

HRVATSKA AKADEMIJA
ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti

Odbor za animalnu i komparativnu patologiju



Simpozij

**PARAZITARNE ZOONOZE I TEŠKI METALI
U KOPNENIH I MORSKIH PREDATORA**

**Parasitic zoonoses and heavy metals
in terrestrial and marine predators**

SAŽETCI
Abstracts

palača Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Zrinski trg 11, Zagreb

Zagreb, 20. svibnja 2013.

Znanstveni odbor

Redoviti članovi
Razreda za medicinske znanosti
Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti

Slavko Cvetnić, Ivo Čikeš, Dragan Dekaris, Vida Demarin,
Vladimir Goldner, Drago Ikić, Ivica Kostović, Zvonko Kusić,
Josip Madić, Davor Miličić, Marko Pećina, Ivan Prpić,
Željko Reiner, Daniel Rukavina, Marko Šarić,
Zdenko Škrabalo, Eugen Topolnik, Teodor Wikerhauser

Organizacijski odbor

Slavko Cvetnić, Željko Cvetnić,
Đuro Huber, Mirko Lojkić, Josip Madić,
Eugen Topolnik, Teodor Wikerhauser

Organizator

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti

Odbor za animalnu i komparativnu patologiju

HRVATSKA AKADEMIJA
ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti

Odbor za animalnu i komparativnu patologiju



Simpozij

**PARAZITARNE ZOONOZE I TEŠKI METALI
U KOPNENIH I MORSKIH PREDATORA**

**Parasitic zoonoses and heavy metals
in terrestrial and marine predators**

SAŽETCI
Abstracts

palača Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Zrinski trg 11, Zagreb

Zagreb, 20. svibnja 2013.

PROGRAM

10,00 – 10,10

Uvodna riječ (Introductory word)

akademik Zvonko Kusić, predsjednik Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti

Predsjedatelj Teodor Wikerhauser

10,10 – 10,40

Cirkulacija nametnika u velikih predatora i uloga čovjeka u njihovu ciklusu

Circulation of parasites in large carnivores and the role of humans in their cycles
Đuro Huber (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

10,40 – 10,55

Visceralna lišmanioza u sivog vuka (*Canis lupus*) u Hrvatskoj

Visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) in Croatia

Ana Beck, Relja Beck, Josip Kusak, Andrea Gudan-Kurilj, Franjo Martinković, Branka Artuković, Marko Hohšteter, Đuro Huber, Albert Marinculić, Željko Grabarević (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Hrvatski veterinarski institut, Zagreb)

10,55 – 11,10

Occurrence of *Baylisascaris transfuga* and other gastrointestinal parasites and first report of *Giardia* spp. in population of European brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia

Pojavljivanje *Baylisascaris transfuga* i drugih želučano-crijevnih nametnika te prvi nalaz *Giardia* spp. u populaciji europskog smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) u Hrvatskoj

Mahdis Aghazadeh, **Jocelyn Elson-Riggins**, Slaven Reljić, Marco De Ambrogi, Đuro Huber, Dario Majnarić, Carlos Hermosilla
(The Royal Veterinary College, The University of London, UK; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Hrvatske šume, Ured Delnice)

11,10 – 11,25

Trihineloza u vukova iz Hrvatske

Trichinellosis in wolves from Croatia

Relja Beck, Ana Beck, Josip Kusak, Željko Mihaljević, Snježana Lučinger, Tatjana Živičnjak, Đuro Huber, Andrea Gudan-Kurilj, Albert Marinculić
(Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

11,25 – 11,45 *Rasprava – Discussion*

11,45 – 12,15 *Odmor – Coffee break*

Predsjedava Josip Madić

12,15 – 12,30

**Preliminarno istraživanje raznolikosti i distribucije pripadnika roda
Anisakis spp. u morskih sisavaca Jadrana**

Preliminary study of the variety and distribution of zoonotic genus *Anisakis* spp. in sea mammals of the Adriatic Sea

Kristina Blažeković, Ivana Lepen Pleić, Tomislav Gomerčić, Martina Đuras, Ivona Mladineo (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split)

12,30 – 12,45

Parazitarne zoonoze lisice (*Vulpes vulpes*) u Sloveniji

Parasitic zoonosis in fox (*Vulpes vulpes*) in Slovenia

Aleksandra Vergles Rataj (University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Slovenia)

12,45 – 13,00

**Koncentracije toksičnih elemenata u tri vrste dupina nasukanih u
istočnom Jadranskom moru**

Toxic element concentrations in three dolphins species stranded in the Eastern Adriatic Sea

Nina Bilandžić, Maja Đokić, Marija Sedak, Martina Đuras, Tomislav Gomerčić (Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

13,00 – 13,15

Toksični metali u kopnenih zvijeri

Toxic metals in terrestrial carnivores

Maja Vihnanek Lazarus, Ankica Sekovanić, Slaven Reljić, Josip Kusak, Đuro Huber, Jasna Jurasović (Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb; Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

