

łopi. 20.02.2025v.



SEKRETARIAT
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
/ mgr Małgorzata Małinowska /
starszy specjalista

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Lek. wet. Marta Alicja Gałązka

**Skład gatunkowy nicieni trawieńca żubrów
(*Bison bonasus*) wraz z oceną skuteczności
działania antyhelmintyków stosowanych
w hodowlach zamkniętych w Polsce na
podstawie badań koproskopowych,
morfologicznych i molekularnych**

Species composition of abomasal nematodes
of captive European bison (*Bison bonasus*) in Poland,
and the assessment of the anthelmintic efficacy
based on coproscopic, morphological and molecular examination

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Anna M. Pyziel, prof. SGGW
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Promotor pomocniczy
dr Katarzyna Filip-Hutsch
Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Warszawa, 2025

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierownictwem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data..... 20.02.2025r.

Czytelny podpis promotora pracy..... Anna Pyziel

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadoma odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz. U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.).

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data..... 20.02.25.....

Podpis autora pracy..... Marta Gajguch

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania
za pomoc w realizacji pracy i opiekę merytoryczną:*

*dr hab. Annie Pyziel, prof. SGGW,
dr Katarzynie Filip-Hutsch
oraz dr hab. Danielowi Klichowi, prof. SGGW.*

*Szczególne podziękowania składam także wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej
pracy: prof. dr hab. Wandzie Olech, prof. dr hab. Krzysztofowi Anuszowi,
dr hab. Wojciechowi Bieleckiemu, prof. SGGW, lek. wet. Mieczysławowi Hławicze,
lek. wet. Stanisławowi Kaczorowi, lek. wet. Elwirze Plis-Kuprianowicz,
lek. wet. Szymonowi Skibie, lek. wet. Zbigniewowi Pawlińskiemu*

*oraz wielu innym życzliwym pracownikom ośrodków utrzymujących żubry w Polsce,
bez których nieocenionej pomocy pozyskanie materiału do badań byłoby niemożliwe.*

*Najszczerze podziękowania za cierpliwość i wytrwałość dla mojego męża Patryka,
który w trakcie powstawania tej pracy słuchał Led Zeppelin stanowczo zbyt wiele razy.*

*Rozprawę dedykuję mojej Mamie i mojemu Tacie,
którzy zawsze okazują mi wsparcie i bezgraniczną miłość.*

Dzięki wielkie!

Spis treści	
Streszczenie	9
Summary	10
Wprowadzenie.....	11
Informacje o źródle finansowania badań	11
Wykaz skrótów.....	13
Wykaz publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej.....	15
1. Wstęp.....	17
1. Uzasadnienie podjęcia tematu	17
1.1 Zarys historii populacji żubra	17
1.2 Monitoring zdrowia żubrów	18
1.3 Monitoring parazytologiczny żubrów	18
Pasożyty układu pokarmowego i oddechowego żubrów	19
1.3.1. Nicienie żołądkowo-jelitowe	20
1.3.2. Nicienie płucne	21
1.3.3. Przywry	22
1.3.4. Tasiemce	23
1.3.5. Pierwotniaki z rodzaju <i>Eimeria</i>	24
2. Skuteczność terapii przeciw pasożytniczej oraz lekooporność nicieni.....	25
2.1. Metody badania lekooporności nicieni	27
2. Cele pracy	29
3. Materiały i metody	30
1. Materiał badawczy	30
1.1. Próbkki kału i obszar zbioru próbek	30
1.2. Trawienie i obszar zbioru próbek	31
2. Badania koproskopowe	32
2.1. Metoda McMaster'a.....	32
2.2. Metoda Willis'a	33
2.3. Metoda Baermanna	33
2.4. Metoda dekantacji	34
3. Ocena skuteczności odrobaczenia.....	34
3.1. Test redukcji liczby jaj w kale	35
4. Ocena wpływu bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na różnicowanie parazytofauny żubrów	36
5. Metodyka sekcji parazytologicznych.....	37
6. Morfologiczna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów.....	37
7. Molekularna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów	38
8. Analiza statystyczna.....	39
8.1. Porównanie metod McMaster'a i Willis'a	39

8.2. Ocena wpływu bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie parazytofauny żubrów	39
8.3. Skład gatunkowy, prewalencja i intensywność zarażenia nicieniami trawieńca żubrów, a typ utrzymania zwierząt	40
4. Wyniki.....	41
1. Wyniki badań koproskopowych oraz porównanie skuteczności metod Willis'a i McMaster'a w diagnostyce parazytologicznej żubrów	41
2. Ocena skuteczności odrobaczania w kierunku nicieni żołądkowo-jelitowych żubrów utrzymywanych w zagrodach zamkniętych w Polsce	42
3. Wpływ bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie parazytofauny żubrów	43
4. Skład gatunkowy i intensywność zarażenia nicieniami trawieńca żubrów w zależności od typu utrzymania zwierząt.....	43
4.1. Morfologiczna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów	43
4.2. Prewalencja i intensywność zarażenia nicieniami trawieńca żubrów ...	45
4.3. Molekularna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów	46
5. Dyskusja.....	49
6. Wnioski	55
7. Piśmiennictwo.....	56
8. Załączniki.....	69
1. Publikacja nr 1	
Gałązka M., Klich D., Anusz K., Pyziel-Serafin A.M. 2022. Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, <i>Bison bonasus</i> designated for translocation: Comparison of two coprological methods. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, Volume 17, 2022, Pages 166-173.	
2. Publikacja nr 2	
Gałązka M., Klich D., Filip-Hutsch K., Olech W., Anusz K., Pyziel A.M. 2023. Endoparasite loads and the efficacy of conventional anthelmintics against gastrointestinal nematodes in captive European bison. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, Volume 21, 2023, Pages 224-231.	
3. Publikacja nr 3	
Gałązka M., Filip-Hutsch K., Klich D., Olech W., Anusz K., Pyziel A.M. 2024. The variety of abomasal nematode communities of captive and free-roaming populations of European bison, <i>Bison bonasus</i> (L.): a morphometric and molecular approach. Parasitology, 2024, Pages: 1-10.	
9. Oświadczenia współautorów	

Streszczenie

Skład gatunkowy nicieni trawieńca żubrów, *Bison bonasus* wraz z oceną skuteczności działania antyhelmintyków stosowanych w hodowlach zamkniętych w Polsce na podstawie badań koproskopowych, morfologicznych i molekularnych

Przeprowadzono kompleksowe badania parazytologiczne żubrów, utrzymywanych w zagrodach zamkniętych w Polsce. Przy użyciu metod koproskopowych, morfologicznych oraz molekularnych określono różnorodność gatunkową pasożytów, prewalencję i intensywność zarażenia pasożytami wewnętrznymi. Zbadanie 285 próbek kału żubrów pozwoliło na obserwację najwyższej prewalencji zarażenia oocystami pierwotniaków z rodzaju *Eimeria* (60,7%) oraz jajami nicieni żołądkowo-jelitowych (50,9%). Najniższą prewalencję zanotowano w przypadku jaj tasiemców z rodzaju *Moniezia* i jaj nicieni z rodziny Ascarididae (0,7%). Oprócz charakterystycznych jaj nicieni z rodzaju *Trichuris* (9,5 %), należących do rodziny Trichuridae i *Aonchotheca* (1,8%) z rodziny Capillariidae, identyfikowano także jaja nicieni z rodzaju *Nematodirus* (2,5%), należące do rodziny Molineidae. W badaniach z wykorzystaniem metody larwoskopowej Baermanna stwierdzano larwy nicieni płucnych z rodzaju *Dictyocaulus* (12,3%). Metodami dekantacji wykrywano jaja przywr z rodzaju *Fasciola* (13,1%) i rodziny Paramphistomidae (3,9%). Przeprowadzona analiza metod koproskopowych używanych powszechnie u żubrów wykazała, że w przypadku niskiej prewalencji zarażenia jajami/oocystami, metoda Willis'a może być bardziej przydatna w porównaniu ze zmodyfikowaną metodą McMaster'a. Najczęściej identyfikowanymi nicieniami trawieńca żubrów były: *Ostertagia ostertagi* (80%), *Haemonchus contortus* (63,3%) oraz *O. lyrata* (43,3%). Wyniki badania składu gatunkowego nicieni trawieńca żubrów żyjących w niewoli oraz na wolności nie różniły się istotnie. Opracowano klucz morfometryczny ułatwiający identyfikację gatunków nicieni trawieńca żubrów. W sumie zidentyfikowano 6400 nicieni, należących do 11 gatunków. Metodami molekularnymi potwierdzono przynależność gatunkową *Ashworthius sidemi*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. kolchida* i *Spiculoptera boehmi*. Uzyskano pierwszą sekwencję nukleotydową *O. kolchida* oraz nową sekwencję nukleotydową *S. boehmi*. Ocena skuteczności odrobaczania żubrów przy użyciu testu redukcji siania jaj w kale wykazała brak skuteczności benzimidazoli (albendazol, fenbendazol) i makrocyclicznych laktonów (iwermektyna) u zwierząt we wszystkich przebadanych zagrodach.

Słowa kluczowe – żubr, nicienie trawieńca, koproskopia, skuteczność odrobaczania, morfometria, PCR

Summary

Species composition of abomasal nematodes of captive European bison, *Bison bonasus* in Poland, and the assessment of the anthelmintics efficacy based on coproscopic, morphological and molecular examination

A comprehensive parasitological study of European bison in enclosures in Poland was carried out. The species diversity, prevalence and intensity of infection with internal parasites were determined using coproscopic, morphological and molecular methods.

In 285 examined fecal samples the highest prevalence was noted for *Eimeria* spp. oocysts (60.7%) and strongyle eggs (50.9%). The lowest prevalence was observed for *Moniezia* eggs and nematode eggs of the family Ascarididae (0.7%). In addition to the characteristic nematode eggs of *Trichuris* (9.5%) from family Trichuridae, and eggs of *Aonchotheca* (1.8%) from family Capillariidae, also nematode eggs of the genus *Nematodirus* (2.5%) from family Molineidae were noted. The larvae of the lungworm of genus *Dictyocaulus* (12.3%) were found using the Baermann method. Sedimentation method was used to detect eggs of parasites of the genus *Fasciola* (13.1%) and the family Paramphistomidae (3.9%). An analysis of the coproscopic methods commonly used in European bison showed that the Willis method is more sensitive than the modified McMaster method especially if the prevalence of infection is low. The most prevalently found abomasal nematodes were *Ostertagia ostertagi* (80%), *Haemonchus contortus* (63.3%) and *O. lyrata* (43.3%). The results of species composition of abomasal nematodes of captive and free-living European bison were not significantly different. A morphometric key was developed to facilitate morphological identification of abomasal nematodes of European bison. A total of 6,400 nematodes belonging to 11 species were measured. The identification of five nematode species: *Ashworthius sidemi*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. kolchida* and *Spiculopteragia boehmi* was confirmed using molecular methods. The first nucleotide sequence of *O. kolchida* and a new nucleotide sequence of *S. boehmi* were obtained. Fecal Egg Count Reduction Test revealed the lack of efficacy of deworming with benzimidazoles (albendazole, fenbendazole) and macrocyclic lactones (ivermectin) in animals in all examined enclosures.

Keywords – European bison, abomasal nematodes, coproscopy, anthelmintic efficacy, morphology, PCR

Wprowadzenie

Przedstawiona rozprawa doktorska pt. „Skład gatunkowy nicieni trawieńca żubrów, *Bison bonasus* wraz z oceną skuteczności działania antyhelmintyków stosowanych w hodowlach zamkniętych w Polsce na podstawie badań koproskopowych, morfologicznych i molekularnych tworzy monotematyczny cykl trzech publikacji oryginalnych, opublikowanych w czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym, dostępnych w bazie PubMed. Doktorantka jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym we wszystkich publikacjach przedstawionego cyklu. Łączny Impact Factor wynosi 5,9, natomiast łączna suma punktów MNiSW to 300.

Informacje o źródle finansowania badań

Część próbek wykorzystanych do badań zostało pozyskane przy wsparciu Funduszu Leśnego w ramach "Kompleksowego projektu ochrony żubra przez Lasy Państwowe" [nr umowy OR.271.3.10.2017].

Wykaz skrótów

A – Adenina

C – Cytozyna

EPG – Eggs per gram – liczba jaj w jednym gramie próbki

FECRT – Fecal Egg Count Reduction Test - test redukcji liczby jaj sianych w kale

EHT – Egg Hatch Test - test wylęgania jaj

G - Guanina

LDT – Larval Development Test - test rozwoju larw

LPG – Larvae per gram – liczba larw w jednym gramie próbki

OPG – Oocysts per gram – liczba oocyst w jednym gramie próbki

PCR – Polymerase Chain Reaction – łańcuchowa reakcja polimerazy

R – Adenina lub guanina

T – Tymina

WAAVP – World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

Wykaz publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej

1. **Gałązka M.**, Klich D., Anusz K., Pyziel-Serafin A.M. 2022. Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, *Bison bonasus* designated for translocation: Comparison of two coprological methods. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Volume 17, 2022, Pages 166-173.
DOI:10.1016/j.ijppaw.2022.01.008
Wskaźnik Impact Factor – 1,8; Punkty MNiSW – 100 pkt.
2. **Gałązka M.**, Klich D., Filip-Hutsch K., Olech W., Anusz K., Pyziel A.M. 2023. Endoparasite loads and the efficacy of conventional anthelmintics against gastrointestinal nematodes in captive European bison. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, Volume 21, 2023, Pages 224-231.
DOI: 10.1016/j.ijppaw.2023.06.005
Wskaźnik Impact Factor – 2,0; Punkty MNiSW – 100 pkt.
3. **Gałązka M.**, Filip-Hutsch K., Klich D., Olech W., Anusz K., Pyziel A.M. 2024. The variety of abomasal nematode communities of captive and free-roaming populations of European bison, *Bison bonasus* (L.): a morphometric and molecular approach. *Parasitology*, 2024, Pages 1-10.
DOI: oi.org/10.1017/S003118202400088X
Wskaźnik Impact Factor – 2,1; Punkty MNiSW – 100 pkt.

Wstęp

1. Uzasadnienie podjęcia tematu

1.1. Zarys historii populacji żubra

Żubr, *Bison bonasus* należy do rzędu parzystokopytnych, podrzędu przeżuwaczy, rodziny wołowatych, podrodziny bawołów, rodzaju bydło i gatunku żubr europejski. Przedstawiciele tego gatunku są największymi ssakami lądowymi w Europie. W wyniku oddziaływania wielu czynników, takich jak degradacja siedlisk przyrodniczych, intensywne kłusownictwo oraz okoliczności związane z I Wojną Światową, gatunek wyginął na wolności w 1919 roku. Po wojnie podjęto próbę odtworzenia populacji żubrów z 54 osobników żyjących w zwierzyńcach i ogrodach zoologicznych. W czasie działań restytucyjnych okazało się, że materiał genetyczny wszystkich badanych żubrów pochodzi jedynie od 12 zwierząt, świadcząc o niezwykle małej puli genów w obrębie populacji (Wróblewski, 1927; Raczyński, 1978; Pucek, 1991). Aktualnie opisuje się dwie linie genetyczne w populacji żubra: linię nizinną, zwaną także białowieską oraz linię nizinno-kaukaską. Linia nizinna pochodzi od 7 osobników podgatunku *Bison bonasus bonasus*, natomiast linia nizinno-kaukaska wywodzi się od 12 osobników, w tym jednego byka z podgatunku *Bison bonasus caucasicus* oraz 11 zwierząt z podgatunku *Bison bonasus bonasus*.

Ze względu na przejście populacji żubra przez efekt genetycznego wąskiego gardła, gatunek doświadczył dramatycznego spadku zmienności genetycznej (Olech i Perzanowski, 2002), co spowodowało umieszczenie go na Czerwonej Liście Międzynarodowej Unii Ochrony Przyrody (International Union of Conservation of Nature, IUCN) (IUCN, 2021). W wyniku intensywnych prac nad restytucją gatunku, na koniec 2022 roku, światowa populacja żubra liczyła 10 536 osobników, w tym 2603 osobników zamieszkujących terytorium Polski. W 2020 roku klasyfikacja żubra na Czerwonej Liście gatunków zagrożonych IUCN zmieniła się z narażonego na wyginięcie do statusu gatunku bliskiego zagrożenia, jednakże gatunek ten nadal wymaga skoordynowanych działań ochronnych (Klich i in., 2018; Olech i in., 2019). Polska populacja żubra stanowi 24,7% populacji światowej, z czego 0,1% to żubry żyjące w niewoli (209 osobników), będące rezerwuarem genetycznym gatunku. Ochrona żubra ma wpływ także na kształtowanie środowiska, ponieważ żubr jest uważany za gatunek parasolowy, tj. działania ochronne ukierunkowane na ten gatunek mogą skutkować ochroną siedlisk wielu innych zwierząt i roślin (Olech i Perzanowski, 2014).

