. Rezultati sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) dobiveni su u ab1 i PDF formatu.

Sljedove kontrolne regije sam analizirala u BioEdit programu (HALL, 1999.). U BioEditu je implementiran ClustalW program (THOMPSON i sur., 1994.) kojim sam izvršila višestruko sravnjenje sljedova DNA i identificirala sva polimorfna nukleotidna mjesta.

GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretražila sam alatom BLAST-om (Basic Local Alignment Search Tool), u potrazi za pohranjenim sljedovima kontrolne regije parazita iz roda *Paramphistomum*.

4. Rezultati

Uspješno sam izolirala DNA, te umnožila slijed ITS2 regije na 24 uzorka metilja prikupljenih iz buraga košute. Zbog niske kvalitete rezultata sekvenciranja, jedan uzorak nije uključen u daljnju obradu podataka, te sam analizirala slijed ITS2 regije ukupne dužine 320 parova baza (pb) kod 23 uzorka metilja. Od 23 uzorka, ukupno 22 uzorka su imala jednaki slijed (označen kao P1), dok se jedan uzorak razlikovao u ukupno 9 parova baza (3,9%) (označen kao P2) (Slika 2 i 3).

```

      20      40      60
P1 TCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGAATCTGCCAGCTGGCGTGATCTCCTCTG
      80      100     120     140
P1 TGGTTCGCCACGTGAGGTGCCAGATCTATGGCGTTTTCTAATGTCTCCGGACACAACCGCGTCTTGCTGG
      160     180     200
P1 TAGCGCAGACGAGGGTGTGGCGGTAGAGTCGTGGCTCAGTTAACTGTAATGGCAGCACGCTCTACTGTTGT
      220     240     260     280
P1 GCCTTTGTTAGTGTAACGGTTTTGAGATGCTATTGCTGTCCGTCCGATCATGATCACCTACTGTGGTGTTTC
      300     320
P1 TGCTACCTGACCTCGGATCAGACGTGAATACCCGCT
```

Slika 3. Slijed ITS2 regije označen kao P1

```

P2 TCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGAATCTGCCAGCTGGCGTGATTTTCCTCTG
      20      40      60
P2 TGGTTCGCCACGTGAGGTGCCAGATCTATGGCGTTTTTCTAATGTCTCCGGACACAACCGCGTCTTGCTGG
      80      100      120      140
P2 TAGCGCAGACGAGGGTGTGGCGGTAGAGTCGTGGCTCAGTGAAGTGTAAATGGTAGCACGCTCTGCTGTTGT
      160      180      200
P2 GCCTTTGTTAGTGTAACGGCTTGAGATGCTATTGCCGTCGGTCTAATCATGATCACCTACTGTGGTGTTC
      220      240      260      280
P2 TGTTACCTGACCTCGGATCAGACGTGAATACCCGCT
      300      320

```

Slika 4. Slijed ITS2 regije označen kao P2

Pomoću alata „BLAST“ pretražila sam Gen Bank bazu nukleotidnih sljedova da utvrdim podudaraju li se s sljedovi P1 i P2 iz našeg istraživanja s nekim od pohranjenih uzoraka. Analiza je pokazala da se slijed P1 podudara s pohranjenim uzorcima vrste *Paramphistomum leydeni*, dok se slijed P2 podudara sa slijedom vrste *Paramphistomum cervi* (Tablica 2).

Tablica 2. Podudaranja sljedova P1 i P2 s uzorcima iz GenBank baze podataka

Slijed	Gen Bank broj	Zemlja podrijetla	Autor
P1 <i>Paramphistomum leydeni</i>	KP341666	Kina	MA i sur., 2015.
	KJ995525, KJ995526, KJ995527, KJ995528, KJ995529, KJ995530, KJ995531, HM209064	Urugvaj	SANCHIS i SANABRIA, neobjavljeno
	AB973398	Irska	ZINTL i sur., neobjavljeno
P2 <i>Paramphistomum cervi</i>	KJ459935, KJ459936	Kina	ZHENG i sur., 2014.

5. Rasprava

Prvotno se smatralo da su vrste metilja iz roda *Paramphistomum* rasprostranjene pretežito u tropskom i suptropskom području, no kako su dokazi za njihovu prisutnost i u područjima umjerenog pojasa bivali sve učestaliji, pokazala se potreba za dodatnim istraživanjima (O'TOOL i sur., 2014.). Tako se danas zna da su ovi metilji rasprostranjeni u Aziji, Africi, Americi, Europi i Oceaniji (MA i sur., 2015.) te se sve više uviđa njihov epizootiološki značaj.