13,15 – 13,45 *Rasprava – Discussion*

CIRKULACIJA NAMETNIKA U VELIKIH PREDATORA I ULOGA ČOVJEKA U NJIHOVU CIKLUSU

Đuro Huber

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-mail: huber@vef.hr

Sustav nosilac – parazit jedan je od evolucijski razvijenih mehanizama koji podržava cjelokupnu ravnotežu ekosustava. Međuvrni odnosi djeluju povratnom spregom („feed back reaction“) što dovodi do porasta pritiska na vrstu čija populacija lokalno raste. Kompeticijski odnosi među vrstama nametnika na istom nosiocu čine sustav složenijim i regulacijski učinkovitijim. Populacije predatora, iako su na vrhu prehrambene piramide, ipak su regulirane obilnošću svojih plijenskih vrsta, ali i vlastitim nametnicima. Hraneći se svojim žrtvama predator omogućuje brojnim nametničkim vrstama zatvaranje životnog ciklusa. Time se opisanoj složenosti sustava dodaje i prilog općoj biološkoj raznolikosti. Smatra se da nosilac u kategoriji predatora omogućava opstanak više od 20 nametničkih vrsta, odnosno izumiranje jedne vrste nosioca dovelo bi do nestanka barem toliko nametničkih vrsta. Problemi s nametnicima javljaju se uplitanjem čovjeka. Poticanjem rasta populacije neke vrste nosilaca (predatora u ovom slučaju) ili samo njihovom koncentracijom u pojedinim dijelovima staništa (npr. hranilišta za medvjede) stvaraju se uvjeti olakšanog zatvaranja ciklusa nametnika i posljedičnog rasta njihove populacije, odnosno opterećenosti nosioca (jačina invazije). Intenzitet invazije može se povećati i porastom populacije paralelnog nosioca (npr. pasa u staništu vuka), ili pak oslabljenošću imunološkog otpora (npr. zbog genetske srodnosti izolirane populacije predatora). U prirodnim odnosima to bi se reguliralo smanjenjem populacije, u ovom slučaju predatora, do razine u kojoj bi sustav nosilac – parazit ponovo postao stabilan. Neovisna je tema kad se i čovjek sa svojim tijelom uključi u ciklus nekih nametnika koje dijelimo s predatorima. U pravilu je to slijepa ulica za nametnika kada se radi o zatvaranju ciklusa putem konzumiranja razvojnih stadija nametnika iz prethodnog nosioca (npr. trihinelozu ili ehinokokoza). Važno je razumijeti okolnosti pod kojima se čovjek uključuje u ciklus nametnika, te poduzimati mjere da se to spriječi. Neki primjeri analizirani su suvremenim metodama i bit će opisani u ostalim predavanjima ovog simpozija.

Circulation of parasites in large carnivores and the role of humans in their cycles

Duro Huber

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-mail: huber@vef.hr

The host – parasite system is an evolutionary developed mechanism that supports the overall balance of the ecosystem. It functions like other interspecies relations via feedback; meaning that the pressure on certain species increases when its local population grows. Competitive interactions among certain parasite species within the same host make the whole system increasingly complex but also more efficient in regulatory function. Predator populations, though at the top of the food chain, are mostly regulated through the abundance of their prey species as well as by their own parasites. Predators, by feeding on the bodies of their prey, allow numerous parasitic species to complete their life cycles. This complexity also contributes to general biodiversity. It is generally considered that one host species in the predator category enables the survival of a minimum of 20 parasite species. Hence, if one such host species becomes extinct, the net biodiversity loss would be at least 20-fold larger than is initially apparent. Parasites may however become problematic under human influence. Typically, by stimulation of population growth of one host species (predators in this example), or the mere concentration of them at certain locations (such as at bear feeding sites), the conditions for eased parasite cycle-completion are created. This results in parasite population growth, i.e. increased parasite burden. The intensity of infestation may also increase if there is an increase in the population of the parallel host (e.g. dogs in the wolf range), or a decrease in the host immunological response (e.g. due to low genetic diversity of an isolated predator population). In natural conditions, this would be self regulated by the decrease in host numbers, in our case the predator population, to the level where the host – parasite system would become stable again. Humans may also become part of the life cycles of certain parasites. As a rule this is a dead end for the parasite, for instance in the case of trichinellosis or echinococcosis. Despite the fact that such situations are medical issues, it is very important for ecologists to understand how people may become part of parasite life cycles and to determine ways to prevent this. Certain examples analyzed by contemporary methods will be presented in the lectures of this symposium.

VISCERALNA LIŠMANIOZA U SIVOG VUKA (*CANIS LUPUS*) U HRVATSKOJ

Ana Beck¹, Relja Beck², Josip Kusak¹, Andrea Gudan-Kurilj¹,
Franjo Martinković¹, Branka Artuković¹, Marko Hohšteter¹, Đuro Huber¹,
Albert Marinculić¹, Željko Grabarević¹

¹Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

²Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu

E-mail: ana.beck@vef.hr

Južna staništa sivog vuka (*Canis lupus*) u Hrvatskoj nalaze se u središnjim i južnim dijelovima Dalmacije. To područje je prepoznato kao endemska zona pasje visceralne lišmanioze, uzrokovane vrstom *Leishmania infantum*. U studenom 2003. nađen je uginuli vuk u dobi od četiri godine uz sjeverozapadnu granicu tog endemskog područja. Patološke i parazitološke analize upućivale su na promjene karakteristične za infekciju vrstom *Leishmania infantum*, što je bilo potvrđeno lančanom reakcijom polimerazom. U ovom se slučaju radilo o tipičnoj visceralnoj lišmaniozi koja se obično opisuje u pasa. To je prvi objavljeni slučaj uginuća vuka izazvan lezijama prouzročenim vrstom *L. infantum*.