1.2. Monitoring zdrowia żubrów

Wyjątkowo niska zmienność genetyczna gatunku przyczyniła się do zwiększonej wrażliwości żubra na choroby zakaźne i inwazyjne, co niejednokrotnie doprowadzało do znacznej redukcji liczby zwierząt. Przykładem może być wystąpienie gruźlicy w populacji żubrów w Bieszczadach w latach 1996-2013 oraz epidemia pryszczycy w Pszczynie na przełomie 1953 i 1954 roku (Pigan i Wójtowicz, 2015; Welz i in., 2023). Należy podkreślić, że zjawisko translokacji oraz migracji żubrów na znaczne odległości sprzyja transferowi czynników patogennych, stwarzając zagrożenie dla ludzi, zwierząt łownych oraz gospodarskich, zajmujących te same areały (Klich i in., 2023). Tak też stało się w 2016 r. z rozprzestrzenieniem aswortiozy w Czechach wraz z przewożonymi tam żubrami zarażonymi azjatyckim nicieniem *Ashworthius sidemi* (Vadlejch i in., 2017). Z tego powodu, jednym z elementów ochrony gatunkowej żubrów jest rutynowy monitoring zdrowia, także poprzez nadzór i przeciwdziałanie rozprzestrzenianiu chorób zakaźnych i inwazyjnych. Pozwala on na szybkie wykrycie ewentualnego zagrożenia i ograniczenie jego rozprzestrzeniania się poprzez wdrożenie odpowiednich działań. Translokacja zwierząt jest istotnym elementem działań ochronnych ukierunkowanych na zachowanie różnorodności genetycznej zagrożonych gatunków, ale także niesie ze sobą ryzyko przeniesienia patogenów między stadami w kraju oraz za granicą. Z tego powodu zwierzęta przeznaczone do transportu powinny być gruntownie przebadane i poddane kwarantannie przed wyjazdem (Treboganova, 2011). W przypadku żubrów, relokacji podlegają osobniki zarówno żyjące w niewoli, jak i wolno żyjące, co wiąże się ze spełnieniem określonych wymogów przez obie grupy zwierząt. Wszystkie zwierzęta przetrzymywane w zagrodzie i pozyskane z populacji wolno żyjącej muszą być poddane co najmniej 30-dniowej kwarantannie oraz testom na obecność chorób wymienionych w dokumencie UE TRACES nr 92-65 i wymaganych przez lekarzy weterynarii w miejscu docelowym, przyjmującym zwierzę. Jedną z procedur, zalecanych przed translokacją, jest badanie koproskopowe i odrobaczanie żubrów (Kaczmarek-Okrój i in., 2016; Hławiczka, 2008).

1.3. Monitoring parazytologiczny żubrów

W ramach działań monitoringowych prowadzone są badania parazytofauny żubrów, która na przestrzeni dziesięcioleci wzbogacała się o nowe gatunki (Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010). Pierwsze wyniki opisujące pasożyty żubrów dotyczyły wolno żyjących stad, zamieszkujących Puszczę Białowieską na przełomie XIX i XX wieku. W tamtym czasie Wróblewski (1927) poczynił pierwsze obserwacje, dotyczące powszechnego zarażenia

żubrów motylicą wątrobową i częstych zejść śmiertelnych osobników, cierpiących na chorobę motyliczą (Dróżdż, 1994). Po wyginięciu wolno żyjących populacji, badania parazytologiczne skupiły się na zwierzętach utrzymywanych w zagrodach zamkniętych, mających dać początek nowym, dzikim stadom. Monitoring parazytologiczny był kontynuowany po wypuszczeniu pierwszych osobników na wolność i jest prowadzony do dzisiaj. Badania dotyczące helmintofauny żubrów rozpoczął w latach '50. XX w. Dróżdż (1961), a następnie kontynuował Demiaszkiewicz z zespołem (2005; 2006; 2007; 2008; 2010; 2017), wykrywając nowe zagrożenie dla zdrowia żubra, w postaci krwio pijnego nicienia trawieńca, *Ashworthius sidemi* (Dróżdż, 2001) i monitorując jego rozprzestrzenianie (Dróżdż i in., 2003; Demiaszkiewicz i in., 2009 a, 2017, 2018, 2020 a). W związku z powyższym, helmintofauna żubra została poznana wnikliwiej niż innych dzikich przeżuwaczy (Demiaszkiewicz i in., 2006; Demiaszkiewicz i Lachowicz, 2007; Dróżdż, 1961; Dróżdż i in., 1989, Karbowski i in., 2014 a, b).

U żubrów stwierdza się obecność fauny pasożytniczej typowej zarówno dla bydła i małych przeżuwaczy, jak i dla jeleniowatych, z którymi dzielą wspólną niszę ekologiczną. Do wymiany pasożytów między wspomnianymi zwierzętami może prowadzić korzystanie ze wspólnych łąk śródleśnych, wodopojów, czy innych miejsc zanieczyszczonych formami dyspersyjnymi pasożytów, które są wydalone do środowiska zewnętrznego wraz z kałem żywiciela. Opracowanie skutecznych metod przyżyciowej, nieinwazyjnej diagnostyki parazytologicznej żubra, jako gatunku narażonego na wyginięcie, przyczynia się do jego ochrony, pozwalając na szybkie wykrycie ewentualnych nowych zagrożeń i zapobieganie ich rozprzestrzenianiu.

Pasożyty układu pokarmowego i oddechowego żubrów

U żubrów opisano występowanie 88 gatunków pasożytów. Najliczniejszą grupę stanowią nicienie - 43 gatunki, następnie pierwotniaki - 22 gatunki. Oprócz tego, stwierdzono 8 gatunków płazińców (4 gatunki przywr i 4 gatunki tasiemców). Spośród 43 gatunków nicieni notowanych u żubrów, większość to pasożyty typowe dla bydła domowego (Karbowski i in., 2014 a i b), jak nicienie *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *O. lyrata* czy *Oesophagostomum radiatum*. Oprócz tego, u żubrów stwierdzano także gatunek *Aonchotheca bilobata*, będący pospolitym pasożytem bydła w Indiach i Wietnamie, który prawdopodobnie przyswoiły w okresie przebywania w ogrodach zoologicznych (Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010). Co ciekawe, u żubrów potwierdzono występowanie 14 gatunków nicieni, typowych dla jeleniowatych, takich jak: *Ashworthius sidemi*,

Bunostomum trigonocephalum, *Cooperia pectinata*, *Mazamastrongylus dagestanicus*, *Nematodirella alcidis*, *Nematodirus europeus*, *N. roscidus*, *Ostertagia antipini*, *O. kolchida*, *O. leptospicularis*, *Spiculopteragia assymetrica*, *S. boehmi*, *S. mathevossiani*, *Trichostrongylus capricola* (Demiaszkiewicz, 2005; Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010). Największe znaczenie dla stanu zdrowia żubrów mają nicienie z rzędu *Strongylida*, w tym krwio pijny nicienie występujący w trawieńcach *Ashworthius sidemi* oraz nicienie płucne z rodzaju *Dictyocaulus*, a także przywra wątrobową, *Fasciola hepatica*. Wysokie intensywności zarażenia tymi helmintami mogą powodować upadki zwierząt (Demiaszkiewicz 2005; Taylor i in., 2007; Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010; Osińska i in., 2010; Cârstolovean i in., 2024).

1.3.1. Nicienie żołądkowo-jelitowe

Najczęściej występującymi helmintami żubrów są nicienie żołądkowo-jelitowe, które przy silnej inwazji (ponad 10 tysięcy pasożytów) mogą powodować poważne zaburzenia stanu zdrowia żywiciela, takie jak przewlekła biegunka, krwotoczne zapalenie błony śluzowej przewodu pokarmowego, hipoproteinemia i ostatecznie wyniszczenie organizmu (Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010; Osińska i in., 2010). Są organizmami rozdzielno płciowymi o prostym cyklu rozwojowym, który nie wymaga udziału żywiciela pośredniego (Taylor i in., 2007).

U żubrów stwierdzono 20 gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych z nadrodziny *Trichostrongyloidea*, należących do rodzajów *Cooperia*, *Haemonchus*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Spiculopteragia*, *Teladorsagia* i *Trichostrongylus*. Najczęściej wykrywane nicienie należą do podrodziny *Ostertagiinae* i są powszechnie stwierdzane w inwazjach wielogatunkowych (Demiaszkiewicz 2005; Drózd i in., 1989; Karbowski i in., 2014 a). Często wykrywane nicienie krwio pijne (*Haemonchus contortus* i *Ashworthius sidemi*) są wysoce patogenne dla przeżuwaczy, powodując zaburzenia w parametrach czerwonych krwinek, prowadzą do rozwoju niedokrwistości i niezdolności żywiciela do kompensowania utraty krwi (Kołodziej-Sobocińska i in., 2016 a; Osińska i in., 2010). W przypadku silnej inwazji, słabej kondycji zwierzęcia, stresu, zaburzonej funkcji układu odpornościowego lub zdolności hematopoetycznej organizmu żywiciela, postępujące zmiany prowadzą do śmierci żywiciela (Bowman, 2012). Ponadto, *H. contortus* jest powszechnie opisywany jako gatunek pasożytniczego nicienia o największym potencjale do rozwoju oporności na antyhelmintyki. Brak skuteczności odrobaczania żubrów żyjących w niewoli po raz pierwszy zaobserwowali Pyziel i in., (2018) w rezerwacie Avesta Visentpark

w Szwecji. Systematyczny monitoring zdrowia, w tym pod kątem pasożytów, pozwala na identyfikowanie nowych zagrożeń dla żubrów wystarczająco wcześnie, aby zapobiec ich rozprzestrzenieniu na inne osobniki w populacji lub inne gatunki zwierząt. Ciekawym przykładem transmisji pasożytów jest zaobserwowana w 1997 roku w Bieszczadach aswortioza (Drózd i in., 1998). Jest to choroba wywołwana przez krwio pijne nicienie z rodziny Trichostrongylidae, należące do rodzaju *Ashworthius*. Pierwotnie występujący w Afryce i Eurazji, *A. sidemi*, pasożytujący na azjatyckich jeleniach, został przeniesiony do Europy wraz z jeleniem sika. Początkowo skolonizował on miejscowe jeleniowate, a później potwierdzono jego inwazję u bieszczadzskich żubrów. W roku 2001 odnotowano już zarażenie gatunkiem *A. sidemi* żubrów z Puszczy Białowieskiej (Drózd i in., 2003). Żubry okazały się wrażliwe na zarażenie tym obcym gatunkiem, co na początku inwazji prowadziło do wyparcia rodzimego gatunku *H. contortus*, przez konkurujący z nim o tę samą niszę ekologiczną (trawienie) *A. sidemi* (Demiaszkiewicz i in., 2008). W 2004 roku prevalencja występowania *A. sidemi* w Puszczy Białowieskiej osiągnęła 100% i utrzymywała się na takim poziomie do 2010 roku (Kołodziej-Sobocińska i in., 2016 b). Po 10 latach od stwierdzenia pierwszego przypadku zarażenia *A. sidemi* odnotowano znaczny spadek intensywności zarażenia, a na przestrzeni lat 2011 - 2015 prevalencja zarażenia wahała się od 89% do 100% (Kołodziej-Sobocińska i in., 2016b). W ostatnich latach notuje się powrót zarażeń żubrów rodzimym gatunkiem *H. contortus*. To zjawisko jest dobrym przykładem zdolności adaptacyjnych pasożytów, które skutkują wysokimi ekstensywnościami zarażenia w populacjach nowych żywicieli.

1.3.2. Nicienie płucne

Żubry mogą być żywicielami nicieni płucnych z rodzaju *Dictyocaulus*, zwanych „dużymi” nicieniami płucnymi, dla odróżnienia od powszechnie występujących u jeleniowatych „małych” nicieni płucnych z rodziny Protostrongylidae. Rodzina Dictyocaulidae należy do nadrodziny Trichostrongyloidea i skupia nicienie o prostym cyklu rozwojowym, których rozwój przebiega bez żywiciela pośredniego. Nicienie płucne opisywano już u żubrów w monografii żubra z 1927 roku (Wróblewski, 1927). Są one drugim najczęściej notowanym pasożytem u żubrów, przede wszystkim żyjących na wolności (Novikova i in., 2015; Demiaszkiewicz i in., 2018), ale równie często są diagnozowane u żubrów w niewoli (Demiaszkiewicz i in., 2008). Pierwsze doniesienia podawały, że u żubrów występują gatunki takie jak *D. viviparus*, typowy dla bydła oraz *D. filaria*, typowy dla małych przeżuwaczy (Wróblewski, 1927; Drózd, 1994). Jednak późniejsze dane wskazywały

wyłącznie na gatunek *D. viviparus* (Demiaszkiewicz i in., 2009b). Dalsze badania nicieni płucnych żubrów wskazały na różnice w budowie morfologicznej osobników *D. viviparus* izolowanych od bydła domowego i od żubra (Pyziel i in., 2020b). Autorzy zaznaczają, że różnice morfologiczne nicieni mogą być indukowane przez gatunek żywiciela (Nadler, 2002) oraz sugerują, że nicienie płucne żubrów powinny zostać sklasyfikowane jako nowy podgatunek *D. viviparus* subsp. *bisontis* (Pyziel i in., 2020b). Zostało to także poparte wynikami badań z użyciem technik biologii molekularnej, wskazującymi na różnice w kodonach genów mitochondrialnych kodujących podjednostkę 1 oksydazy cytochromowej (COX1), cytochrom B (cytB), czy podjednostkę 5 dehydrogenazy NADH (NAD5) nicieni płucnych żubrów i bydła domowego (Pyziel i in., 2020b).

Diktiokauloza jest jedną z najgroźniejszych parazytoz żubrów (Demiaszkiewicz i in., 2009 b). Dorosłe nicienie płucne lokalizują się w drzewie oskrzelowym żywiciela i początkowo prowadzą do rozwoju zapalenia oskrzeli i zmniejszenia wydolności oddechowej (Demiaszkiewicz i in., 2009b). Przy intensywnej inwazji może dochodzić do zamknięcia światła oskrzeli, rozwoju niedodmy i następnej rozedmy płatów płuc, a następnie do śmierci żywiciela (Taylor i in., 2007; Bowman, 2012; Cârstolovean i in., 2024). Zmiany anatomopatologiczne i histopatologiczne stwierdzane u żubrów w przebiegu diktiokaulozy wykazały rozwój śródmiąższowego zapalenia płuc, zapalenia oskrzeli i oskrzelików (Pyziel i in., 2020 b). Najwyższa prewalencja zarażenia nicieniami płucnymi u żubrów notowana była u cieląt i wynosiła do 100%. Wysoka intensywność zarażenia była stwierdzana nie tylko u cieląt, ale także u zwierząt starszych. Opisano także śmiertelne przypadki diktiokaulozy u żubrów (Demiaszkiewicz i in., 2009 b; Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010 Cârstolovean i in., 2024).

1.3.3. Przywry

Przywry występują powszechnie u dzikich i udomowionych gatunków ssaków, w tym przeżuwaczy. U żubrów opisano cztery gatunki przywr, w tym trzy często spotykane u domowych i dzikich przeżuwaczy: *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* i *Paramphistomum cervi* oraz jeden typowy pasożyt łosi, czyli *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* (Bowman, 2012; Filip i in., 2016 a i b). Na przestrzeni lat obserwowano fluktuacje w prewalencji zarażenia poszczególnymi gatunkami przywr, ale najczęściej diagnozowana była inwazja motylicy wątrobowej (Karbowski i in., 2014 a). Fascioloza jest jedną z najgroźniejszych chorób występujących u żubrów (Demiaszkiewicz i in., 2020 a). Ostry przebieg inwazji motylicy wątrobowej skutkuje uszkodzeniem miększu wątroby,

bólem jamy brzusznej i może doprowadzić do śmierci, szczególnie gdy dodatkowo dojdzie do nadkażenia bakteriami z rodzaju *Clostridium*. Forma przewlekła choroby prowadzi do zmian chronicznych takich jak spadek kondycji, niedokrwistość, marskość wątroby oraz hipoproteinemia, która może doprowadzić do powstania obrzęków podskórnych (Bowman, 2012; Taylor i in., 2007). Cykl rozwojowy wymienionych gatunków przywr zachodzi zgodnie ze schematem motyliczym (Bowman, 2012) i wymaga do zamknięcia cyklu żywiciela pośredniego – ślimaka, w przypadku motylicy wątrobowej błotniarki moczarowej, (*Galba truncatula*). U żubrów wolno żyjących zarażenia przywrami opisywano częściej niż u zwierząt w zagrodach, ze względu na dostęp do terenów podmokłych, zbiorników wodnych, będących środowiskiem występowania ślimaków. W przebadanych sekcyjnie populacjach zwierząt wolno żyjących, w latach 2006-2008, prewalencja zarażenia *F. hepatica*, osiągała 100%. Opisana intensywność inwazji była wysoka, w przewodach żółciowych wątroby znaleziono ponad 630 przywr, a w pęcherzyku żółciowym stwierdzono do 2 250 000 jaj motylicy wątrobowej (Demiaszkiewicz i in., 2008; Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010).