Također su do nedavno saznanja o rodu *Paramphistomum* na svjetskoj razini uglavnom proizlazila iz istraživanja provedenim na domaćim preživačima, te na temelju morfološke dijagnostike. Međutim, sve češće se uviđa važnost molekularne dijagnostike, te važnost jelenske divljači kao rezervoar za domaće životinje (O'TOOLE i sur., 2014.).

Do sada su objavljeni rezultati istraživanja na metiljima buraga divljih preživača provedenih su u Finskoj (NIKANDER i SAARI, 2007.), Slovačkoj (BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2010.), Srbiji (PAVLOVIĆ i sur., 2012.) i Irskoj (O'TOOLE i sur., 2014.). NIKANDER i SAARI (2007.) su proveli istraživanje na sobovima (*Rangifer tarandus*), te su elektronskom mikroskopijom utvrdili da su životinje invadirane *Paramphistomum leydeni*, a ne kako se do tada smatralo s *Paramphistomum cervi*. *Paramphistomum cervi* utvrđen je u jelena u Slovačkoj (BAZSALOVICSOVÁ i sur., 2010.), dok je u Srbiji potvrđena prisutnost *Paramphistomum microbothrium* (PAVLOVIĆ i sur., 2012.). O'TOOLE i sur. (2014.) su utvrdili da su lopatari (*Dama dama*), najčešća i najraširenija vrsta jelena u Irskoj, vrlo često invadirani s *Paramphistomum leydeni* te istovremeno i s jetrenim metiljem (*Fasciola hepatica*), dok je nešto niža učestalost *Paramphistomum leydeni* utvrđena u jelena običnog (*Cervus elaphus*). I mi smo u našem uzorku utvrdili prisutnost dvije različite vrste metilja u buragu, što je prethodno potvrđeno (MA i sur., 2015).

Budući da mnogi autori ne razlikuju buražne metilje *P. cervi* i *P. leydeni*, ili se razlikovanje temelji na nedostatnim morfološkim metodama, malo je poznato o njihovoj rasprostranjenosti i učestalosti. Osobito je malo podataka poznato za metilja *P. leydeni*. Novija istraživanja ukazuju da ovaj parazit u Argentini spada u prijeteće zarazne bolesti (SANABRIA i sur., 2011.), što dodatno ukazuje na važnost praćenja stanja u Europi.

Iako se smatralo da su metilji iz roda *Paramphistomum* prisutni u Hrvatskoj, prve epizootije paramfistomoze zabilježene su tek 2006. i 2010. godine na ovcama i govedima na širem nizinskom području. Veterinari nisu bili upoznati s ovom bolešću te je nisu prikladno liječili što je dovelo do velikog broja pobola i pomora životinja, a najvjerojatnije i do znatnog širenja uzročnika po pašnjacima (ŠOŠTARIĆ i sur., 2010.). No, prilikom navedenih epizootija nije utvrđeno od koje vrste metilja su životinje oboljele, stoga na temelju trenutno raspoloživih znanstvenih podataka nije moguće utvrditi da li su domaće životinje bile izvor invazije za divlje životinje ili obrnuto.

6. Zaključci

1. U Hrvatskoj su kod jelena prisutni buražni metilji vrsta *Paramphistomum leydeni* i *Paramphistomum cervi*.
2. Morfološke metode dijagnostike vrsne pripadnosti često su nedostatne i poželjno je, kada god je to moguće, uvrstiti molekularnu dijagnostiku u redovnu upotrebu.
3. Ovo je prva identifikacija vrsta iz roda *Paramphistomum* u Hrvatskoj na molekularnoj osnovi.
4. Potrebno je provesti sustavno istraživanje rasprostranjenosti i učestalosti paramfistomoze i kod divljih i kod domaćih preživača u Hrvatskoj.