Visceral leishmaniosis in a gray wolf (*Canis lupus*) in Croatia

Ana Beck, Relja Beck, Josip Kusak, Andrea Gudan-Kurilj,
Franjo Martinković, Branka Artuković, Marko Hohšteter, Đuro Huber,
Albert Marinculić, Željko Grabarević

E-mail: ana.beck@vef.hr

The southern habitats of Croatia's gray wolf (*Canis lupus*) population are found in central and southern parts of Dalmatia. This region is recognized as an endemic region for canine visceral leishmaniosis, caused by *Leishmania infantum*. In November 2003, a 4-yr-old male gray wolf was found dead in the northwestern border of this endemic region. Pathologic and parasitologic analysis, confirmed by polymerase chain reaction, indicated that lesions associated with infection by *Leishmania infantum* are, in this case, typical for visceral leishmaniosis commonly described in dogs. Review of the literature suggests that this is the first reported case of gray wolf death due to lesions caused by *L. infantum*.

**OCCURRENCE OF *BAYLISASCARIS TRANSFUGA* AND OTHER
GASTROINTESTINAL PARASITES AND FIRST REPORT OF *GIARDIA*
SPP. IN POPULATION OF EUROPEAN BROWN BEARS
(*URSUS ARCTOS*) IN CROATIA**

Mahdis Aghazadeh¹, **Jocelyn Elson-Riggins¹**, Slaven Reljić²,
Marco De Ambrogi¹, Đuro Huber², Dario Majnarić³, Carlos Hermosilla¹

¹The Royal Veterinary College, The University of London, UK

²Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³Hrvatske šume, Delnice

E-mail: jriggins@rvc.ac.uk

The European brown bear (*Ursus arctos*) is a species present in limited areas of Europe and several small populations are considered endangered. This species can be affected by a range of parasites. The presence and prevalence of the gastrointestinal parasites of wild European brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia were investigated. Ninety four wild bear faecal samples were collected from the ground in different areas of Primorje-Gorski Kotar county, Karlovac county and Senj-Lika county and examined for the presence of gastrointestinal parasites. At least six genera including the nematodes *Baylisascaris* spp., *Ancylostoma* spp. and *Syngamus* spp., and the protozoan enteropathogens *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. were found. However, neither cestode- nor trematode/acanthocephala-eggs were found.

Our preliminary results emphasize the presence of *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Baylisascaris transfuga*, and *Ancylostoma* spp. amongst wild bears in Croatia and highlight the potential risk for transmission of these zoonotic infections, not only for humans, but also for domestic animals in this geographic region. This is the first report of *Giardia* in bears from Croatia.

The genus *Baylisascaris* is an emerging parasite of wild animals which can cause severe larva migrans syndrome in aberrant hosts, which include 100 species of birds, mammals and also humans. *Baylisascaris transfuga* is the species reported from bears, and with the exception of a few laboratory trials, little is known about the capacity of this species to infect other animals. Furthermore, the identification of this species has traditionally been based on light microscopy, using either morphology of the adults at necropsy or detection of the eggs in faeces, which are methods limited by the experience and the efforts of the observer. The current work was aimed at developing a specific PCR to detect the parasite directly from faecal samples of naturally infected brown bears in the field, without the need for previous flotation. Using eggs and adults of *B. transfuga* collected in Croatia, we developed a PCR test to detect

a portion of the second internal transcribed spacer region (ITS-2) of ribosomal DNA. We then applied it to bear faecal samples spiked with a known number of *B. transfuga* eggs. We show here for the first time that this method allows the detection of a minimum of two *B. transfuga* eggs in 25 mg of faecal material, thus it demonstrates a high diagnostic capacity that could be applied to evaluate the prevalence of the parasite in faecal samples from wild populations of brown bears.

Pojavljivanje *Baylisascaris transfuga* i drugih želučano-crijevnih nametnika, te prvi nalaz *Giardia* spp. u populaciji europskog smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*) u Hrvatskoj

Mahdis Aghazadeh, Jocelyn Elson-Riggins, Slaven Reljić,
Marco De Ambrogì, Đuro Huber, Dario Majnarić, Carlos Hermosilla