1.3.4. Tasiemce

U żubrów opisano 4 gatunki tasiemców należące do rodzin Anoplocephalidae i Taenidae (Demiaszkiewicz 2005), reprezentowane przez rodzaje *Moniezia* i *Taenia*. Pierwsze opisy inwazji tasiemcami u żubrów można znaleźć w monografii żubra z 1927 r., gdzie Wróblewski (1927) stwierdził liczne zarażenia gatunkiem *Moniezia*. Tasiemce z rodzaju *Moniezia* są powszechnymi pasożytami przeżuwaczy, a zarażenia stwierdzane są przede wszystkim u zwierząt młodych w wieku do 6 miesięcy (Demiaszkiewicz i in., 2020 b). Przeżuwacze są żywicielami ostatecznymi tych tasiemców, podczas gdy mechowce, roztocza z nadrodziny Oribatoidea, są żywicielami pośrednimi. Mechowce spożywają jaja tasiemców wydalanych z kałem przeżuwaczy, a uwolnione w przewodzie pokarmowym onkosfery wnikają do hemocelu i po około 100 dniach rozwija się stadium inwazyjne – cysticerkoid. Żubry zjadają z trawą zarażone roztocza, a cysticerkoidy lokują się w jelicie cienkim, gdzie po 5-6 tygodniach rozwijają się dojrzałe tasiemce. Silna inwazja tasiemców może być przyczyną zamknięcia światła jelita cienkiego, utrudnienia przepływu żołądkowo-jelitowego, upośledzenia perystaltyki oraz uszkodzenia i nieżyłowego zapalenia błony śluzowej jelit. Ponadto, produkty przemiany materii tasiemców są toksyczne dla żywiciela. Zwierzęta zarażone pojedynczymi tasiemcami mogą nie wykazywać klinicznych objawów choroby, ale silna inwazja może prowadzić do utraty apetytu, biegunek na przemian z

zaparciami, niedokrwistości, a nawet śmierci żywiciela. U starszych zwierząt moniezjoza przebiega przewlekłe ze słabo wyrażonymi objawami klinicznymi (Demiaszkiewicz, 2005; Demiaszkiewicz i in., 2020 b).

W badaniach żubrów żyjących na wolności w Puszczy Białowieskiej wykazano obecność dwóch gatunków tasiemców *M. expansa* i *M. benedeni* (Karbowski i in., 2014 a), przy czym obecność *M. benedeni* została stwierdzona także w innych lokalizacjach (Gagarin i Nazarova, 1966), w tym w ogrodach zoologicznych (Jaros i in., 1966). Gatunek ten stwierdzono u 41% przebadanych żubrów, głównie u cieląt. Dodatkowo, u żubrów wolno żyjących w Puszczy Boreckiej opisano inwazję tasiemca *Moniezia* sp., znacznie różniącego się morfologicznie od pozostałych przedstawicieli tego rodzaju (Drózd 1961; Demiaszkiewicz i in., 2008).

Żywicielami ostatecznymi gatunków *T. hydatigena* są zwierzęta mięsożerne, a żywicielami pośrednimi mogą być zarówno kozy, owce, świny jak i dzikie zwierzęta kopytne (Bowman 2012). Formy larwalne *T. hydatigena* migrują przez tkankę wątroby żywiciela pośredniego i encystują na błonach surowiczych, można je znaleźć w sieci, krezce, pod torebką wątroby, a także w płucach, mózgu, nerkach, macicy i innych narządach (Payan-Carreira i in., 2008). Migracja larw może powodować krwotoczne i zwłóknieniowe zmiany w wątrobie i płucach prowadząc do rozwoju *hepatitis cysticercosa* i *pneumonitis cysticercosa* oraz śmierci żywiciela (Yildirim i in., 2006). Zarówno *T. hydatigena* jak i *M. expansa* były często stwierdzane u żubrów wolno żyjących na przełomie XX i XXI wieku, lecz nie zostały stwierdzone u zwierząt przebywających w zagrodach (Drózd i in., 1989; Demiaszkiewicz 2005, 2014).

1.3.5. Pierwotniaki z rodzaju *Eimeria*

Kokcydia z rodzaju *Eimeria* są pasożytniczymi pierwotniakami wewnątrzkomórkowymi należącymi do typu Apicomplexa. Stwierdza się je powszechnie u ssaków, ptaków, a także płazów, gadów i ryb (Duszynski i Wilber, 1997). W cyklu rozwojowym wyróżnia się fazy rozmnażania bezpłciowego (schizogonię) oraz płciowego (gamogonię), które zachodzą w organizmie żywiciela oraz fazę podziału sporoblastu wewnątrz oocyst na 4 sporocysty (sporulacja), która zazwyczaj zachodzi w środowisku zewnętrznym. Do zarażenia dochodzi drogą pokarmową poprzez pobranie inwazyjnych (wysporulowanych) oocyst wraz z paszą i wodą (Bowman, 2012).

Dotychczas u żubrów w Polsce stwierdzano 11 gatunków kokcydiów typowych dla bydła domowego, z dominacją gatunku *Eimeria bovis* (29,7%) i *E. zuernii* (9,9%) (Karbowski i

in., 2014 a; Pyziel i in., 2014). Stwierdzana liczebność gatunkowa kokcydiów oraz prewalencja zarażenia były wyższe u żubrów utrzymywanych w niewoli niż u zwierząt żyjących na wolności (Demiaszkiewicz i Pyziel, 2009; Pyziel i in., 2014). W badaniach populacji żubrów w Puszczy Białowieskiej częściej wykrywano zarażenia kokcydiami w okresie zimowym, co według autorów związane jest z większym zagęszczeniem populacji zwierząt przy miejscach dokarmiania (Pyziel i in., 2011). W patogenezie kokcydiozy największą rolę odgrywa niszczenie komórek nabłonkowych jelita grubego w fazie gamogonii gatunków uważanych za najbardziej patogenne (Pyziel i in., 2020 a). Należą do nich *E. bovis*, *E. zuerni* i *E. alabamensis*. Wymienione gatunki kokcydiów przechodzą gamogonię w komórkach błony śluzowej jelita grubego, które wolno się regenerują, a po uszkodzeniu komórek w tej części przewodu pokarmowego żaden inny odcinek jelita nie może przejąć jego funkcji. Z tego względu łagodniejszy przebieg mają inwazje gatunkami powodującymi uszkodzenie wyłącznie komórek nabłonka jelit cienkich, ponieważ wtedy możliwe jest częściowe przejęcie funkcji absorpcyjnej jelita cienkiego przez jelito grube (Taylor i in., 2007). Intensywność zarażenia przekłada się bezpośrednio na rozległość zmian anatomopatologicznych i histopatologicznych. Objawy kokcydiozy spotykane są głównie u zwierząt młodych, u których obserwuje się uporczywą, wodnistą biegunkę, utratę masy ciała i wyniszczenie. Choroba może prowadzić do śmierci zwierzęcia (Taylor i in., 2007).

2. Skuteczność terapii przeciwpasożytniczej oraz lekooporność nicieni

Monitoring składu gatunkowego pasożytów u żubrów jest niezbędny, w celu kontroli pojawienia się w populacji wysoce patogennych lub lekoopornych szczepów pasożytów. Należy pamiętać, że prawidłowy monitoring zdrowia żubrów, utrzymywanych w hodowlach zamkniętych, powinien opierać się na kontroli skuteczności działania stosowanych antyhelmintyków. Rutynowe odrobaczenia żubrów, przy długotrwałym podawaniu tej samej substancji czynnej, przyjmowaniu zbyt niskiej dawki leków oraz braku nadzoru nad skutecznością przeprowadzanej terapii, mogą prowadzić do rozwoju lekooporności. Lekooporność jest cechą dziedziczną, która utrzymuje się w populacji pasożytów na danym terenie (Borgsteede i in., 1989).

W ostatniej dekadzie obserwowany jest na świecie wzrost przypadków oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na antyhelmintyki (Kaplan i Vidyashankar, 2012; Vercruysse i in., 2018). Oprócz powodowania strat ekonomicznych w hodowlach zwierząt gospodarskich, zjawisko to może wpływać na populacje dzikich przeżuwaczy, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla żubra (Williams i in., 2002; Barone i in., 2020). Dotychczas brakuje danych

na temat skuteczności odrobaczania oraz lekooporności występującej u dzikich przeżuwaczy.

Należy rozważyć możliwość transmisji lekoopornych szczepów pasożytów między zwierzętami wolno żyjącymi, a hodowlanymi, wykorzystywanymi do produkcji żywności i *vice versa* oraz skutki takiego zjawiska (Barone i in., 2020). Rozwijająca się lekooporność, przejawia się między innymi potrzebą stosowania coraz wyższego stężenia substancji czynnej do osiągnięcia skuteczności odrobaczania (Gilleard, 2013). Wykazano oporność wielu gatunków pasożytów na wszystkie trzy grupy antyhelmintryków o szerokim spektrum działania, tj.: benzimidazole (np. fenbendazol), imidazotiazole (np. lewamizol) i hydropyrimidyny (np. pyrantel/morantel) oraz makrocycliczne laktony (np. awermektyna i milbemycyna) (Rose i in., 2015; Rose Vineer i in., 2020). Stanowi ona poważne zagrożenie dla hodowli przeżuwaczy i skutkuje zamykaniem ferm owiec, kóz i bydła na całym świecie (Howell i in., 2008; Oliveira i in., 2017). Dodatkowo problem opisywany jest także u innych gatunków - między innymi u koni, świń czy drobiu (Roepstorff i in., 2011; Peregrine i in., 2024; Zirintunda i in., 2022).

Rozprzestrzenianiu się lekoopornych szczepów pasożytów sprzyja przemieszczanie zarażonych zwierząt. Z tego powodu, każde nowo wprowadzane do stada zwierzę powinno być poddane uprzedniej kwarantannie i zabiegom odrobaczenia (Hławiczka 2008; Vadlejš i in. 2017). Na rozwój lekooporności pasożyta na daną substancję czynną mają wpływ podane i przyjęte zbyt niskie dawki leku, co często ma miejsce w przypadku podawania leków w paszy (Gundlach i Sadzikowski, 1990).

Wykładanie preparatów przeciwpasożytniczych, pomimo zakazu odrobaczania zwierzyny w stanie wolnym, jest nieskuteczne, ze względu na brak kontroli nad przyjmowanymi przez zwierzęta dawkami leków (Gundlach i Sadzikowski, 1990). Prowadzi to do rozwoju lekooporności pasożytów zwierząt dzikich, które mogą przenieść lekooporne szczepy na znaczne odległości, w tym do populacji innych gatunków zwierząt dziko żyjących oraz zwierząt gospodarskich (Vadlejš i in. 2017). W 2009 roku na rynku medycznym pojawiły się środki przeciwpasożytnicze z nowej grupy leków, pochodnych amino-acetonitrylu (Kaminsky i in., 2008), ale brak jest badań dotyczących stosowania ich u zwierząt nieudomowionych. Należy zaznaczyć, że na rynku medycznym, brakuje nowych substancji czynnych, służących zwalczaniu pasożytów opornych na aktualnie stosowane leki, co wynika głównie z wysokich kosztów wytworzenia i wprowadzenia do obrotu nowych substancji czynnych.

Szybszy rozwój lekooporności odnotowano w populacjach zwierząt, u których do odrobaczania stosowana była przez wiele lat ta sama substancja czynna (Michel, 1985). Według Bergera (1975), lekooporność *H. contortus* na fenbendazol rozwija się już po 6 latach stosowania tej substancji czynnej. *H. contortus* jest krwio pijnym nicieniem trawieńca domowych i dzikich przeżuwaczy, o dużym potencjale do wytworzenia lekooporności. Udowodniono, że rozwija ją najszybciej spośród wszystkich nicieni pasożytniczych. Lekooporność *H. contortus* dotyczy wszystkich grup antyhelmintyków i jest powszechna. W 2018 roku opublikowano doniesienie, dotyczące przypadku obniżonej skuteczności benzimidazoli w zwalczaniu nicieni z gatunku *H. contortus*, którym zarażone były żubry w szwedzkim Avesta Visentpark (Pyziel i in., 2018). Natomiast w 2022 roku opisano występowanie u żubrów w niemieckim Springe nicieni *H. contortus* opornych na fenbendazol i podejrzewanych o oporność na makrocykliczne laktony, aczkolwiek nie zostało to ostatecznie potwierdzone (Springer i in., 2022).

2.1. Metody badania lekooporności nicieni

Metodą *in vivo* wykorzystywaną do diagnostyki lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych na antyhelmintyki jest test redukcji liczby jaj w kale (ang. Fecal Egg Count Reduction Test, FECRT), który uznano za „złoty standard” zalecany przez World Association for Advance in Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Zaletami testu jest prostota wykonania, nieinwazyjność i możliwość wykorzystania go w badaniach terenowych. W przypadku nicieni żołądkowo-jelitowych z rodziny Trichostrongylidae metoda ta nie pozwala na identyfikację gatunku pasożyta na podstawie morfologii jaj, więc do określenia gatunku opornych na antyhelmintyki nicieni wymagane jest przeprowadzenie dodatkowych badań np. hodowli larw z kału (Coles i in., 1992, 2006).

Test rozwoju larw (ang. Larval Development Test – LDT) jest przeprowadzany na próbkach zbiorczych, inkubowanych przez 7-10 dni, aby umożliwić rozwój larw. Przy jego użyciu prowadzi się identyfikację gatunkową nicieni oraz ocenę skuteczności wszystkich grup stosowanych antyhelmintyków. Wykorzystuje się ją także do wykrycia opornych na benzimidazole szczepów nicieni (Coles i in., 1992, 2006).

Kontrola wylęgania się larw z jaj wyizolowanych z kału badanych zwierząt odbywa się z wykorzystaniem testu wykluwania jaj (ang. Egg Hatch Test, EHT), który służy do diagnostyki skuteczności leków z grupy benzimidazoli. Jaja, z których wylęgają się larwy,

są inkubowane w rosnących stężeniach tiabendazolu. Jaja, które pomimo zastosowania dawki tiabendazolu uznanej za zapobiegającą wylęganiu 99% wrażliwych jaj, oznaczane są jako odporne (Coles i in., 1992, 2006; von Samson-Himmelstjern i in., 2009).

Inną metodą uznawaną za „złoty standard” w wykrywaniu lekooporności nicieni jest badanie pozwalające policzyć żywe i nieżywe pasożyty obecne w organizmie żywiciela po odrobaczeniu. Badanie to wymaga uśmiercenia zwierząt, dlatego pozostaje bez zastosowania w diagnostyce prowadzonej na szeroką skalę, zwłaszcza w przypadku zwierząt będących pod ochroną (Wood i in., 1995). Badanie zwierząt dzikich, narażonych na wyginięcie oraz potencjalnie niebezpiecznych, wymaga opracowania metod łatwych, nieinwazyjnych oraz umożliwiających jego powtórzenie u badanych wcześniej osobników.

2. Cele pracy

Cele główne pracy

1. Ocena przydatności metod koproskopowych w kontroli zarażenia żubrów pasożytami wewnętrznymi.
2. Ocena skuteczności odrobaczania w kierunku nicieni żołądkowo-jelitowych żubrów, utrzymywanych w zagrodach zamkniętych w Polsce.
3. Określenie składu gatunkowego nicieni trawieńca żubrów w zagrodach w Polsce.

Cele szczegółowe pracy

1. Porównanie skuteczności metod Willis'a i McMaster'a w diagnostyce parazytologicznej żubrów.
2. Określenie prevalencji i intensywności zarażenia pasożytami żubrów w zagrodach zamkniętych.
3. Ocena wpływu bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie gatunkowe pasożytów przewodu pokarmowego żubrów.
4. Ocena skuteczności stosowanych schematów odrobaczania żubrów utrzymywanych w zagrodach pokazowych i w ośrodkach hodowlanych w Polsce.
5. Ustalenie składu gatunkowego nicieni trawieńca żubrów, żyjących w hodowlach zamkniętych metodami morfometrycznymi wraz z molekularnym potwierdzeniem identyfikacji gatunków.
6. Opisanie charakterystyki morfometrycznej nicieni trawieńca żubrów w celu stworzenia klucza umożliwiającego diagnostykę morfologiczną na podstawie rycin i danych pomiarowych.