7. Literatura

- ANDERSON, G. R., S. C. BARKER (1998): Inference of phylogeny and taxonomy within the *Didymozoidae* (Digenea) from the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA. *Syst. Parasitol.* 41, 87–94.
- ANONYMUS (2005): Zakon o lovstvu. Narodne novine 140/05.
- BAZSALOVICSOVÁ, E., I. KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, M. ŠPAKULOVÁ, M. REBLÁNOVÁ, K. OBERHAUSEROVÁ (2010): Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helminthologia* 47, 76 – 82.
- BOWMAN, D. (2008): Georgis' Parasitology for Veterinarians. W.B. Saunders Company p.124
- ČEOVIĆ, I. (1940.): Lovstvo, Tipografija d.d., Zagreb, str. 608.
- DARABUŠ S., I.Z. JAKELIĆ (2002.): Osnove lovstva, 2.izdanje, Hrvatski lovački savez, Zagreb. Str. 69.
- DARABUŠ S., I.Z. JAKELIĆ (2002.): Osnove lovstva, 2.izdanje, Hrvatski lovački savez, Zagreb. Str 71-73.
- DURANTE, P. (2003.): Chasse l'encyclopedié, Edition Artémis. Francuska. Str.376-377.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/97/NT. *Nuc. Acid. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- JANICKI Z., A.SLAVICA, D.KONJEVIĆ, K.SEVERIN (2007): Zoologija divljači, Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str.14. i 24.
- LOTFY, W. M., S. V. BRANT, K. I. ASHMAWY, R. DEVKOTA, G. M. MKOJI, E. S. LOKER (2010): A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Vet. Parasitol.* 174, 234–240.
- LUTON, K., D. WALKER, D. BLAIR (1992): Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminths: Trematoda Digenea). *Mol. Biochem. Parasitol.* 56, 323–328.

- MA, J., J. J. HE, G. H. LIU, D. H. ZHOU, J. Z. LIU, Y. LIU, X. Q. ZHU (2015): Mitochondrial and nuclear ribosomal DNA dataset supports that *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Digenea) is a distinct rumen fluke species. *Parasit. Vectors* 8, 201.
- NIKANDER, S. (1992): Paramphistomosis of reindeer in Finland. *Rangifer* 12, 187-189.
- NIKANDER, S., S. SAARI (2007): Notable seasonal variation observed in the morphology of the reindeer rumen fluke (*Paramphistomum leydeni*) in Finland. *Rangifer* 27, 47–57.
- O'TOOLE, A., J. A. BROWNE, S. HOGAN, T. BASSIERE, T. DEWAAL, G. MULCAHY, A. ZINTL (2014): Identity of rumen fluke in deer. *Parasitol. Res.* 113, 4097-4103.
- PAVLOVIĆ, I., B. SAVIĆ, S. IVANOVIĆ, D. ČIROVIĆ (2012): First occurrence of *Paramphistomum microbothrium* (Fischöeder 1901) in roe deer (*Capreolus capreolus*) in Serbia. *J. Wildl. Dis.* 48, 520–522.
- SANABRIA, R., G. MORÉ, J. ROMERO (2011): Molecular characterization of the ITS-2 fragment of *Paramphistomum leydeni* (Trematoda: Paramphistomidae). *Vet. Parasitol.* 177, 182–185.
- SANABRIA R.E.F., J.R. ROMERO (2008): Review and update of paramphistomosis. *Helminthologia* 45, str. 64-68.
- SEVERIN K. (2009.): Humoralni imunski odgovor jelena običnog (*Cervus elaphus*) prirodno invadiranog velikim američkim metiljem. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska
- ŠOŠTARIĆ, B., I. VICKOVIĆ, R. RAJKOVIĆ-JANJE, M. PERIŠKIĆ, M. ŠKRIVANKO (2006): Metiljavost ovaca - osvrt na masovna uginuća ovaca u Posavini i Đakovštini - jesen/zima 2005. godine. Osmo savjetovanje uzgajivača ovaca i koza u Republici Hrvatskoj. Zbornik predavanja p. 120-130.
- ŠOŠTARIĆ, B., R. BECK, Ž. MIHALJEVIĆ, I. VICKOVIĆ, J. R. RAJKOVIĆ, S. TERZIĆ (2010): Epizootija paramphistomoze ovaca i goveda u Hrvatskoj 2010. godine. *Vet. Stn.* 141(5), 441-459.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, T. J. GIBSON (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22, 4673-4680.
- TROHAR, J. (2004.): Jelen. U : Lovstvo (Mustapić, Z., ur.). Hrvatski lovački savez, Zagreb, str 43-60.