E-mail: jriggins@rvc.ac.uk

Europski smeđi medvjed (*Ursus arctos*) je vrsta ograničeno prisutna u Europi, a nekoliko malih populacija se smatra ugroženima. Vrsta može biti zahvaćena nizom nametnika. Istražili smo prisutnost i učestalost želučano-crijevnih nametnika u slobodne populacije medvjeda u Hrvatskoj. Prikupljena su i pregledana 94 uzorka izmeta medvjeda s različitih područja Primorsko-goranske, Karlovačke i Ličko-senjske županije. Ustanovljena su tri roda nematoda: *Baylisascaris* spp., *Ancylostoma* spp. i *Syngamus* spp. te tri roda enteropatogenih protozoa: *Eimeria* spp., *Cryptosporidium* spp. i *Giardia* spp. Nisu nađena jaja cestoda, trematoda niti akantocofala. Naši rezultati upozoravaju na prisutnost *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp., *Baylisascaris transfuga* i *Ancylostoma* spp. u slobodnih medvjeda u Hrvatskoj i potencijalnu opasnost njihova prenošenja na ljude i domaće životinje. Ovo je prvi nalaz infekcije rodom *Giardia* sp. u medvjeda u Hrvatskoj

Rod *Baylisascaris* je parazit divljih životinja koji može izazvati teški sindrom migrirajuće ličinke (larva migrans) u netipičnim nosiocima, odnosno u približno 100 vrsta ptica i sisavaca uključujući i ljude. Vrsta *Baylisascaris transfuga* opisana je u medvjeda, a osim laboratorijskih pokusa, malo je poznato o njezinoj sposobnosti da zarazi druge nositelje. Ta se vrsta tradicionalno mogla identificirati mikroskopskom pretragom ili na osnovi makroskopske građe odraslih nametnika nađenih pri razudbi ili jajašaca iz izmeta. Te metode su vremenski vrlo zahtjevne, a za njihovu izvedbu traži se iskustvo laboratorijskog osoblja. U ovom je radu opisana specifična lančana reakcija polimerazom za dokaz parazita izravno u uzorku materijala prirodno invadiranih medvjeda bez potrebe za prethodnu flotaciju. Upotrebom jajašaca i adulta vrste *B. transfuga* prikupljenih u Hrvatskoj prvo smo razvili PCR za dokaz „internal transcribed spacer“ (ITS-2) područja

ribosomske DNA, a potom je primijenili za pretragu uzoraka medvjedeg izmeta obogaćenog poznatim brojem jajašaca vrste *B. transfuga*. Razvijena metoda omogućava dokazivanje minimalno dva *Baylisascaris* jajašca u 25 mg fekalnog materijala, a to otvara velike dijagnostičke mogućnosti za procjenu učestalosti nametnika u populaciji slobodnih medvjeda.

TRIHINELOZA U VUKOVA IZ HRVATSKE

Relja Beck¹, Ana Beck², Josip Kusak², Željko Mihaljević¹, Snježana Lučinger²,
Tatjana Živičnjak¹, Đuro Huber², Andrea Gudan-Kurilj², Albert Marinculić²

¹Hrvatsko veterinarski institut u Zagrebu

²Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

relja.beck@gmail.com

Cilj je bio istražiti proširenost invazije trihinelom u vukova (*Canis lupus*) na 17 468 km² njihove rasprostranjenosti u Hrvatskoj. Uzorci mišićja prikupljeni su od 67 vukova u razdoblju od 1996. do 2007. i analizirani metodom umjetne probave. Ličinke u mišićima nađene su u 21 vuka (31%) i genotipizirane su metodom multiplex PCR. *Trichinella britovi* je bila dominirajuća vrsta potvrđena u 90% (19 vukova) dok je *Trichinella spiralis* utvrđena u 9% (2 vuka). Nalaz tzv. „domaće“ vrste trihinele bio je iznenađujući, jer je u tom području u divljih životinja do danas bila zabilježena jedino *T. britovi*. Opterećenje ličinkama u zaraženih životinja kretalo se u rasponu od 0,3 do 45,9 ličinki po gramu mišićja. Pojavljivanje zaraženih životinja razlikovalo se po istraživanim regijama. U Gorskom kotaru učestalost je bila 20%, a stanište tog područja je dosta slično staništu u Lici gdje su skoro svi vukovi bili zaraženi. Zanimljivo je da su zabilježeni i prvi pozitivni vukovi u Dalmaciji.

Trichinellosis in wolves from Croatia

Relja Beck, Ana Beck, Josip Kusak, Željko Mihaljević, Snježana Lučinger,
Tatjana Živičnjak, Đuro Huber, Andrea Gudan, Albert Marinculić

relja.beck@gmail.com

The aim of the present study was to investigate the prevalence of *Trichinella* infection in wolves (*Canis lupus*) in a 17,468 km² area in Croatia. Muscle samples were collected from 67 wolves between 1996 and 2007 and analyzed by artificial digestion. Muscle larvae were detected in 21 wolves (31%) and genotyped by multiplex PCR. *Trichinella britovi* was the predominant species confirmed in 90% (19 wolves) while *Trichinella spiralis* was detected in 9% (2 wolves). The presence of the so called “domestic” *Trichinella* species was a surprise since, to date only *T. britovi* had been reported in wild animals in this region. The larval burdens in infected animals ranged from 0.3 to 45.9 larvae per gram. The prevalence of infected animals varied by geographic region. Infected animals were found in the region of Gorski Kotar (20%) which has very similar environment to the region of Lika, where almost all wolves were found infected. Interestingly, this is the first report of infected wolves in Dalmatia.