3. Materiały i metody

Mając na uwadze ograniczony dostęp oraz unikalność materiału biologicznego pochodzącego od zwierząt objętych ścisłą ochroną gatunkową, jakimi są żubry, plan badań dopasowano do specyfiki pracy ze zwierzętami nieudomowionymi.

Żaden osobnik nie został uśmiercony w celach badawczych. Odstrzał żubrów został przeprowadzony przez wyznaczone osoby i zatwierdzony przez Generalną Dyрекcję Ochrony Środowiska w Polsce, na podstawie ustawy z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody. Wszystkie procedury zostały przeprowadzone zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami. Pobieranie i przechowywanie próbek do badań od martwych osobników odbywało się na podstawie decyzji Regionalnego Dyrektora Ochrony Środowiska w Warszawie. Zgodnie z tą decyzją zbieranie materiału od martwych zwierząt do celów naukowych nie wymaga zezwolenia. Zezwolenie zostało wydane na bezterminowe przechowywanie próbek biologicznych od żubra.

1. Materiał badawczy

Materiałem do badań koproskopowych oraz oceny skuteczności leków przeciwpasożytniczych były próbki kału żubrów pobierane zarówno bezpośrednio od zwierząt *per rectum* np. przy okazji immobilizacji farmakologicznych, jak i zbierane z wybiegów ośrodków hodowli, zagród pokazowych żubrów oraz z terenów występowania stad wolno żyjących [Publikacja 1 i 2]. Do badań nad składem gatunkowym nicieni żołądkowych żubrów zebrano trawienie, pobrane od zwierząt padłych z przyczyn naturalnych lub poddanych eutanazji ze względów hodowlanych i zdrowotnych. Trawienie pobrano w 9 zagrodach utrzymujących żubry w Polsce oraz z 4 populacji wolno żyjących [Publikacja 3].

1.1. Próbkę kału i obszar zbioru próbek

W ramach badań, opisanych w publikacji nr 1, zbadano 166 próbek kału, zebranych w latach 2008-2011 od czterech populacji żubrów wolno żyjących: w Puszczy Boreckiej (54.1222° N, 22.1036° E), Puszczy Białowieskiej (52.7229° N, 23.6556° E), Puszczy Knyszyńskiej (53.2167° N, 23.2500° E), w województwie zachodniopomorskim (53.4658° N, 15.1823° E) oraz w pięciu zagrodach: w Gołuchowie (51.8487° N, 17.9307° E), Pszczynie (49.9858° N, 18.9477° E), Smardzewicach (51.4728° N, 20.0262° E), Niepołomicach (50.0407° N, 20.2225° E) oraz zagrodzie pokazowej w Białowieży (52.7058° N, 23.8081° E) (Ryc. 1).

W ramach badań, opisanych w publikacji nr 2, przebadano 285 próbek kału, pobranych od 156 żubrów w latach 2018-2020 z 15 zagród, w tym z sześciu ośrodków hodowli żubra: w Białowieży (52.7052° N, 23.7174° E), Smardzewicach, Niepołomicach, Gołuchowie, Pszczynie-Jankowicach (50.0209° N, 19.0246° E) oraz Wolisku (54.1011° N, 22.0936° E); z pięciu ogrodów zoologicznych: Bałtowa (51.0105° N, 21.5495° E), Warszawy (52.2582° N, 21.0225° E), Ustronia (49.7192° N, 18.8325° E), Pszczyny (49.9785° N, 18.9305° E) i Poznania (52.4019° N, 16.9947° E) oraz czterech zagród pokazowych: w Białowieży (52.7058° N, 23.8081° E), Kiernusach (53.2033° N, 22.7150° E), w Międzyzdrojach (53.9341° N, 14.4779° E) oraz w Mucznej (49.1429° N, 22.7164° E) (Ryc. 1).

Łącznie do badań koproskopowych zakwalifikowano 451 próbek kału.



Rycina 1. Lokalizacja zagród i populacji wolno żyjących żubrów, od których uzyskano próbki wykorzystane do badań parazytologicznych. Na mapie zaznaczono także zagrody, w których żubry utrzymywane są w bliskim sąsiedztwie innych gatunków zwierząt kopytnych [Publikacja 2].

1.2. Trawienie i obszar zbioru próbek

W ramach przeprowadzonych badań, w latach 2018-2023 wykonano 30 sekcji parazytologicznych żubrów, w tym 23 zwierząt z hodowli zamkniętych oraz 7 pochodzących ze stad wolno żyjących (Tab. 1). Próbki pochodziły z czterech ośrodków hodowli żubrów: w Smardzewicach, Niepołomicach, Pszczynie-Jankowicach oraz Wolisku; z trzech ogrodów

zoologicznych: w Warszawie, Ustroniu i Bydgoszczy (53.1625° N, 18.0346° E), a także z zagród pokazowych w Kiermusach i w Mucznem oraz z czterech populacji wolno żyjących: Puszczy Boreckiej, Puszczy Białowieskiej, Puszczy Knyszyńskiej oraz Bieszczad (Ryc. 1). Wyróżniono trzy typy utrzymania zwierząt: zagrody z mniejszymi wybiegami, do których zaliczono zagrody pokazowe oraz ogrody zoologiczne; ośrodki hodowli żubra z dużą powierzchnią pastwisk oraz zwierzęta wolno żyjące.

Tabela 1. Lokalizacja i typ utrzymania żubrów, od których pobrano trawienie do badań wraz z liczbą zbadanych trawieńców w danej lokacji.

Typ utrzymania	Lokalizacja	Liczba zbadanych trawieńców
Zagroda pokazowa	Muczne	1
	Kiermusy	3
Ośrodek hodowli żubrów	Pszczyna-Jankowice	2
	Niepołomice	3
	Smardzewice	6
	Wolisko	3
Ogród zoologiczny	Bydgoszcz	1
	Ustroń	2
	Warszawa	2
Stada wolnościowe	Puszcza Białowieska	2
	Bieszczady	3
	Puszcza Borecka	1
	Puszcza Knyszyńska	1

2. Badania koproskopowe

Diagnostykę zarażeń pasożytniczych żubrów przeprowadzono z wykorzystaniem metod koproskopowych: metody McMaster'a, Willisa, Baermanna oraz dekantacji. Identyfikację jaj, oocyst i larw przeprowadzano na podstawie cech morfometrycznych do poziomu rodziny, rodzaju lub gatunku (Shore, 1939; Skryabin i in., 1991; Duszynski i Wilber, 1997; Taylor i in., 2007; Pyziel i in., 2014).

2.1. Metoda McMaster'a

Celem wykrycia jaj nicieni żołądkowo-jelitowych, jaj tasiemców oraz oocyst kokcydiów wykonywano badanie ilościowe zmodyfikowaną metodą McMaster'a z wykorzystaniem komory McMaster'a i roztworu sacharozy (SG = 1,27) (Tylor i in., 2007; Dryden i in., 2005; Blagburn i Butler, 2006; Pyziel i in., 2019). Pozwala ona na określenie liczby jaj i oocyst pasożytów w 1 gramie kału (EPG – eggs per gram; i OPG - oocysts per gram).

Zmodyfikowana metoda McMaster'a została wykorzystana do ilościowej oceny liczby EPG i OPG w próbkach kału (Jacobs i in., 2016) według Taylora i in., (2007). Próbkę kału o masie 3 gramów precyzyjnie rozcierano przez sitko w 42 ml wody, aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Przesącznikiem wypełniano 15 ml probówki i odwirowywano przez 2 min przy 2000 obr/min. Supernatant dekantowano, a probówkę wypełniono roztworem sacharozy. Osad i roztwór flotacyjny dokładnie mieszano za pomocą mechanicznego mieszadła, a zawiesiną ostrożnie wypełniano obie komory szkiełka McMaster'a, upewniając się, że w komorze nie pozostały pęcherzyki powietrza. Po 3-5 minutach tak przygotowany preparat oceniano pod mikroskopem przy powiększeniu $\times 100-400$ (Olympus BX50, Olympus, Japonia; OPTA-TECH, Polska) zgodnie z wytycznymi Roepstorffa i Nansena (1998). Wartości EPG i OPG obliczano, mnożąc sumę jaj i oocyst obserwowanych w obu komorach razy 50 (Foreyt, 2013)[Publikacja 1 i 2].

2.2. Metoda Willis'a

Metodę flotacji bezpośredniej w modyfikacji Willis'a (1921), przeprowadzono z wykorzystaniem wirówki wg Ziomko i Cencek (1999), w roztworze sacharozy wg Blagburna i Butlera (2006). Próbkę kału o masie 3 gramów przecierano przez sito w 10 ml roztworu flotacyjnego, przelewano do probówek i wirowano przez 2 minuty przy 2000 obr/min. Następnie probówki napełniano roztworem flotacyjnym do momentu uzyskania menisku wypukłego. Menisk przykrywano szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach 24 mm $\times$ 24 mm na 20 minut, umożliwiając przyleganie do szkiełka pływających oocyst i jaj. Po tym czasie szkiełko nakrywkowe przenoszono na szkiełko podstawowe i badano za pomocą mikroskopu świetlnego przy powiększeniu $\times 100-400$ (Olympus BX50, Olympus, Japonia). Chociaż metoda Willis'a jest metodą jakościową, a nie ilościową, jaja i oocysty pasożytów były liczone w każdej badanej próbce podczas oceny mikroskopowej, a szacunkowa liczba jaj pasożytów lub oocyst w trzech gramach kału została obliczona na podstawie masy próbek i objętości roztworu flotacyjnego (Jacobs i in., 2016) [Publikacja 1].

2.3. Metoda Baermanna

Larwy nicieni płucnych wykrywano metodą Baermanna (Eysker, 1997). Próbkę kału o masie trzech gramów umieszczano w gazie i następnie w lejku (o średnicy 5 cm, wysokości 7,5 cm i objętości 40 ml), zatykanym na końcu probówką typu Eppendorf i napełnianym wodą wodociągową. Próbkę inkubowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej (20-25°C). Następnie, porcje po 2 ml z końca lejka przelewano do wklęsłego szkiełka zegarkowego i

badano pod mikroskopem stereoskopowym (Delta Optical) przy powiększeniu x100 [Publikacja 2].

2.4. Metoda dekantacji

Próbki kału o masie trzech gramów przebadano pod kątem obecności jaj przywr metodą sedymentacyjną, wykonywaną w odstałej wodzie w szalkach Petriego (Pyziel i in., 2014). Próbki badano pod mikroskopem stereoskopowym (Delta Optical) przy 40-krotnym powiększeniu [Publikacja 2].

3. Ocena skuteczności odrobaczenia

W kolejnym etapie przeprowadzono próbę oceny skuteczności antyhelmintryków z grupy benzimidazoli, makrocyklicznych laktonów oraz imidazotiazoli, stosowanych u żubrów w ramach rutynowego jesiennego i wiosennego cyklu odrobaczeń w hodowlach zamkniętych. Pozwoliło to na uwzględnienie zjawiska wstrzymania w rozwoju larw nicieni żołądkowych w okresie jesienno-zimowym oraz skoku wiosennego.

Badaniu poddano 57 próbek kału, pobranych wiosną lub jesienią w ośmiu zagrodach żubrów w latach 2018-2020. Następnie oceniono skuteczność odrobaczania żubrów trzema grupami leków przeciwpasożytniczych, (benzimidazole, makrocykliczne laktony imidazotiazole), skierowanym przeciwko nicieniom żołądkowo-jelitowym.

Zwierzęta leczono następującymi preparatami: albendazolem (10 mg/kg m.c.; Valbazen 10%, Zoetis, Belgia) lub fenbendazolem (10 mg/kg m.c.; Fenbenat 40 mg/g, VETOS-FARMA, Polska) przez pięć kolejnych dni; iwermektyną (0,3 mg/kg m.c.; Iwermektyna Vetos-Farma 0,6g/100g, VETOS-FARMA, Polska) podawana jednorazowo lub lewamizolem (7,5 mg/kg m.c.; Lewamol 5%, Vetoquinol Biowet, Polska) podawanym jednorazowo.

W ogrodach zoologicznych w Ustroniu i Warszawie oraz w Ośrodku Hodowli Żubrów w Niepołomicach oszacowano masę ciała każdego żubra, a dawki leków przeciwpasożytniczych zmieszano z paszą i podano zwierzętom indywidualnie. W Ośrodkach Hodowli Żubrów w Białowieży i Gołuchowie, ogrodach zoologicznych w Poznaniu i Pszczynie oraz w zagrodach w Białowieży i Mucznem zwierzęta podzielono na grupy na podstawie oszacowanej masy ciała, a leki podawano mieszając je z paszą granulowaną. Dzień przed odrobaczaniem zwierzęta nie otrzymywały paszy treściwej, aby chętniej przyjęły dawkę odrobaczenia.

3.1. Test redukcji liczby jaj w kale

Do określenia skuteczności odrobaczenia żubrów w zagrodach zastosowano test redukcji liczby jaj w kale (FECRT - Fecal Egg Count Reduction Test), wykonywany na podstawie metody McMaster'a (Coles i in., 1992, 2006). FECRT jest uniwersalną dla wszystkich grup antyhelmintyków, najłatwiejszą do przeprowadzania metodą wykrycia lekooporności pasożytów. Test wymaga pobrania zindywidualizowanych próbek świeżego kału od zwierząt przed odrobaczeniem oraz odpowiednio po (Tab. 2).

Tabela 2. Liczba dni, w zależności od substancji czynnej, po podaniu ostatniej dawki preparatu przeciwpasożytniczego, po której należy ponownie pobrać próbkę do testu FECRT.

Grupy antyhelmintyków	Przykład substancji czynnej	Liczba dni po podaniu ostatniej dawki preparatu przeciwpasożytniczego
Benzimidazole	fenbendazol	8-10
Imidazotiazole	lewamizol	3-7
Makrocykliczne laktony	iwermektyna	14-17

Badanie zmodyfikowaną metodą McMastera przeprowadzono na 57 indywidualnych próbkach kału, jeden dzień przed planowanym zabiegiem odrobaczenia (kontrola przed leczeniem) i po leczeniu przeciwpasożytniczym (McKenna, 1994). Zgodnie z wytycznymi dla bydła (Coles i in., 2006), do analizy FECRT włączono tylko próbki z liczbą jaj w 1 gramie kału (EPG) wynoszącą 100 lub więcej (n=35) (Tab. 3.). Szczegółowe dane badanych zwierząt dostępne są w publikacji nr 2.

Tabela 3. Lokalizacja żubrów, od których pobrano próbki kału do badania FECRT z uwzględnieniem substancji czynnej użytej do odrobaczania wraz z liczbą próbek zakwalifikowanych do analizy FECRT.

Typ utrzymania	Lokalizacja	Użyta do odrobaczenia substancja czynna			Liczba próbek użytych do analizy FECRT
		Fenbendazol	Albendazol	Iwermektyna	
Zagroda pokazowa	Muczne		+		5
	Białowieża		+		4
Ośrodek hodowli żubrów	Niepołomice	+			1
	Gołuchów	+			3
	Gołuchów			+	2
	Białowieża			+	3
	Białowieża	+			3
Ogród zoologiczny	Pszczyna		+		6
	Ustroń		+		5
	Warszawa		+		3
Łącznie					35

Skuteczność odrobaczania oceniano zarówno w odniesieniu do nicieni z rodziny Trichostrongylidae (30 próbek), jak i *Trichuris* sp. (5 próbek). Pobieranie próbek do kontrolnego badania po leczeniu przeprowadzono w zależności od zastosowanego leku: benzimidazol 8-10 dni po odrobaczeniu, imidazotiazol 3-7 dni po odrobaczeniu, makrocycliczne laktony 14-17 dni po odrobaczeniu (Tab. 2).

Zmniejszoną skuteczność odrobaczania określono zgodnie z wytycznymi WAAVP: redukcja jaj w kale wynosi <95% i dolna granica przedziału ufności dla tej wielkości wynosi <90% (Coles i in., 1992, 2006). Analizę przeprowadzono przy użyciu modułu eggCounts-2.3 w wersji R 3.6.1, opracowanego na Wydziale Matematyki Uniwersytetu w Zurychu (Wang i Paul, 2018; Wang i in., 2018). Dokładne dane dotyczące przeprowadzonego badania FECRT dostępne są w publikacji nr 2.