YAN, H-B., X-Y. WANG, Z-Z. LOU, L. LI, D. BLAIR, Y. HONG, C. JIN-ZHONG, D. XUE-LING, L. MENG-TONG, Z. XING-QUAN, C. XUE-PENG, J. WAN-ZHONG (2013): The Mitochondrial Genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the First Representative for the Family *Paramphistomidae*. PloS ONE 8(8), DOI: 10.1371/journal.pone.0071300.

**Prvi dokaz metilja *Paramphistomum leydeni* i *Paramphistomum cervi*
u jelena običnog u Hrvatskoj**

SAŽETAK

Paramfistomozu domaćih i divljih preživača uzrokuju dikseni metilji iz roda *Paramphistomum* koji kao odrasli primjerci parazitiraju na sluznici predželudaca, te mogu uzrokovati značajne ekonomske gubitke. Iako se smatra da su metilji iz roda *Paramphistomum* prisutni u Hrvatskoj, te su prve epizootije paramfistomoze zabilježene 2006. i 2010. godine na ovcama i govedima, ne postoje znanstveni podatci o pojavnosti kod divljih preživača. Stoga je cilj našega rada bio utvrditi koja vrsta metilja parazitira u jelena običnog (*Cervus elaphus*) na području Hrvatske. Istraživanje je provedeno na ukupno 24 uzorka metilja iz buraga odstrijeljene košute. S obzirom da je razlikovanje metilja na temelju morfoloških osobitosti nedostavno, koristili smo molekularnu analizu ITS2 regije ribosomske DNA. Utvrdili smo kako 22 analizirana uzorka pripadaju vrsti *Paramphistomum leydeni*, dok se jedan uzorak podudara s *Paramphistomum cervi*. Naši rezultati ne isključuju prisutnost i drugih vrsta, no ovo je prva molekularna identifikacija vrsta iz roda *Paramphistomum* u Hrvatskoj. Važno bi bilo provesti sustavno istraživanje rasprostranjenosti i učestalosti paramfistomoze i kod divljih i domaćih preživača u Hrvatskoj, zbog moguće sve važnije uloge ovog parazita.

Ključne riječi: jelen obični, *Cervus elaphus*, *Paramphistomum leydeni*, *Paramphistomum cervi*, ITS2

MARINA ŠPEHAR

**First evidence of *Paramphistomum leydeni* and *Paramphistomum cervi* flukes
in red deer in Croatia**

SUMMARY

Paramphistomosis of domestic and wild ruminants is caused by ruminal flukes from genus *Paramphistomum* that parasites in fore stomachs and cause major economic losses. Even though it is considered that flukes from *Paramphistomum* genus are present in Croatia and the first epizootiology data was registered in 2006 and 2010 on sheep and cattle, there are no scientific data about the appearance of *Paramphistomum* flukes in wild ruminants. The goal of our work was to determine the exact species of flukes which parasite in red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. Research was conducted on 24 samples which were found in the rumen of a hunted doe. Considering the fact that differentiation of species based on morphological characteristics is insufficient, we used the molecular analysis of ITS2 region of ribosomal DNA. We have determined that 22 samples are concurring with genetic material of *Paramphistomum leydeni*, while only one sample concurred with *Paramphistomum cervi*. Our results do not exclude the presence of other species, but this is the first identification of species from *Paramphistomum* genus in Croatia. It would be important to conduct a systematic research of distribution and prevalence of paramphistomosis both in wild and domestic ruminants considering the rising importance of this parasite.

Key words: red deer, *Cervus elaphus*, *Paramphistomum leydeni*, *Paramphistomum cervi*, ITS2

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5. prosinca 1993. godine u Karlovcu. Osnovnu školu pohađam na Plitvičkim Jezerima. Godine 2012. završila sam XVI. gimnaziju u Zagrebu, smjer jezična gimnazija. Iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Osim teoretske nastave, tijekom studija pohađam i praktične dijelove nastave iz područja velike i male prakse. Koautorica sam dva studentska znanstvena rada iz područja parazitarnih bolesti divljih životinja, te je rad pod naslovom „Usporedba pouzdanosti molekularnih i morfoloških metoda identifikacije crijevnih parazita čaglja“ 2017. godine nagrađen Rektorovom nagradom. Koautorica sam dva znanstvena rada objavljena u časopisima indeksiranim u Current contents bazi i koautorica sam na dva kongresna priopćenja objavljenih u zborniku sažetka. Služim se engleskim i talijanskim jezikom u govoru i pismu, te francuskim jezikom na osnovnoj razini.