PRELIMINARNO ISTRAŽIVANJE RAZNOLIKOSTI I DISTRIBUCIJE PRIPADNIKA ZOONOTIČNOG RODA *ANISAKIS* SPP. U MORSKIH SISAVACA JADRANA

Kristina Blažeković¹, Ivana Lepen Pleić², Tomislav Gomerčić¹, Martina Đuras¹,
Ivona Mladineo²

¹Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

²Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu

E-mail: mladineo@izor.hr

Osnovni cilj istraživanja bio je utvrditi vrijednosti populacijske dinamike oblića *Anisakis* spp. (prevalencija, abundancija, intenzitet) u njegovim krajnjim domaćinima u hrvatskom dijelu Jadranskog mora; morskim sisavcima krupnozubom kitu (*Ziphius cavirostris*), glavatom dupinu (*Grampus griseus*), plavobijelom dupinu (*Stenella coeruloealba*) i dobrom dupinu (*Tursiops truncatus*). Ujedno, cilj je bio identificirati vrste roda *Anisakis* molekularnim metodama, s obzirom da se morfološka identifikacija može izvesti samo do razine roda. U tu svrhu korišteni su arhivirani i svježi uzorci probavila dupina, prikupljeni u razdoblju od listopada 1990. do travnja 2012. godine u okviru projekta Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu).

Prevalencija oblića u uginulim kitovima zubanima (n=181) iznosila je 28,73% (95% interval pouzdanosti od 22,5% do 35,9%), odnosno 31,90% (95% interval pouzdanosti od 25,1% do 39,5%) kada se oduzmu iz uzorka mladi kitovi u dobi do godinu dana. Srednja abundancija oblića u 163 domaćina te vrste iznosila je 1209,96 jedinki oblića, s granicama intervala pouzdanosti 95% utvrđenim „bootstrap“ metodom replika od 510,4 do 2764,9, dok je srednji intenzitet oblića iznosio 3781,13 uz 95% interval pouzdanosti od 1778,9 do 7128,4. Usporedbom očekivanih frekvencija teoretskog modela negativne binomne razdiobe sa stvarnim frekvencijama podataka, uz korištenje metode najveće vjerojatnosti (maximum likelihood), nije utvrđeno značajno odstupanje ($\chi^2=24.6769$, $p>0,05$), što znači da *Anisakis* spp. pokazuje očekivanu negativnu binomnu razdiobu u populaciji domaćina. Prevalencija oblića *Anisakis* spp. u dobrim dupina (bez jedinki do godine dana) iznosila je 26,92% (95% interval pouzdanosti od 19,94% do 35,34 %), a u plavobijelih dupina 52% (95% interval pouzdanosti od 31,71% do 70,41%), što upućuje na statistički značajne razlike u prevalencijama između različitih domaćina.

Amplifikacijom fragmenta lokusa citokrom oksidaze 2 mitohondrijske DNK (~600 bp) ukupno 165 jedinki oblića, izoliranog iz četiri vrste krajnjeg

domaćina, filogenetskom analizom je utvrđena prisutnost najmanje tri vrste pripadnika roda *Anisakis* u Jadranu: *A. pegreffii* (96,73%), *A. physeteris* (1,31%) i *A. simplex* (1,96%). Analizom sastava vrsta oblića s obzirom na vrstu domaćina, utvrđena je mješovita 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%). Analizom genetske strukture populacije najzastupljenije vrste *A. pegreffii* (n=148) utvrđeno je 47 polimorfni mjesta u amplificiranom fragmentu, odnosno 38 haplotipova, od kojih je najveći postotak (66%) pripadao jedinstvenim haplotipovima (25) zastupljenim s jednom jedinkom. Računanjem genetskih indeksa raznolikosti dobivena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0,6360 +/- 0,0471, te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0,004520 +/- 0,002706, što upućuje na nedavno usko grlo populacije i naglu posljedičnu ekspanziju.

Ovi preliminarni rezultati istraživanja upućuju na iznimnu raznolikost i široku rasprostranjenost vrsta roda *Anisakis* što se kosi s našim dosadašnjim spoznajama za Jadran, ali ukazuju i na potrebu sustavnog i ciljanog istraživanja ovog zoonotičnog nametnika u njegovom krajnjem domaćinu.

Preliminary study of the variety and distribution of zoonotic genus *Anisakis* spp. in sea mammals of the Adriatic Sea

Kristina Blažeković, Ivana Lepen Pleić, Tomislav Gomerčić, Martina Đuras,
Ivona Mladineo

E-mail: mladineo@izor.hr

The main goal was to determine population dynamics (prevalence, abundance, intensity) of nematode *Anisakis* spp. in the sea mammals as final hosts in the Croatian part of the Adriatic Sea: Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*), Risso's dolphin (*Grampus griseus*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). The goal was also to identify the species within the genus *Anisakis* by use of molecular methods, because the morphology allows only genus level identification. We used the archived and fresh samples of dolphin digestive tracts collected in the period from October 1990 till April 2012 within the project Health and Biology of Sea Mammal Populations in the Adriatic at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Zagreb.