4. Ocena wpływu bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie parazytofauny żubrów

Jeleniowate żyjące w niewoli, takie jak jelen szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna (*Capreolus capreolus*), daniel (*Dama dama*) i łoś (*Alces alces*) występowały w pobliżu ośrodków hodowlanych w Białowieży, Pszczynie-Jankowicach i Gołuchowie oraz w ośrodkach pokazowych w Bałtowie, Międzyzdrojach, Pszczynie i Ustroniu. Jedynym sąsiadującym

gatunkiem koniowatych był konik polski (*Equus Ferus Caballus*) w przypadku Ośrodka Hodowli Żubrów w Gołuchowie i ośrodka pokazowym w Białowieży. Przedstawicielami rodziny wołowatych były muflony (*Ovis aries musimon*) utrzymywane w bliskim sąsiedztwie żubrów w zagrodzie pszczyńskiej i w zoo w Ustroniu oraz oryksy szablrogi (*Oryx dammah*) żyjące blisko żubrów w warszawskim zoo.

Bliskość występowania innych gatunków kopytnych oceniono na podstawie odległości między wybiegami. Bliskie sąsiedztwo uznawano w przypadkach, gdy zagrody różnych gatunków zwierząt graniczyły przez ogrodzenie lub znajdowały się w tej samej części rezerwatu, ale były oddzielone ścieżką lub drogą. Lokalizacje, w których nie utrzymywano innych gatunków kopytnych, lub w których żubry znajdowały się w odległej części ośrodka, uznawano za niespełniające tych kryteriów [Publikacja 2].

5. Metodyka sekcji parazytologicznych

Sekcje parazytologiczne wykonywane były w terenie, zgodnie z zasadami techniki sekcyjnej i procedurami parazytologicznymi (Dróżdż, 1966; Malicka, 2008). Od każdego żubra pośmiertnie pozyskano i zabezpieczono do badań trawieniec z treścią pokarmową. Materiał transportowano do laboratorium i bezzwłocznie badano lub mrożono w -20°C i badano po rozmrożeniu.

Trawieńce umieszczano w odstałej wodzie, gdzie rozcinano ścianę trawieńca wzdłuż krzywizny większej celem wypłukania treści pokarmowej. Następnie treść poddawano dekantacji i sporządzano próbkę o objętości 1/10 całkowitej sedymentu. Następnie izolowano nicienie żołądkowo-jelitowe pod 40-krotnym powiększeniem mikroskopu stereoskopowego (Delta Optical) przy użyciu igły preparacyjnej. Wyizolowane nicienie liczono, rozdzielano na samce i samice i zabezpieczano w 70% etanolu [Publikacja 3].

6. Morfologiczna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów

Wyizolowane z 1/10 treści trawieńców samce nicieni żołądkowo-jelitowych wykorzystano do oznaczeń morfologicznych, ze względu na specyficzną gatunkowo budowę torebek kopulacyjnych. Dystalną część ciała odcinano skalpelem i umieszczano na 20 minut w laktofenolu w celu zwiększenia przezierności oskórka i uwidocznienia szczecinek kopulacyjnych. Resztę ciała danego osobnika umieszczono w fiolce z 70% etanolem, w celu późniejszej weryfikacji gatunkowej z wykorzystaniem technik biologii molekularnej. Po prześwieceniu w laktofenolu dystalne części ciała samców nicieni umieszczano na szkiełku podstawowym i oglądano pod mikroskopem świetlnym LAB 40 (OPTA-TECH, Poland)

przy powiększeniu $\times 100$ -400. Nicienie identyfikowano do poziomu gatunku na podstawie cech morfologicznych i długości szczecinek kopulacyjnych (Drózdź, 1966; Drózdź, 1995). Samice nicieni identyfikowane były do poziomu podrodziny [Publikacja 3].

7. Molekularna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów

Identyfikacji przy zastosowaniu technik biologii molekularnej poddano nicienie trawieńców oznaczone morfologicznie do gatunków *Ashworthius sidemi*, *Cooperia oncophora*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia leptospicularis*, *O. kolchida* (morfa *O. leptospicularis*), *O. ostertagi*, *O. lyrata* (morfa *O. ostertagi*), *Spiculoptera boehmi* i *Teladorsagia circumcincta*. Genomowe DNA wyizolowano z odciętych przednich części ciała samców nicieni z użyciem zestawu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy), zgodnie z protokołem producenta.

Do amplifikacji metodą PCR wybrano rybosomalne markery genetyczne kodujące wewnętrzne transkrybowane sekwencje rozdzielające 2 (ITS2) i dużą podjednostkę rybosomu (28S rRNA). W tym celu korzystano ze starterów reakcji PCR podanych przez Gasser i in., (1993), dających oczekiwany produkt o długości ok. 300 pz. Dodatkowo zaprojektowano 6 nowych par starterów amplifikujących fragmenty genu małej podjednostki rybosomu (18S rRNA), dających oczekiwane produkty o długości powyżej 1000 pz. Szczegółowe parametry reakcji PCR wraz z sekwencjami oligonukleotydów podano w publikacji nr 3. Rozdział produktów reakcji PCR prowadzono na 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) i markerem wielkości par zasad: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Otrzymane produkty reakcji PCR oczyszczano przy użyciu zestawu NucleoSpin Gel i PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) i sekwencjonowano w obu kierunkach przez Genomed S.A. (Warszawa, Polska), z użyciem starterów wcześniej użytych do amplifikacji (5mM). Sekwencje zostały złożone w kontigi przy użyciu CodonCode Aligner w wersji 8.0 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA). Uzyskane sekwencje nukleotydów zostały porównane z bazą danych NCBI sekwencji przy użyciu Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) i przesłane do bazy danych GenBank, gdzie otrzymały swoje numery dostępu. [Publikacja 3]. Szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonej diagnostyki molekularnej są dostępne w publikacji nr 3.

8. Analiza statystyczna

8.1. Porównanie metod McMaster'a i Willis'a

Wyniki prewencji zidentyfikowanych taksonów jaj i oocyst z gatunku *Eimeria* uzyskane metodą Willis'a oraz zmodyfikowaną metodą McMaster'a, porównano za pomocą testu McNemar'a. Dla taksonów, które wykazywały wyższą prewencję, skuteczność wykrywania pasożytów zmodyfikowaną metodą McMaster'a została określona przy użyciu modeli regresji logistycznej utworzonych dla każdego taksonu osobno. W każdym modelu zmienną zależną była obecność danego taksonu w próbce, wykryta zmodyfikowaną metodą McMaster'a, a zmienną niezależną była liczba jaj/oocyst tego taksonu wykrytych metodą Willis'a. Obecność taksonu w próbce była zawsze oznaczana jako 1, a jego brak jako 0.

Wykonano również trzy modele regresji liniowej, aby zweryfikować zależności między wynikami zmodyfikowanej metody McMaster'a i Willis'a dla każdego danego taksonu lub gatunku *Eimeria*: a) jaja/oocysty, b) gatunki *Eimeria*, c) jaja/oocysty i gatunki *Eimeria* w jednym modelu. Częstość występowania taksonu w zmodyfikowanej metodzie McMaster'a została wykorzystana jako zmienna zależna, a częstość występowania tego taksonu zgodnie z metodą Willis'a była zmienną niezależną. Wszystkie statystyki zostały wykonane przy użyciu oprogramowania SPSS (wersja 24.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA) [Publikacja 1].

8.2. Ocena wpływu bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie parazytofauny żubrów

Analizy statystyczne obejmowały wyniki dotyczące próbek kału uzyskanych od żubrów niepoddanych zabiegowi odrobaczania (n=207). Wpływ bliskiego sąsiedztwa innych zwierząt kopytnych na obecność pasożytów u żubrów został poddany analizie statystycznej przy użyciu dwóch uogólnionych modeli liniowych z rozkładem Poissona i funkcją wiążącą logarytm. Analiza została podzielona na dwie części (dwa modele) w oparciu o wyniki metody McMaster'a, gdzie w części pierwszej zmienną zależną była liczba gatunków stwierdzonych w każdej próbce pobranej od osobnika, a w części drugiej - liczba rodzajów wszystkich pasożytów wykrytych metodą McMaster'a, w tym *Eimeria* spp., bez rozróżnienia na gatunki. Płeć i wiek osobników żubra nie zostały uwzględnione z powodu niewystarczających danych indywidualnych.

Oba modele obejmowały dwie zmienne niezależne: sąsiedztwo (obecność innych zwierząt kopytnych w pobliżu zagrody żubrów) i sezon (porę roku) oraz interakcję sąsiedztwo*sezon. Wybór modelu został przeprowadzony poprzez analizę wszystkich wariantów modelu

(Burnham i Anderson, 2002). Modele uszeregowano według ich wartości AIC (kryterium informacyjnego Akaike) i uwzględniono ostatecznie najwyżej sklasyfikowany model z najniższym AIC [Publikacja 2].

8.3. Skład gatunkowy, prewalencja i intensywność zarażenia nicieniami trawieńca żubrów, a typ utrzymania zwierząt

Ze względu na niską intensywność inwazji nicieni u badanych żubrów, analiza statystyczna, pozwalająca na identyfikację czynników wpływających na intensywność inwazji nicieni, była ograniczona. Dlatego analiza została ograniczona do 2 obszarów. W pierwszym oceniano liczbę gatunków nicieni w zależności od typu utrzymania żubrów: zagrody (w tym ogrody zoologiczne), ośrodki hodowlane i stada wolno żyjące, przy użyciu testu Kruskalla-Wallisa z testem post-hoc Dunn z poprawką Bonferroniego.

Na podstawie liczby nicieni stwierdzanych dla poszczególnych gatunków, do szczegółowej analizy statystycznej wytypowano trzy gatunki: *H. contortus*, *O. ostertagi* i *O. lyrata*. Liczebność nicieni tych gatunków została oceniona pod kątem współliniowości przy użyciu współczynników korelacji *r* Pearsona i Tau-b Kendalla. Następnie, liczba nicieni każdego gatunku została przeanalizowana osobno w oparciu o uogólniony model liniowy z rozkładem ujemnym dwumianowym i funkcją wiążącą logarytm. Liczba nicieni u żubrów została potraktowana jako zmienna zależna, podczas gdy płeć żubrów, typ utrzymania i gradient północno-południowy zostały użyte jako zmienne objaśniające. Zmienna gradientu północ-południe została wprowadzona do analizy, aby uwzględnić wpływ szerokości geograficznej na występowanie różnych gatunków pasożytów (Thieltges i in., 2011; Klich i in., 2022). Na badanie to pozwalało rozmieszczenie geograficzne lokalizacji żubrów, od których pochodziły próbki (Ryc. 1). Każdy model został poddany selekcji porównującej wszystkie warianty modelu, a najwyżej sklasyfikowany model został wybrany na podstawie kryterium informacyjnego Akaike, tj. najwyższej wartości AIC (Burnham i Anderson, 2002). Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą IBM SPSS v29.0 (Armonk, Nowy Jork) [Publikacja 3].

Szczegółowy opis metodyki wykorzystanej w badaniach znajduje się w załączonych publikacjach nr 1-3.

4. Wyniki

1. Wyniki badań koproskopowych oraz porównanie skuteczności metod Willis'a i McMaster'a w diagnostyce parazytologicznej żubrów

W próbkach kału badanych żubrów stwierdzono jaja nicieni z rodziny Trichostrongylidae, z rodzajów *Aonchotheca*, *Nematodirus* i *Trichuris* oraz jaja tasiemców z rodzaju *Moniezia*. Ponadto, zidentyfikowano oocysty jedenastu gatunków kokcydiów z rodzaju *Eimeria*. Najwyższą prevalencję zarażenia zanotowano dla oocyst z rodzaju *Eimeria* (84,3% w metodzie Willis'a i 71,7% w metodzie McMaster'a) oraz dla jaj Trichostrongylidae (82,5% w metodzie Willis'a i 53,6% w metodzie McMaster'a), natomiast najniższą dla jaj tasiemców z rodzaju *Moniezia* (5,4% w metodzie Willis'a i 3% w metodzie McMaster'a). Wśród oocyst kokcydiów z rodzaju *Eimeria* najwyższą prevalencję zarażenia wykazano dla następujących gatunków: *E. bovis* (74,7% w metodzie Willis'a i 63,9% w metodzie McMaster'a), *E. zuernii* (39,8% w metodzie Willis'a i 24,7% w metodzie McMaster'a) oraz *E. ellipsoidalis* (29,5% w metodzie Willis'a i 12,6% w metodzie McMaster'a), a najniższą dla gatunków *E. subspherica* (1,2% w metodzie Willis'a i 2,4% w metodzie McMaster'a) oraz *E. brasiliensis* (1,8% w metodzie Willis'a i 1,2% w metodzie McMaster'a). Szczegółowe wyniki badań koproskopowych dostępne są w publikacji nr 1. Zarówno przy użyciu metody Willis'a, jak i McMaster'a, otrzymano zbliżone wyniki prevalencji zarażenia jajami/oocystami pasożytów, ale wyższą czułość badania wykazano dla metody Willis'a. Oznacza to, że przy zarażeniach o niskiej prevalencji większą szansę na zidentyfikowanie jaj i oocyst pasożytów zapewniała metoda Willis'a.

Na potrzeby interpretacji uzyskanych wyników, opracowano także wzory matematyczne, umożliwiające przeliczenie wartości prevalencji zarażenia pasożytami, otrzymanych w metodzie Willis'a na wynik w metodzie McMaster'a oraz odwrotnie. Przewidywanie tych wartości może mieć zastosowanie podczas przeglądu i porównania wyników, otrzymanych w poprzednich badaniach niezależnie od wybranej metody koproskopowej [Publikacja 1]. W badaniach opisanych w publikacji nr 2, z użyciem zmodyfikowanej metody McMaster'a wykryto oocysty *Eimeria* spp., jaja nicieni żołądkowo-jelitowych, należących do rzędu Strongylida, w tym przedstawicieli nadrodziny Strongyloidea i Trichostrongyloidea, nadrodziny Ascaridoidea, a także rodzajów *Trichuris*, *Nematodirus* i *Aonchotheca* oraz jaja tasiemców z rodzaju *Moniezia*. Obecność larw nicieni płucnych z rodzaju *Dictyocaulus* wykryto metodą Baermanna. Jaja przywr z rodzaju *Fasciola* i rodziny Paramphistomidae wykryto metodą sedymentacyjną.

Najwyższą prevalencję odnotowano w przypadku oocyst *Eimeria* (60,7%), jaj nicieni z rodziny Trichostrongylidae (50,9%), jaj *F. hepatica* (13,1 %), larw *D. viviparus* subsp. *bisontis* (12,3%) i jaj z rodzaju *Trichuris* (9,5%). Zidentyfikowano 11 gatunków kokcydiów, dla których najwyższą prevalencję w tym badaniu wykazano kolejno dla *E. bovis* (49,8%), *E. auburnensis* (18,6%) i *E. subspherica* (11,6%) [Publikacja 2].

Największą różnorodność rodzajów/gatunków jaj/oocyst pasożytów zaobserwowano w zagrodach w Pszczynie-Jankowicach i Gołuchowie (osiem rodzajów), a następnie w Wolisku, Ośrodku Hodowli Żubrów w Białowieży i Rezerwacie Pokazowym w Białowieży (sześć rodzajów). Największą różnorodność oocyst kokcydiów odnotowano u żubrów w zagrodzie w Pszczynie-Jankowicach (dziewięć gatunków), a następnie w Bałtowie i Muczmem (siedem gatunków) [Publikacja 2].

2. Ocena skuteczności odrobaczania w kierunku nicieni żołądkowo-jelitowych żubrów utrzymywanych w zagrodach zamkniętych w Polsce

Wszystkie uzyskane wyniki testu redukcji liczby jaj w kale (FECRT) wskazują na brak skuteczności stosowanych antyhelmintyków.

Najczęściej stosowane terapie przeciwpasożytnicze obejmowały odrobaczanie fenbendazolem (3 zagrody), albendazolem (5 zagród) oraz iwermektyną (2 ośrodki hodowli żubra) i okazały się nieskuteczne przeciwko nicieniom z rodziny Trichostrongylidae i z rodzaju *Trichuris*. Przypadki, w których do odrobaczenia użyto lewamizolu nie zakwalifikowały się do analizy FECRT z powodu zbyt niskich EPG w badaniu przed odrobaczeniem (EPG<100).

Spośród dwunastu analizowanych przypadków zabiegu odrobaczania tylko pięć uzyskało wynik FECRT >95%, ale żaden nie osiągnął dolnej granicy przedziału ufności >90%. Wyniki wskazują na możliwość występowania oporności nicieni z rodziny Trichostrongylidae na leki przeciwpasożytnicze z grupy benzimidazoli (albendazol i fenbendazol) oraz makrocyclicznych laktonów (iwermektyna) oraz oporność nicieni z rodzaju *Trichuris* na albendazol.

Dokładne wyniki analizy FECRT dla poszczególnych substancji aktywnych oraz opis ograniczeń związanych z badaniem FECRT są przedstawione w publikacji nr 2.

3. Wpływ bliskiego sąsiedztwa innych gatunków zwierząt kopytnych na zróżnicowanie parazytofauny żubrów

W kale żubrów utrzymywanych w zagrodach, będących w bliskiej odległości od wybiegów innych gatunków zwierząt kopytnych, zaobserwowano istotnie większą różnorodność sianych w kale jaj i oocyst. W przypadku kokcydiów z rodzaju *Eimeria* różnica była także zależna sezonowo. Mianowicie, jesienią i zimą notowano większą liczebność gatunków wśród opisywanych oocyst, natomiast wiosną nie obserwowano tej zależności. Szczegółowe informacje na temat otrzymanych wyników zawarte są w publikacji nr 2.

4. Skład gatunkowy i intensywność inwazji nicieni trawieńca żubrów w zależności od typu utrzymania zwierząt

4.1. Morfologiczna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów

W badaniu zidentyfikowano 11 gatunków nicieni trawieńca żubrów: *H. contortus*, *A. sidemi*, *O. ostertagi*, *O. lyrata* (morfa *O. ostertagi*), *O. leptospicularis*, *O. kolchida* (morfa *O. leptospicularis*), *T. circumcincta*, *C. oncophora*, *C. surbabad*, *S. boehmi* i *S. asymmetrica* (Ryc. 2). Wśród nich *H. contortus*, *A. sidemi*, *O. ostertagi*, *O. lyrata*, *O. kolchida*, *C. oncophora*, *S. boehmi* i *S. asymmetrica* występowały zarówno u zwierząt wolno żyjących, jak i utrzymywanych w niewoli. Z kolei, *T. circumcincta* i *C. surbabad* występowały tylko u żubrów w zagrodach, natomiast *O. leptospicularis* wyłącznie u zwierząt wolno żyjących.

Gatunki nicieni zostały zidentyfikowane na podstawie cech morfologicznych torebki kopulacyjnej i długości szczecinek kopulacyjnych samców nicieni. Dodatkowo opisano charakterystykę morfometryczną wykrytych gatunków nicieni trawieńca na podstawie szczegółowych wymiarów szczecinek kopulacyjnych specyficznych dla żywiciela zestawionych wraz z kolekcją zdjęć nicieni w formie zbiorczej ryciny (Ryc. 2) oraz tabeli umieszczonej w publikacji nr 3. Wyniki oznaczeń morfologicznych zostały potwierdzone w analizie molekularnej. Szczegółowe dane znajdują się w publikacji nr 3.



Rycina 2. Zdjęcia przedstawiają dystalne części ciała samców nicieni trawieńca żubrów z widocznymi torebkami kopulacyjnymi oraz szczecinkami kopulacyjnymi: 1 – *Ashworthius sidemi* ($\times 10$); 2 – *Haemonchus contortus* ($\times 10$); 3 a, b – *Ostertagia ostertagi* ($\times 20$); 4 a, b – *O. lyrata* ($\times 20$); 5 – *O. leptospicularis* ($\times 20$); 6 – *O. kolchida* ($\times 20$); 7 a, b – *Teladorsagia circumcincta* ($\times 10$); 8 – *Cooperia oncophora* ($\times 20$); 9 – *C. surnabada* ($\times 20$); 10 a, b – *Spiculoptergia boehmi* ($\times 20$); 11 – *S. asymmetrica* ($\times 20$).

4.2. Prewalencja i intensywność zarażenia nicieniami trawieńca żubrów

Ogólna prewalencja zarażenia nicieniami żołądkowymi u badanych żubrów wynosiła 90% (tj. 27 dodatnich z 30 przebadanych trawieńców). Mediana i średnia intensywności zarażenia wynosiły odpowiednio 725 i 5065,7 na zwierzę (zakres 0 – 47.030 nicieni na zwierzę). Najwyższa wartość ogólnej prewalencji była notowana w ośrodkach hodowli (100%), a następnie kolejno w stadach wolno żyjących (85,7%) i w zagrodach (w tym w ogrodach zoologicznych) (77,8%). Najpowszechniej stwierdzanym gatunkiem był gatunek *Ostertagia ostertagi* (prewalencja: 80%), a kolejne wysokie wartości prewalencji odnotowano dla: *H. contortus* (63,3%), *O. lyrata* (43,3%) i *O. kolchida* (30%).

Intensywność zarażenia pasożytami różniła się w zależności od typu utrzymania żubrów. W ośrodkach hodowli żubrów odnotowano wyższą intensywność zarażenia nicieniami żołądkowymi (10 – 21.230 pasożytów) niż w przypadku zagród (łącznie z ogrodami zoologicznymi) (10 – 610 pasożytów) oraz populacji wolno żyjących (10 – 800 pasożytów), w których wyniki nie wykazały znaczących różnic. Zarówno w przypadku zwierząt utrzymywanych w niewoli, jak i żyjących na wolności, najczęściej występującym gatunkiem nicienia był *O. ostertagi*. Najwyższe wartości mediany, średniej oraz intensywności zarażenia zaobserwowano dla *O. ostertagi* w ośrodkach hodowli żubrów (odpowiednio 87,5; 351,1; 10 - 21.230). U żubrów wolno żyjących najwyższą intensywność, medianę i średnią zarażenia odnotowano również dla *O. ostertagi* (odpowiednio 40 – 800; 5; 25,6).

W odniesieniu do typu utrzymania żubrów, zbliżone wartości prewalencji uzyskano dla *O. ostertagi* oraz *H. contortus* u zwierząt z wolności oraz utrzymywanych w niewoli, zarówno w zagrodach (wraz z ogrodami zoologicznymi), jak i ośrodkach hodowli żubrów. Natomiast największą różnicę zaobserwowano dla gatunku *A. sidemi*, który był drugim najczęściej występującym nicieniem trawieńca u żubrów ze stad wolnościowych (57,1%) i jednym z najrzadziej występujących u zwierząt w zagrodach i ośrodkach hodowli (4,3%). Nicienie gatunku *A. sidemi* stwierdzono u żubra w jednej zagrodzie (Muczne), w pobliżu której żyje wolna populacja żubrów, u której stwierdzono zarażenie tym gatunkiem (populacja w Bieszczadach).

U żubrów w ośrodkach hodowli wykryto znacznie wyższą intensywność zarażenia nicieniami należącymi do gatunków *O. ostertagi* i *O. lyrata* w porównaniu ze zwierzętami żyjącymi w zagrodach czy na wolności. Powyższa zależność nie została potwierdzona dla gatunku *H. contortus*, natomiast jego prewalencja zarażenia zmniejszała się wraz ze wzrostem szerokości geograficznej, co nie było zależne od typu utrzymania zwierząt ani

nie zostało potwierdzone dla pozostałych analizowanych gatunków nicieni (*O. ostertagi* i *O. lyrata*).

Szczegółowe dane na temat prevalencji i intensywności zarażenia nicieniami trawieńca oraz tabele z wynikami dla poszczególnych lokalizacji żubrów dostępne są w publikacji nr 3 oraz suplemencie do publikacji nr 3.

4.3. Molekularna identyfikacja nicieni trawieńca żubrów

Uzyskano sekwencje nukleotydowe 5 gatunków nicieni trawieńca, takich jak *A. sidemi* (GenBank: OP787564, OP320470), *H. contortus* (GenBank: OP783972, OP577478, OP320502), *O. ostertagi* (GenBank: OP787667), *O. kolchida* (GenBank: OP320518) i *S. boehmi* (GenBank: OP320506) (Tab. 4) (Ryc. 3). Żaden z zestawów użytych starterów nie okazał się na tyle uniwersalny, aby dostarczyć produkt PCR dla każdego gatunku nicieni uwzględnionych w badaniu. Spośród użytych zestawów starterów część była selektywnie użyteczna, tj. mogła dokładnie identyfikować tylko niektóre gatunki nicieni. Ogólny zestaw starterów zaproponowany przez Gasser i in., (1993) pozwolił na uzyskanie produktów w obrębie markerów genetycznych ITS2 i 28S rRNA gatunków *A. sidemi*, *H. contortus* i *O. ostertagi* o długości od 239 do 257 pz. Uzyskano produkty w obrębie markera genetycznego 18S rRNA gatunków *A. sidemi*, *H. contortus*, *O. kolchida* i *S. boehmi* o długości od 830 pz (*O. kolchida*) do 1211 pz (*S. boehmi*). Jeden z zestawów zaproponowanych przez nas starterów był użyteczny tylko dla *O. kolchida*, podczas gdy inny pozwolił na uzyskanie częściowych sekwencji w obrębie genu 18S rRNA trzech pozostałych gatunków nicieni. Szczegółowe dane dotyczące zestawów starterów użytych w badaniu dostępne są w publikacji nr 3.

Tabela 4. Uzyskane sekwencje nukleotydowe dla nicieni trawieńca żubrów utrzymywanych w niewoli.

Gatunek nicienia	Gen	Starter F	Starter R	Nr GenBank	Długość (pz)
<i>Ashworthius sidemi</i>	ITS2+LSU	NC1	NC2	OP787564.1	239
	SSU	N380F	N1690R	OP320470.1	1,132
<i>Haemonchus contortus</i>	ITS2+LSU	NC1	NC2	OP783972.1	255
	SSU	N380F	N1690R	OP577478.1	977
	SSU	N380F	N1690R	OP320502.1	1,191
<i>Ostertagia kolchida</i>	SSU	N350F	N1287R	OP320518.1	839
<i>Ostertagia ostertagi</i>	ITS2+LSU	NC1	NC2	OP787667.1	257
<i>Spiculopteragia boehmi</i>	SSU	N380	N1690R	OP320506.1	1,211

NC1: 5'- ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT - 3';

NC2: 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT - 3';

N380F: 5'- AAGCGAGCAGGCGCGAAAC - 3';

N1690R: 5'- ACCCGGTTCAAGCCATTGCCA - 3';

N350F: 5'-GAGCCTTAGAAACGGCTACCACATCCA - 3';

N1287R: 5'-AGCAGGCTAGAGTCTCGCTCGT - 3'

5. Dyskusja

Żubry żyjące w niewoli pełnią ważną funkcję rezerwuaru materiału genetycznego który, jak pokazuje historia, był już wykorzystywany w celu restytucji gatunku na wolności. W związku z tym, istotną kwestią jest prowadzenie stałego monitoringu zdrowia żubrów, w tym kontroli parazytologicznej. Do tej pory opisano u żubrów 88 gatunków pasożytów, czyli więcej, niż u spokrewnionych z nimi bizonów amerykańskich (Tessaro, 1989) czy innych gatunków dzikich kopytnych, zamieszkujących te same obszary m. in. łosi (*Alces alces*), jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*) czy danieli zwyczajnych (*Dama dama*) (Drózdź i in., 1997; Demiaszkiewicz, 2005; Burliński i in., 2011; Kowal i in., 2012). Ponad 60% gatunków nicieni, opisywanych u żubrów, to pasożyty występujące u domowych przedstawicieli rodziny Bovidae, a pozostałe to gatunki współdzielone z przedstawicielami rodziny Cervidae (Demiaszkiewicz, 2005; Karbowski i in., 2014a). Tak duża różnorodność gatunków pasożytów u żubrów może wynikać z historii gatunku, którego populacja została odtworzona z osobników utrzymywanych w niewoli. Ze względu na niską zmienność genetyczną gatunku, żubry są bardziej podatne na zakażenia chorobami zakaźnymi oraz inwazje pasożytnicze, co może wynikać z obniżonej ogólnej odporności (Kita i Anusz, 2006; Olech, 2019). W wyniku efektu „wąskiego gardła” doszło do zmian w populacji żywicieli, co doprowadziło także do zmian w populacji pasożytów, m. in. umożliwiając inwazję gatunków specyficznych dla pokrewnych żywicieli. Skutkiem tego mogą być bardziej nasilone objawy kliniczne powodowanych przez nie parazytoz, w porównaniu z przebiegiem choroby u głównego żywiciela (Cârstolovean i in., 2024; Pyziel i in., 2018). Przypadki śmiertelne spowodowane parazytozami były opisywane u żubrów zarażonych nowymi dla żywiciela pasożytami, takimi jak *A. sidemi* czy *Neospora caninum* (Drózdź i in., 1998; Cabaj i in., 2008).

Uzyskane w tej pracy wyniki są efektem najszerszych i najbardziej kompleksowych badań parazytologicznych przeprowadzonych w populacji żubrów utrzymywanych w zagrodach w Polsce. W badaniach koproskopowych, mających na celu porównanie skuteczności wykrywania jaj i oocyst pasożytów za pomocą różnych metod, metoda Willis’a wykazała wyższą czułość badania niż metoda McMaster’a, zwłaszcza w przypadku zarażeń o niskiej prewalencji. Oznacza to, że wykonanie badania metodą Willis’a zapewnia większe prawdopodobieństwo wykrycia jaj/oocyst pasożytów, które mogą nie zostać wykryte przy użyciu metody McMaster’a. Z tego względu zastosowanie metody Willis’a jest rekomendowane do przeprowadzania badań koproskopowych żubrów przed transportem. Translokacja zwierząt jest istotnym elementem działań ochronnych, ukierunkowanych na

zachowanie różnorodności genetycznej zagrożonych gatunków. W przypadku żubrów obejmuje ona relokację osobników zarówno ze stad żyjących w niewoli, jak i na wolności. Przy obecnym stanie wiedzy, niezbędne jest wykonywanie badań koproskopowych przed wyjazdem zwierzęcia oraz, w razie potrzeby, wdrożenie odpowiedniego odrobaczenia, a następnie sprawdzenie jego skuteczności (Hławiczka, 2008). Co więcej, zwierzę po przewiezieniu w nowe miejsce powinno być poddane przynajmniej 30-dniowej kwarantannie (Hławiczka, 2008; Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010; Kaczmarek-Okrój i in., 2016). Stres towarzyszący transportowi i relokacji zwierząt jest dodatkowym czynnikiem osłabiającym układ odpornościowy oraz wpływającym na zdolności adaptacyjne zwierząt w nowych lokalizacjach. Kontrola stanu zdrowia zwierząt, zarówno przed, jak i podczas relokacji, ma kluczowe znaczenie dla powodzenia działań ochronnych i restytucyjnych zagrożonych gatunków. Przy przeglądzie wyników badań koproskopowych, uzyskanych w poprzednio prowadzonych badaniach, pomocne może okazać się wykorzystanie opracowanych w tej pracy wzorów matematycznych, które pozwalają na przewidywanie prewalencji zarażenia pasożytami zidentyfikowanymi przy użyciu metody Willis'a, w oparciu o wyniki otrzymane przy użyciu zmodyfikowanej metody McMaster'a i odwrotnie. Uzyskane wyniki badań koproskopowych pod względem stwierdzonej różnorodności gatunkowej, prewalencji i intensywności zarażenia pasożytami korespondują z danymi dostępnymi dla żubrów żyjących w Europie Środkowej (Balčiauskas, 1999; Forte i in., 2012; Yurchanka i Anisimava, 2015), mimo że większość dostępnych badań parazytologicznych dotyczyła populacji wolno żyjących. Wszystkie gatunki pasożytów zidentyfikowane w tej pracy były wcześniej stwierdzane u żubrów w Polsce (Karbowski i in., 2014a; Demiaszkiewicz i in., 2014, 2022a). Najwyższą prewalencję ogólną stwierdzono dla oocyst pierwotniaków z rodzaju *Eimeria*, dla jaj nicieni żołądkowo-jelitowych z rodziny Trichostrongylidae, jaj *F. hepatica*, larw *D. viviparus* oraz jaj *Trichuris* sp. Wykryto 11 gatunków kokcydiów, a najwyższą prewalencję stwierdzono dla gatunku *E. bovis*, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Pyziel i in., 2011, 2018; Demiaszkiewicz i in., 2014, 2018, 2020a, 2022a; Klich i in., 2021). Liczebność gatunków pasożytów różniła się między przebadanymi zagrodami żubrów, a wyniki wykonanych badań sugerują, że obecność innych gatunków zwierząt kopytnych w sąsiednich zagrodach może dodatkowo wpływać na liczebność gatunków pasożytów u żubrów poprzez jej wzbogacenie. W przedstawionych badaniach podjęto także pierwszą zakrojoną na szeroką skalę próbę oceny skuteczności działania antyhelmintryków u żubrów, które żyją w niewoli. W teście FECRT wykazano nieskuteczność leków przeciwpasożytniczych z grupy benzimidazoli

(albendazol i fenbendazol) oraz makrocyclicznych laktonów (iwermektyna) przy zwalczaniu nicieni z rodziny Trichostrongylidae oraz nieskuteczność albendazolu przeciwko nicieniom z rodzaju *Trichuris* u żubrów w zagrodach w Polsce. W związku z niezadowalającymi wynikami stosowanego powszechnie leczenia przeciwpasożytniczego u żubrów należy podejrzewać możliwość rozwoju lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych u żubrów w zagrodach. Przypadki lekooporności nicieni były notowane na benzimidazole dla gatunku *H. contortus* u żubrów w zagrodach w Szwecji oraz w Niemczech (Pyziel i in., 2018; Springer i in., 2022). W okresie ostatnich 14 lat wykonano w Polsce wstępne badania tylko w jednej lokalizacji – rezerwacie pokazowym i ośrodku hodowli żubrów w Białowieży (Demiaszkiewicz i in., 2010; 2022 b). Przedstawione wyniki sugerują, aby zwrócić szczególną uwagę na analizę stosowanych schematów odrobaczenia, rotację substancji aktywnych oraz wybiegów dla zwierząt, aby zahamować rozwój lekooporności wśród pasożytów żubrów.