The prevalence found in all dead Odontoceti dolphins (n=181) was 28.73% (95% confidence interval from 22.5% to 35.9%), or for dolphins of age more than one year only it was 31.90% (95% confidence interval 25.1% - 39.5%). Mean abundance in 163 positive hosts was 1209.96 individual worms with confidence interval 95% as determined by bootstrap method replica 510.4 – 2764.9, while the mean worm intensity was 3781.13 with 95% confidence interval 1778.9 – 7128.4. Comparing expected frequencies of theoretical model of negative binominal distribution with real data frequencies and use of maximum likelihood method, no significant deviation was found ($\chi^2=24.6769$, $p>0.05$), meaning that *Anisakis* spp. exhibits the expected negative binomial distribution within the population of hosts. Prevalence of nematode *Anisakis* spp. in bottlenose dolphins (without individuals bellow the age of 1 year) was 26.92% (95% confidence interval 19.94% - 35.34 %) and in striped dolphins 52% (95% confidence interval 31.71% - 70.41%), indicating statistically significant differences among different hosts.

Amplification of a fragment of locus of cytochrom oxidase 2 mitochondrial DNA (~600 bp) of a total of 165 individual nematodes isolated from four final hosts, phylogenetic analyses revealed the presence of a minimum of three species of the genus *Anisakis* in the Adriatic: *A. pegreffii* (96.73%), *A. physeteris* (1.31%) and *A. simplex* (1.96%). Analyses of nematode species in relation of the host species showed mixed infections in bottlenose dolphins (*A. pegreffii* 97.44% and *A. simplex* 2.56%), striped dolphins (*A. pegreffii* 97.62% and *A. simplex* 2.38%) and in Cuvier's beaked whale (*A. pegreffii* 75% and *A. physeteris* 25%), while Risso's dolphin were hosting only one species (*A. pegreffii* 100%). Genetic structure of the most frequent species *A. pegreffii* (n=148) 47 polymorphic sites were determined in the amplified fragment, or 38 haplotypes, with the highest percentage (66%) belonging to the unique haplotypes (25) represented by one individual. Calculation of genetic diversity indices gave the high total diversity of haplotypes (h) 0.6360 +/- 0.0471, and low value of nucleotide diversity (π) 0.004520 +/- 0.002706, suggesting recent bottleneck of population and fast consequent expansion.

Our preliminary results suggest exceptional diversity and broad distribution of species within the genus *Anisakis* what is contrary to previous knowledge for the Adriatic, but invites for systematic and targeted research of this zoonotic parasite in its final host.

PARAZITARNE ZOONOZE LISICE (*VULPES VULPES*) U SLOVENIJI

Aleksandra Vergles Rataj

Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Slovenia

E-mail: Aleksandra.VerglesRataj@vf.uni-lj.si

Echinococcus multilocularis je trakavica koja je manja od trakavice *E. granulosus* i njezina dužina iznosi 1,2 do 3,7 mm. U odraslom strobilarnom obliku, parazitira u tankom crijevu lisice (*Vulpes vulpes*), kao glavnom nositelju. Nalazi se i u pasa pa čak i mačaka, što predstavlja neugodnu činjenicu, jer se lisice sve više približavaju čovjekovom naselju, kućnim ljubimcima, a time i čovjeku, koji također može biti nosioc larvalnog oblika trakavice, alveolarnog ehinokoka. U našem znanstvenom radu godine 2008. promatrali smo endoparazitsku faunu lisica u Sloveniji. Pregledali smo 428 crijeva lisica ispiranjem sadržaja kroz različita sita i našli smo široku paletu parazita: trematoda, nematoda, cestoda, čak protozoa, jednog acanthocephala i nešto ektoparazita više vezanih na mikromamalia. Ukupno 11 lisica (2,57%) bilo je pozitivno na *Echinococcus multilocularis*. Ovo je bilo prvi put, da smo utvrdili odrasle male trakavice u Sloveniji. Razvojni oblik je bio već prije utvrđen kod šumskog glodavca *Apodemus flavicollis* (Brglez, Kryštufek, 1984).

Parasitic zoonosis in fox (*Vulpes vulpes*) in Slovenia

Aleksandra Vergles Rataj

E-mail: Aleksandra.VerglesRataj@vf.uni-lj.si

Echinococcus multilocularis is the tapeworm even smaller than *E. granulosus* with length 1.2 to 3.7 mm. Adult strobilus form parasites in the small intestine of fox (*Vulpes vulpes*) as the main host, but can be found in dogs and even cats. That is unpleasant fact as foxes do get increasingly closer to humans, their pets and hence to humans as well, who can be hosts of the larval alveolar form echinococcus. In our scientific research in 2008 we studied the endoparasite fauna of foxes in Slovenia. We studied intestines of 428 foxes by washing the content through a series of sieves and found a broad spectrum of parasites: trematodes, nematodes, cestodes, even protozoa, one acanthocephala and a few ectoparasites related to preyed micromammalia. In total 11 foxes (2.57%) were positive to *Echinococcus multilocularis*. This was the first time that adult tapeworms of this species were found in Slovenia. Larval stages were found previously in the forest rodents *Apodemus flavicollis* (Brglez, Kryštufek, 1984).

KONCENTRACIJE TOKSIČNIH ELEMENATA U TRI VRSTE DUPINA NASUKANIH U ISTOČNOM JADRANSKOM MORU

Nina Bilandžić¹, Maja Đokić¹, Marija Sedak¹, Martina Đuras²,
Tomislav Gomerčić²

¹Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu

²Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-mail: bilandzic@veinst.hr

Toksični elementi: arsen (As), kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg) široko su rasprostranjeni u okolišu i ulaze u morske sisavce na više različitih načina: putem atmosfere kroz pluća, apsorpcijom kroz kožu, preko placente prije poroda, mlijekom za vrijeme laktacije, gutanjem morske vode i, najviše, uzimanjem hrane. Zagađivanjem mora ti elementi mogu doseći visoke koncentracije u organima i tkivima morskih sisavaca kao vršnih predatora. Kitove se općenito smatra kao poveznike okolišnih zagađivala poput metala zbog njihovog dugog života i visokog položaja u prehrambenoj mreži.

Raspored toksičnih elementa u različitim organima i tkivima dupina uvelike je istraživan posljednjih desetljeća. Pokazalo se da je raznolikost razina tragova metalnih elemenata među vrstama kitova i u morskim staništima posljedica prehrambenih izvora, fiziološkog stanja jedinki i toksikološke dinamike pojedinog metala. Budući da su i Cd i Hg egzogeni i štetni elementi koji se kumuliraju tijekom rasta, visoke koncentracije u jetri su povezane s ulogom jetre u uklanjanju tih elemenata iz krvotoka demetilacijom i bio-transformacijom.

U Jadranskom moru ili u Mediteranskom bazenu stalno je prisutno nekoliko vrsta kitova uključujući dobrog (*Tursiops truncatus*), plavobijelog (*Stenella coeruleoalba*) i glavatog dupina (*Grampus griseus*). Dobri dupin je jedina vrsta stalno prisutna u regiji. Plavobijeli dupini povremeno dolaze do sjevernog Jadrana i duž obala Hrvatske. Nalazi glavatog dupina upućuju na zaključak da se on povremeno pojavljivao u Jadranu. Niske razine toksičnih metala su utvrđene u dobrim, plavobijelim i glavatim dupina nađenim duž Jadranske obale. Istraženi su odnosi njihovih koncentracija u različitim vrstama i različitim tkivima, te uspoređeni s objavljenim studijama o dupinima iz Mediteranskog i Jadranskog mora.

Toxic element concentrations in three dolphins species stranded in Eastern Adriatic Sea

Nina Bilandžić, Maja Đokić, Marija Sedak, Martina Đuras,
Tomislav Gomerčić

E-mail: bilandzic@veinst.hr

The toxic elements, arsenic (As), cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg) are widely dispersed in the environment and enter marine mammals through several different routes: atmospheric uptake via the lungs, absorption through the skin, across the placenta before birth, through milk lactation, and ingestion of sea water; however, the major route of ingestion is diet. The result of marine pollution is that these elements can reach high concentrations in the organs and tissues of marine mammals as top predators. Cetaceans are generally considered integrators of environmental pollutants such as metals due to their longevity and their elevated position in marine food webs.

In recent decades, considerable research has looked at the distribution of toxic elements in different organs and tissues of dolphins. The variability in trace metal levels among cetacean species and marine habitats was shown to be due to food sources, the physiological state of the individual and the toxicological dynamics of the specific metal. As both Cd and Hg are exogenous and harmful elements that accumulate during growth, high hepatic concentrations of these elements are related to the role played by the liver in terms of removing of these elements from the bloodstream, demethylation and bio-transformation. Several cetacean species, including the bottlenose (*Tursiops truncatus*), striped (*Stenella coeruleoalba*) and Risso's (*Grampus griseus*) dolphins, have been reported in the Adriatic Sea and are regularly present in the Mediterranean basin. The bottlenose dolphin is the only cetacean species that can be considered to occur regularly in the region. Striped dolphins are rare and may occasionally wander into the northern Adriatic and along the entire Croatian coastline. Surveillance of Risso's dolphin suggested that it has been always accidental and that the species presently occurs occasionally in the Adriatic Sea. Trace levels of toxic metals were determined in bottlenose, striped and Risso's dolphins accidentally caught or found dead along the Adriatic coastline. The relationships between their concentrations in different tissues and species were examined and compared to studies reported in the literature on dolphins from the Mediterranean and Adriatic Seas.