W ramach badań wykonano także test rozwoju larw (LDT) oraz wybrano standardowy protokół stosowany do testu wylęgania się larw z jaj nicieni (EHT) zwierząt gospodarskich (von Samson-Kimmelstjerna i in., 2009), jednak we wszystkich próbkach zakwalifikowanych do badania nie znaleziono wykłutych larw. Było to najprawdopodobniej spowodowane niewystarczającą liczbą jaj uzyskanych do badań (niskie EPG). Zwierzęta, od których pochodziły próbki były w dobrej kondycji, utrzymywane w małych stadach i regularnie odrobaczane, a zatem mogły wykazywać silną odporność na inwazje pasożytnicze, co przyczyniło się do niższych wartości EPG (Roy i Kirchner, 2000; Medzhitov i in., 2012; Budischak i in., 2018). Badania przeprowadzone w ramach tej pracy pozwoliły na zebranie i zabezpieczenie materiału genetycznego nicieni obecnych w trawieńcach żubrów z różnych zagród, także w tych, w których przeprowadzony był test FECRT, a więc możliwe będzie kontynuowanie badań w tym zakresie. Badania przy użyciu technik biologii molekularnej umożliwią wykrycie obecności ewentualnych genów lekooporności u zgromadzonych nicieni trawieńca żubrów oraz zestawienie otrzymanych wyników z danymi pochodzącymi od innych dzikich przeżuwaczy, w tym jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*) i saren (*Capreolus capreolus*), które mogą być żywicielami dla tych samych gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych.

Wyniki badania składu gatunkowego nicieni trawieńca okazały się zbliżone u żubrów w niewoli oraz na wolności, a także korespondowały z danymi opublikowanymi przez innych autorów (Dróżdż i in., 1994; Karbowski i in., 2014 a i b; Demiaszkiewicz i in., 2020). Nicienie trawieńca są jednymi z najważniejszych pasożytów żubrów i innych przeżuwaczy

(Karbowski i in., 2014 b), a ogólna prevalencja zarażenia w prezentowanych badaniach była wysoka i sięgała 90%. Mediana i średnia intensywność inwazji były niższe niż te odnotowane w poprzednich badaniach żubrów w Polsce (Drózd i in., 1989; Demiaszkiewicz i in., 2018; Kołodziej-Sobocińska i in., 2018). Niższa intensywność inwazji może być związana ze sposobem utrzymywania zwierząt, np. zwierzęta w niewoli są regularnie odrobaczane, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się chorób pasożytniczych (Viggers i in., 1993). Niemniej jednak, intensywność inwazji była wyższa u żubrów utrzymywanych w ośrodkach hodowli w porównaniu do zwierząt utrzymywanych w zagrodach i ogrodach zoologicznych oraz w stadach wolno żyjących, co może wynikać z większego zagęszczenia zwierząt, bliskości innych gatunków, stresu i specyficznych warunków środowiskowych (Papini i in., 2012).

Wyzolowano 11 gatunków nicieni trawieńca, a najczęściej występującym nicieniem był *O. ostertagi*, pasożyt typowy dla bydła i uważany za jeden z najpowszechniej występujących nicieni trawieńca żubrów, zarówno u zwierząt żyjących w niewoli, jak i wolno żyjących (Karbowski i in., 2014 b). Inne pasożyty typowe dla bydła, takie jak *H. contortus* i *O. lyrata* również występowały bardzo powszechnie, tak samo jak *O. kolchida*, gatunek charakterystyczny dla jeleniowatych. Podczas reintrodukcji żubr stał się żywicielem wielu gatunków pasożytów pierwotnie charakterystycznych dla innych ssaków (Drózd i in., 1998, 2002), co potwierdzono w wynikach tej pracy. Co więcej, przemieszczanie zwierząt wiąże się zarówno z ryzykiem transmisji krzyżowej (Walker i Morgan, 2014), ale także przeniesienia inwazyjnego gatunku do innych hodowli zwierząt, podobnie jak stało się to w przypadku przeniesienia nicieni gatunku *A. sidemi* z populacji białowieskiej do Czech (Vadlejch i in., 2017).

Na rozprzestrzenianie się inwazji pasożytniczych wpływa wiele czynników środowiskowych i indywidualnych (Kołodziej-Sobocińska, 2019), można więc oczekiwać różnic w składzie gatunkowym pasożytów między zwierzętami żyjącymi w niewoli i na wolności. W przedstawionej pracy główna różnica polegała na powszechnym występowaniu inwazyjnego gatunku *A. sidemi* u żubrów w warunkach wolnościowych i tylko jednego przypadku odnotowania tego gatunku w zagrodzie w Mucznie. Zagrodę tę otacza kompleks leśny z bytującą tam populacją wolno żyjącą żubrów oraz innych zwierząt kopytnych, co sugeruje możliwość zarażenia się osobników w zagrodzie od tych na wolności w sposób pośredni lub bezpośredni (Klich i in., 2023). W przeprowadzonych badaniach dwa gatunki nicieni, *Teladorsagia circumcincta* i *Cooperia surnabada*, zostały wyizolowane tylko od żubrów w niewoli. Oba nicienie są uważane za typowe pasożyty domowych przeżuwaczy i

były rzadko opisywane u zwierząt wolno żyjących (Demiaszkiewicz i Pyziel, 2010; Karbowski i in., 2014 b). Natomiast gatunek *O. leptospicularis* nie występował u zwierząt żyjących w niewoli, a wyizolowany był jedynie od żubrów wolno żyjących. *Ostertagia leptospicularis* jest przede wszystkim pasożytem jeleniowatych (Wyrobisz-Papiewska i in., 2021), ale zaadaptował się do wolno żyjących żubrów w wyniku międzygatunkowej transmisji pasożyta (Drózd i in., 1989; Karbowski i in., 2014b). Wcześniejsze badania wskazują, że parazytofauna wolno żyjących żubrów może być wzbogacona o gatunki typowe dla jeleniowatych, które rzadko występują u osobników żubrów żyjących w niewoli (Drózd i in., 2002).

W przypadku jednego z najczęściej obserwowanych gatunków, *H. contortus*, stwierdzono, że intensywność zarażenia zmienia się w zależności od szerokości geograficznej. Inni autorzy również donoszą o tendencji do zwiększania liczby gatunków pasożytów stwierdzanych podczas oddalania się od równika. Nie ma jednak silnych dowodów wskazujących, że szerokość geograficzna ma bezpośredni wpływ na parazytofaunę ssaków (Kamiya i in., 2014). Bardziej prawdopodobne jest, że na równoleżnikowe wzorce różnorodności pasożytów wpływa pośrednio kilka dodatkowych czynników, takich jak temperatura, opady i dostępność żywicieli (Villalobos-Segura i in., 2020).

W ramach badań morfologicznych wykonano liczne zdjęcia i pomiary szczecinek kopulacyjnych nicieni trawieńca, które znacząco ułatwią identyfikację pasożytów izolowanych z trawieńców i pozwolą w przyszłości na dokumentowanie zmian morfometrycznych nicieni, które adaptują się do nowych żywicieli, np. różnice długości spikul gatunków nicieni występujących u różnych gatunków żywicieli (Pyziel-Serafin i in., 2023). Identyfikacja morfologiczna nicieni została potwierdzona metodami molekularnymi i uzyskano sekwencje nukleotydowe w obrębie markera genetycznego 18S rRNA dla 5 gatunków nicieni: *A. sidemi*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. kolchida* i *Spiculopteragia boehmi*. W przeprowadzonych badaniach uzyskano sekwencję nukleotydową *O. kolchida* (GenBank: OP320518.1), będącą pierwszą sekwencją udostępnioną w GenBank, dotyczącą jakiegokolwiek markera genetycznego tego gatunku. Podobnie, uzyskana sekwencja fragmentu genu 18S rRNA gatunku *S. boehmi* (GenBank: OP320506.1) jest pierwszą dostępną sekwencją dla tego markera genetycznego i jednocześnie pierwszą sekwencją nukleotydową dla *S. boehmi* wyizolowaną od żubra. Ponadto, uzyskana sekwencja ITS2 i 28S rRNA gatunku *O. ostertagi* (GenBank: OP787667.1) jest drugą dostępną sekwencją nukleotydową dotyczącą wspomnianych markerów genetycznych tego nicienia wyizolowanego od żubra. Poprzednie dane molekularne dotyczące tego gatunku uzyskano

od żubra nizinno-kaukaskiego z Avesta Visentpark w Szwecji (GenBank: KX358862.1) (Pyziel i in., 2018). Natomiast sekwencje nukleotydowe nicieni krwio pijnych *H. contortus* i *A. sidemi* zostały opublikowane także przez innych autorów. Oprócz danych dotyczących *H. contortus* uzyskanych w tym badaniu (GenBank: OP577478.1, OP320502.1), w GenBanku dostępne są sekwencje nukleotydowe tego nicienia od żubrów zamieszkujących Almindingen na duńskiej wyspie Bornholm (GenBank: ON677956.1, ON677957.1, ON677958.1) i Avesta Visentpark w Szwecji (GenBank: KX358860.1) (Pyziel i in., 2018). Opublikowane przez nas sekwencje gatunku *A. sidemi* wyizolowanego od żubra (GenBank: OP787564.1, OP320470.1) są trzecimi dostępnymi w GenBanku sekwencjami gatunku od tego żywiciela. Poprzednie dane pochodzą z terenu Polski (Moskwa i in., 2014) (GenBank: KF414629.1) oraz Czech (Vadlejch i in., 2017) (GenBank: KX228148.1, KX228149.1).

Prowadzenie monitoringu parazytologicznego żubrów jest częścią kompleksowej oceny stanu zdrowia zwierząt, która ma na celu zwiększenie skuteczności działań restytucyjnych dotyczących zagrożonych gatunków (Kołodziej-Sobocińska i in., 2018). Zarządzanie populacjami, w tym plan zwalczania chorób zakaźnych oraz inwazyjnych, ma kluczowe znaczenie dla ogólnej poprawy dobrostanu żubrów, ale również skutecznego monitorowania krytycznych punktów w programach ochrony gatunkowej. Zastosowanie w tej pracy różnych metod badawczych pozwoliło na dokładniejszą ocenę populacji żubrów żyjących w niewoli pod kątem różnic w prevalencji i intensywności zarażenia oraz składu gatunkowego pasożytów wewnętrznych. Przekłada się to, nie tylko na zdrowie zwierząt w niewoli, ale także, w przypadku zwierząt wypuszczanych na wolność, na gatunki endemiczne występujące na danym terenie (Buchmann i in., 2022; Cârstolovean i in., 2024). Mimo poprawy stanu populacji żubra, gatunek ten wciąż wymaga ochrony czynnej (Olech i in., 2019). Z tego względu, istotne jest kontynuowanie monitoringu stanu zdrowia populacji żubrów w Polsce i na świecie oraz doskonalenie metodyki powszechnie stosowanych badań u żubrów. Wdrożenie działań mających na celu ograniczenie narażenia żubrów na nowe choroby, a także rozwoju lekooporności patogenów, zwiększa szansę powodzenia programu restytucji gatunku.

6. Wnioski

1. Rekomenduje się stosowanie metody Willis'a jako bardziej czulej od zmodyfikowanej metody McMaster'a, co ma szczególne znaczenie przy niskich wartościach jaj i oocyst sianych w kale.
2. W oparciu o wyniki otrzymane przy użyciu metody Willis'a możliwe jest oszacowanie prewalencji zarażenia pasożytami dla zmodyfikowanej metody McMaster'a i odwrotnie; co może być przydatne przy przeglądzie wyników badań koproskopowych uzyskanych w poprzednio prowadzonych badaniach.
3. Najwyższą prewalencję zarażenia u żubrów odnotowano w przypadku oocyst *Eimeria* spp., jaj nicieni z rodziny Trichostrongylidae, jaj *F. hepatica*, larw *D. viviparus* i jaj *Trichuris* sp.
4. Ocena skuteczności odrobaczania żubrów w zagrodach wykonana przy użyciu testu redukcji liczby jaj w kale (FECRT) we wszystkich przebadanych przypadkach wykazała brak skuteczności stosowanych antyhelmintyków. Określono występowanie lekooporności nicieni żubrów, co wymaga kontynuacji badań, modyfikacji stosowanych schematów odrobaczania oraz kontroli koproskopowej żubrów przed transportem do innych lokalizacji.
5. Obecność różnych gatunków zwierząt kopytnych w bliskim sąsiedztwie żubrów ma pozytywny wpływ na zwiększenie różnorodności gatunków pasożytów wykrywanych u żubrów.
6. Gatunek krwio pijnego nicienia *H. contortus* dominuje u żubrów utrzymywanych w zagrodach, natomiast *A. sidemi* to dominujący gatunek nicieni trawieńca żubrów wolno żyjących.
7. Tylko w jednej zagrodzie stwierdzono obecność *A. sidemi* w treści trawieńca żubra.
8. Opracowany klucz morfometryczny umożliwia identyfikację gatunków nicieni trawieńca żubra na podstawie morfologii i długości szczecinek kopulacyjnych poszczególnych gatunków nicieni trawieńca występujących u tego żywiciela.
9. Uzyskano sekwencje nukleotydowe dla 5 gatunków nicieni: *A. sidemi*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. kolchida* i *S. boehmi*. Sekwencja nukleotydowa otrzymana dla *O. kolchida* jest pierwszą dostępną sekwencją tego gatunku, a sekwencja nukleotydowa fragmentu genu 18S rRNA *S. boehmi* jest pierwszą dostępną sekwencją tego markera genetycznego oraz jednocześnie pierwszą dostępną sekwencją *S. boehmi* od żubra.

7. Piśmiennictwo

1. Balčiauskas L. (1999) European bison (*Bison bonasus*) in Lithuania: status and possibilities of range extension. *Acta Zoologica Lituanica*. 9(3):3-18.
2. Barone C.D., Wit J., Hoberg E.P., Gilleard J.S., Zarlenga D.S. (2020) Wild ruminants as reservoirs of domestic livestock gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 279, 109041.
3. Berger J. (1975) The resistance of a field strain of *Haemonchus contortus* to five benzimidazole anthelmintics in current use. *Journal of the South African Veterinary Association*. 46(4):369-72.
4. Blagburn B.L., Butler J.M. (2006) Optimize intestinal parasite detection with centrifugal fecal flotation: if you're not using this technique, you may be overlooking parasitic, and potentially zoonotic, disease. Centrifugation has a higher sensitivity in detecting parasites than simple flotation. And a centrifuge is less expensive and cumbersome than many practitioners think. *Veterinary medicine*. 101(7):455-64.
5. Borgsteede F.H., Duyn S.P. (1989) Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. *Research in Veterinary Sciences*. 47(2):270-2.
6. Bowman D.D. (2012) *Georgis Parazytologia weterynaryjna*. Saunders Elsevier, St Louis wyd. 9.
7. Buchmann K., Christiansen L.L., Kania P.W., Thamsborg S.M. (2022) Introduced European bison (*Bison bonasus*) in a confined forest district: A ten year parasitological survey. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 18:292-9.
8. Budischak S.A., O'Neal D., Jolles A.E., Ezenwa V.O. (2018) Differential host responses to parasitism shape divergent fitness costs of infection. *Functional Ecology*. 32, 324–333.
9. Burlinśki P., Janiszewski P., Kroll A., Gonkowski S. (2011) Parasitofauna in the gastrointestinal tract of the cervids (Cervidae) in northern Poland. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 61, 269–282.
10. Burnham K.P., Anderson D.R., (Ed. 2nd) (2002) *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. Springer, New York.
11. Cabaj W., Goździk K., Bień J., Moskwa B. (2008) *Neospora caninum* u żubrów — świadomość problemu. *European bison Conservation Newsletter*, 1, 53–64.