TOKSIČNI METALI U VELIKIH KOPNENIH ZVIJERI HRVATSKE

**Maja Vihnanek Lazarus¹, Ankica Sekovanić¹, Slaven Reljić², Josip Kusak²,
Đuro Huber², Jasna Jurasović¹**

¹Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu

²Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

E-mail: mlazarus@imi.hr

Medvjed i vuk velike su kopnene zvijeri, a njihov položaj na vrhu hranidbene mreže znači i potencijalno visok unos toksičnih metala. Glavni izvor unosa toksičnih metala je hrana: za medvjeda većinom biljnog podrijetla, a za vuka životinjskog podrijetla. Stoga sadržaj toksičnih metala u njihovim tkivima odražava razine metala u okolišu. Toksični metali kao kadmij (Cd), olovo (Pb) i živa (Hg) nakupljaju se u organizmu i iz njega slabo izlučuju. Time se, ovisno o prisutnim razinama, stvara mogućnost njihovog štetnog djelovanja na zdravlje, kako same životinje, tako i čovjeka koji meso, primjerice medvjeda, koristi kao hranu. U dostupnoj literaturi nema podataka o sustavnom praćenju toksičnih metala (niti drugih elemenata) u dinarskoj populaciji velikih zvijeri, osim izvještaja na malom broju jedinki.

Ovo istraživanje imalo je za cilj izmjeriti razine Cd, Pb i Hg u tkivima (mišićju, jetri i kori bubrega) 136 smeđih medvjeda i 40 sivih vukova odstrijeljenih (prema nacionalnom Planu gospodarenja smeđim medvjedom te Planu upravljanja vukom) ili na druge načine stradalih tijekom 2009. i 2010. godine na području Gorskog kotara, Like i Dalmacije. Metali u tkivima izmjereni su tehnikom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme (ICP-MS) nakon visokotlačne mikrovalne razgradnje.

Nađene su sljedeće razine Cd, Pb i Hg u tkivima medvjeda (medijan; µg/g mokre težine tkiva): mišić 0,008, 0,007 i 0,002, jetra 1,09, 0,496 i 0,031, bubreg 16,5, 1,12 i 0,206 te u tkivima vuka: mišić 0,0003, 0,004 i 0,003, jetra 0,055, 0,107 i 0,016, bubreg 0,182, 0,088 i 0,034. Kod vuka su izmjerene niže koncentracije svih metala nego kod medvjeda, s najizraženijom razlikom u razinama Cd, što je posljedica razlike u količini pojedene hrane te općenito prehrambenim navikama. Kod medvjeda, ženke su imale oko dva puta više razine Cd i Hg u tkivima od mužjaka, dok kod vukova nisu primijećene spolne razlike u razinama metala. Povišene razine Cd u skupini starih medvjeda (stariji od 3 godine) i vukova (stariji od 2 godine) u odnosu na mlade ($p < 0,05$) upućuju na nakupljanje Cd u svim istraživanim tkivima. S obzirom na zakonom propisane najviše dopuštene količine metala u mesu za konzumaciju, meso medvjeda sigurno je za ljudsku upotrebu, dok se iznutrice preporuča izbjegavati, prvenstveno zbog povišenih razina Cd.

Toxic metals in Croatian large terrestrial carnivores

Maja Vihnanek Lazarus, Ankica Sekovanić, Slaven Reljić, Josip Kusak,
Đuro Huber, Jasna Jurasović

E-mail: mlazarus@imi.hr

The bear and the wolf are large terrestrial carnivores whose position in the food web implies a potentially high intake of toxic metals. The main source for this intake is food: for bears, food mostly originates from plants; while for wolves, it mainly originates from the meat of other animals. Therefore, the toxic metal content in their tissue reflects the toxic metal levels in the environment. Toxic metals such as cadmium (Cd), lead (Pb), and mercury (Hg), accumulate in the organism and are excreted very slowly. This, depending on the levels, enables these metals to negatively impact the health of animals and the people who eat their meat (for instance, bear meat). There are no data in the available literature on the monitoring of toxic metals (or any other element) in the Dinaric population of large carnivores, except for a limited report on few individuals.

This investigation was aimed at measuring the Cd, Pb, and Hg levels in the tissue (muscles, liver, and renal cortex) of 136 brown bears and 40 grey wolves hunted (according to the Croatian Brown Bear Management Plan and Croatian Wolf Management Plan) or killed otherwise in the Croatian regions of Gorski kotar, Lika, and Dalmacija during 2009 and 2010. Metal levels in the tissues were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after high-pressure microwave decomposition.

The following levels of Cd, Pb, and Hg were found in the bear tissue (median; µg/g wet tissue weight): muscle 0.008, 0.007, and 0.002, liver 1.09, 0.496 and 0.031, kidney 16.5, 1.12, and 0.206; while wolf tissues had the following levels: muscle 0.0003, 0.004, and 0.003, liver 0.055, 0.107, and 0.016, kidney 0.182, 0.088, and 0.034. Wolves exhibited somewhat lower metal concentrations than bears and the highest discrepancy was found in the Cd levels, which is the result of the differences in the amount of food consumed and general dietary habits. In bears, females had approx. twice as high levels of Cd and Hg than males, whereas wolves displayed no gender differences. Increased Cd levels in a group of older bears (older than 3 years) and wolves (older than 2 years) when compared to younger individuals ($p < 0.05$) indicate an accumulation of Cd in all of the investigated tissues. Considering the official highest permitted values for metal levels in meat, bear meat can be declared safe for human consumption, with the exception of bear offal, which contains higher levels of Cd.