12. Cârstolovean A.S., Taulescu M., Hodor D., Cotuțiu V.D., Aldea A.M., Șerban C.C., Cazan C.D., Gherman C.M., Mihalca A.D. (2024) A case of mortality in a re-introduced European bison associated with severe pneumonia caused by *Dictyocaulus viviparus*. BMC Veterinary Research. 20(1):423.
13. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology 44, 35–44.
14. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruysse J. (2006) The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology 136, 167–185.
15. Demiaszkiewicz A.W. (2005) Helminty i wywoływane przez nie helmintozy dzikich przeżuwaczy. KOSMOS. Problemy Nauk Biologicznych, 54, 61-67.
16. Demiaszkiewicz A., Lachowicz J., Kuligowska I., Goliszewska A. (2006) Wzrost zarażenia żubrów w Puszczy Białowieskiej przywrami wątrobowymi. W: Perspektywy rozwoju populacji żubrów (W. Olech ed.) Wyd. ARTISCO, Goczałkowice-Zdrój: 79-84.
17. Demiaszkiewicz A., Lachowicz J. (2007) Wzrost zarażenia żubrów helmintami w Puszczy Białowieskiej. W: Rola hodowli *ex situ* w procesie restytucji żubra (W. Olech ed.). Lasy Państwowe, Gołuchów: 12-16.
18. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A., Lachowicz J. (2008) Stan zarażenia żubrów w Puszczy Białowieskiej helmintami w sezonie zimowym 2007/2008. European Bison Conservation Newsletter. 1: 42-53.
19. Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J., Osinska B. (2009a) *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Białowieża Forest. Polish journal of veterinary sciences. 12(3):385.
20. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Lachowicz J., Kuligowska I. (2009b) Dictyocaulosis of European bison in Białowieża forest. European bison conservation Newsletter. 2:112-8.
21. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M. (2009) Występowanie kokcydiów z rodzaju *Eimeria* u żubrów w Puszczy Białowieskiej. Wiadomości Parazytologiczne 55(1), 27-30.

22. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A. M. (2010) Kształtowanie się helmintofauny żubrów w Puszczy Białowieskiej. W: Ochrona żubra w Puszczy Białowieskiej. Zagrożenia i perspektywy rozwoju populacji. (R. Kowalczyk, D. Ławreszuk, M. Wójcik eds.) ZBS PAN Białowieża: 63-74.
23. Demiaszkiewicz A.W., Krzysiak M.K., Pyziel A.M., Kuligowska I., Lachowicz J. (2010) Efficacy of anthelmintic treatment of wild ruminants in European Bison Show Reserve in Białowieża National Park. *Życie Weterynaryjne* vol. 85; 6, 532-534.
24. Demiaszkiewicz A. W. (2014). Migrations and the introduction of wild ruminants as a source of parasite exchange and emergence of new parasitoses. *Annals of Parasitology*, 60(1).
25. Demiaszkiewicz A.W, Pyziel A.M, Kuligowska I., Lachowicz J. (2014) Monitoring of parasite infections in the European bison from three forests of north-eastern Poland (Białowieża primeval forest, borecka forest, knyszyńska forest) in 2011-2013. *European Bison Conservation Newsletter*, 7, 35-42.
26. Demiaszkiewicz A.W., Merta D., Kobielski J., Filip K.J., Pyziel A.M. (2017) Expansion of *Ashworthius sidemi* in red deer and roe deer from the Lower Silesian Wilderness and its impact on infection with other gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitologica*, 62, 853-857.
27. Demiaszkiewicz A.W., Bielecki W., Rodo A., Pyziel A.M., Filip K.J. (2018) Parasitofauna of European bison *Bison bonasus* (L.) in Borecka Forest. *Medycyna Weterynaryjna* 74 (4), 253-256.
28. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Filip-Hutsch K., Januszczak M., Olech W.A. (2020a) Parasitological monitoring of European bison in the Bieszczady Mountains. *Medycyna Weterynaryjna* 76 (2), 111-114.
29. Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Lachowicz J., Filip-Hutsch K. (2020b) Occurrence of tapeworms *Moniezia benedeni* (Moniez, 1879) in European bison *Bison bonasus* L. in Białowieża Primeval Forest. *Annals of Parasitology*. 2020;66(1).
30. Demiaszkiewicz A.W., Filip-Hutsch K., Olech W. (2022a) Parasitological monitoring of European bison in the West Pomeranian voivodeship on the basis of coproscopical examination. *Medycyna Weterynaryjna*. 77, 6717–2022.
31. Demiaszkiewicz A.W., Balinska P., Plis-Kuprianowicz E., Krzysiak M.K. (2022b) An attempt to deworm European bison (*Bison bonasus*) in the European Bison

- Breeding Center of Białowieża National Park with Alphasen (albendazole). *Annals of Parasitology*. 68(4), 829-832.
32. Drózd J. (1961) A study on helminths and helminthiases in bison, *Bison bonasus* (L.) in Poland. *Acta Parasitologica Polonica*, 9:55-96.
 33. Drózd J. (1966) Studies on helminths and helminthiases in Cervidae II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. *Acta Parasitologica* 14, 1–13.
 34. Drózd J., Demiaszkiewicz A., Lachowicz J. (1989) The helminth fauna of free-ranging European bison, *Bison bonasus* (L.). *Acta Parasitologica* 34: 117-124.
 35. Drózd J. (1994) Sprawozdanie z działalności Towarzystwa w 1994 r. : Sprawozdanie z działalności Wydziałów : Wydział IV nauk biologicznych : Referaty i streszczenia : Losy żubra a jego parazytofauna w ostatnim stuleciu. *Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego* 57, 89-100.
 36. Drózd J. (1995) Polymorphism in the Ostertagiinae (Lopez-Neyra, 1947) and comments on the systematics of these nematodes. *Systematic Parasitology* 32, 91–99.
 37. Drózd J., Malczewski A., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J. (1997) The helminthofauna of farmed deer (Cervidae) in Poland. *Acta Parasitologica*, 42, 225–229.
 38. Drózd J., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J. (1998) *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagarini*. *Acta Parasitologica*, 43, 75–80.
 39. Drózd J. (2001) Ognisko aswortiozy dzikich przeżuwaczy w Bieszczadach. *Magazyn Weterynaryjny* 10, 66-68.
 40. Drózd J., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J. (2002) Exchange of gastrointestinal nematodes between roe and red deer (Cervidae) and European bison (Bovidae) in the Bieszczady Mountains (Carpathians, Poland). *Acta Parasitologica* 47, 314–317.
 41. Drózd J., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J. (2003) Expansion of the Asiatic parasite *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Polish territory. *Parasitology Research*. 89:94-7.
 42. Dryden M.W., Payne P.A., Ridley .R, Smith V. (2005) Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*. 6(1):15-28.

43. Duszynski D.W., Wilber P.G. (1997) A guideline for the preparation of species description in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology*. 83, 333-336.
44. Eysker M. (1997) The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves. *Veterinary parasitology*. 69(1-2):89-93.
45. Filip K.J., Demiaszkiewicz A.W. (2016a) Internal parasitic fauna of elk (*Alces alces*) in Poland. *Acta Parasitologica*. 61(4):657-64.
46. Filip K.J., Pyziel A.M., Demiaszkiewicz A.W. (2016b) A massive invasion of *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* in elk (*Alces alces*) in Lublin Province, Poland. *Annals of Parasitology*. 62(2).
47. Filip-Hutsch K., Laskowski Z., Myczka W., Czopowicz M., Moskwa B., Demiaszkiewicz A.W. (2022) The occurrence and molecular identification of *Thelazia* spp. in European bison (*Bison bonasus*) in the Bieszczady mountains. *Scientific Reports* 12, 22508.
48. Forte C., Diaferia M., Manganelli E., Piergili Fioretti D., Trabalza Marinucci M., Olivieri O. (2012) The European Bison living in the National Park of Poloniny, Slovakia: dietary habits and dynamics of endoparasite population. *Biosférické Rezeervácie na Slovesku IX*.(edit. R. Midriak) Zborník referátov. 9:50-7.
49. Foreyt W. J. (2013) *Veterinary parasitology reference manual*. John Wiley & Sons.
50. Gagarin V.G., Nazarova I.S. (1966) Formirovanie gelmintofauny zubra v svyazi s ego rasseleniem po Sovetskomu Soyuzu. In: *Gel'minty Zhivotnykh Kirgizii i Sopredelnykh Territorii*. Izd. ILIM, Frunze, 62–65.
51. Gasser R.B., Chilton N.B., Hoste H., Beveridge I. (1993) Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research* 21, 2525–2526.
52. Gilleard J.S. (2013) *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology* 140, 1506-1522.
53. Gundlach J.L., Sadzikowski B. (1990) Lekooporność nicieni [Resistance of nematodes to antiparasitic drugs]. *Medycyna Weterynaryjna* 46(11): 429–432.
54. Hławiczka M. 2008. How European bison should be transported. *Proc. of the 1st International European Bison Congress*, Hardehausen, 9–12 Sept.
55. Howell S.B., Burke J.M., Miller J.E., Terrill T.H., Valencia E., Williams M.J., Williamson L.H., Zajac A.M., Kaplan R.M. (2008) Prevalence of anthelmintic

- resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 233:1913-9.
56. Jacobs D., Fox M., Gibbons L., Hermosilla C. (2015) *Principles of veterinary parasitology*. John Wiley & Sons; 2015 Oct 5.
 57. Jaros Z., Valenta Z., Zajicek D. (1966) A list of helminths from the section material of the zoological garden of Prague in the years 1954–1967. *Helminthologia*, 7, 281–290.
 58. Kaczmarek-Okrój M., Bruczyńska M., Wojciechowska M., Klich D., Głowacz K., Gajewska K., Olech W. (2016) Rules of capture and transport of wisent from Poland to other European countries. *European bison Conservation Newsletter*. 9 (2016), 71-86.
 59. Kaplan R.M., Vidyashankar A.N. (2012) An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*. 186(1-2):70-8.
 60. Karbowski G., Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Wita I., Moskwa B., Werszko J., Bień J., Goździk K., Lachowicz J., Cabaj W. (2014a) The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 1. The summarising list of parasites noted. *Acta Parasitologica* 59, 363–371.
 61. Karbowski G., Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Wita I., Moskwa B., Werszko J., Bień J., Goździk K., Lachowicz J., Cabaj W. (2014b) The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2. The structure and changes over time. *Acta Parasitologica* 59, 372–379.
 62. Kaminsky R., Ducray P., Jung M., Clover R., Rufener L., Bouvier J., Weber S.S., Wenger A., Wieland-Berghausen S., Goebel T., Gauvry N. (2008) A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 452(7184):176-80.
 63. Kamiya T., O'Dwyer K., Nakagawa S., Poulin R. (2014) What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society* 89, 123–134.
 64. Kita J., Anusz K. (2006) Kita J., Anusz K.(Eds.), *Health Threats for the European bison Particularly in Free-Roaming Populations in Poland*, The SGGW Publishers, Warsaw.
 65. Klich D., Olech W., Łopucki R., Danik K.(2018) Community attitudes to the European bison *Bison bonasus* in areas where its reintroduction is planned and in

- areas with existing populations in northeastern Poland. *European Journal of Wildlife Research*. 64:1-9.
66. Klich D., Łopucki R., Gałązka M., Ścibior A., Gołębiowska D., Brzezińska R., Kruszewski B., Kaleta T., Olech W. (2021) Stress hormone level and the welfare of captive European bison (*Bison bonasus*): the effects of visitor pressure and the social structure of herds. *Acta veterinaria scandinavica*. 63(1):24.
 67. Klich D., Nowicki M., Didkowska A., Bełkot Z., Popczyk B., Wiśniewski J., Anusz K. (2022) Predicting the risk of *Alaria alata* infestation in wild boar on the basis of environmental factors. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 1;17:257-62.
 68. Klich D., Didkowska A., Pyziel-Serafin A.M., Perlińska-Teresiak M., Wołoszyn-Gałęza A., Żoch K., Balcerak M., Olech W. (2023) Contact between European bison and cattle from the cattle breeders' perspective, in the light of the risk of pathogen transmission. *PLOS ONE* 18(5): e0285245.
 69. Kołodziej-Sobocińska M., Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Marczuk B., Kowalczyk R. (2016a) Does the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae) cause deterioration of blood parameters in European bison (*Bison bonasus*)?. *European Journal of Wildlife Research*. 62:781-5.
 70. Kołodziej-Sobocińska M., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J., Borowik T., Kowalczyk R. (2016b) Influence of management and biological factors on parasitic invasions in the wild – Spread of the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* in European bison (*Bison bonasus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 5(3):286-94.
 71. Kołodziej-Sobocińska M., Demiaszkiewicz A.W., Pyziel A.M., Kowalczyk R. (2018) Increased parasitic load in captive-released European bison (*Bison bonasus*) has important implications for reintroduction programs. *EcoHealth*. 15:467-71.
 72. Kołodziej-Sobocińska M. (2019) Factors affecting the spread of parasites in populations of wild European terrestrial mammals. *Mammal Research* 64, 301–318.
 73. Kowal J., Nosal P., Bonczar Z., Wajdzik M. (2012) Parasites of captive fallow deer (*Dama dama* L.) from southern Poland with special emphasis on *Ashworthius sidemi*. *Annals of Parasitology*, 58, 23–26.
 74. Kasińska M., Kasiński Z.A., Bunevich A.N. (2000) Factors affecting the variability in home range size and distribution in European bison in the Polish and Belarussian parts of the Białowieża Forest. *Acta Theriologica* 45, 321–334.

75. Krasieńska M, Krasieński Z. (2013) European bison: the nature monograph. Springer Science & Business Media.
76. Larsson A., Dimander S.O., Rydzik A., UgglA A., Waller P.J., Höglund J. (2006) A 3-year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle—Effects on animal performance. *Veterinary parasitology*. 142(3-4):197-206.
77. Lloyd S. (1983) Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 4, 153–176.
78. Łaczyński A., Kuliś M., Przypaśnia, J., Wieczorkowski R., Dach-Oleszek I., Tylkowska-Siek A. (2022) Farm animals in 2021. Retrieved from Statistics Poland. Agriculture Department. Available at <http://www.stat.gov.pl> (accessed 15 February 2024).
79. Malicka E. (Ed.). (2008). Sekcja zwłok zwierząt: praca zbiorowa. Wydawnictwo SGGW.
80. McKenna P.B. (1994) Criteria for diagnosing anthelmintic resistance by the faecal egg count reduction test. *New Zealand Veterinary Journal*. 42(4):153-4.
81. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. (2012) Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, New York, N.Y., 335, 936–941.
82. Michel J.F. (1985) Strategies for the use of anthelmintics in livestock and their implications for the development of drug resistance. *Parasitology*. 90(Pt 4):621-8.
83. Moskwa B., Bień J., Goździ, K., Cabaj W. (2014) The usefulness of DNA derived from third stage larvae in the detection of *Ashworthius sidemi* infection in European bison, by a simple polymerase chain reaction. *Parasites & vectors*, 7, 1-5.
84. Nadler S. (2002) Species delimitation and nematode biodiversity: phylogenies rule. *Nematology*. 4(5):615-25.
85. Novikova T.V., Ryzhakina T.P., Shestakova S.V. (2015) Ecological survey of helminth fauna in European bison living in freedom under the Vologda region conditions. *European bison Conservation Newsletter*. 8:75-8.
86. Olech W., Perzanowski K. (2002) A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. *Biological Conservation*. 108(2):221-8.
87. Olech W., Perzanowski K. (2014) Podręcznik najlepszych praktyk ochrony żubra. Centrum Koordynacji Projektów Środowiskowych. Warszawa.

88. Olech W., Klich D., Perzanowski K. (2019) Development of a new Action Plan for the European bison. *Oryx*. 53(2):213-214.
89. Oliveira P.A., Riet-Correa B., Estima-Silva P., Coelho A.C.B., Santos B.L.D., Costa M.A.P., Ruas J.L., Schild A.L. (2017) Multiple anthelmintic resistance in Southern Brazil sheep flocks. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 26(4):427-32.
90. Osińska B., Demiaszkiewicz A.W., Lachowicz J. (2010) Pathological lesions in European bison (*Bison bonasus*) with infestation by *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae). *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 13(1):63.
91. Papini R., Girivetto M., Marangi M., Mancianti F., Giangaspero A. (2012) Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. *The scientific world journal*. 253127.
92. Payan-Carreira R., Silva F., Rodrigues M., dos Anjos Pires M. (2008) *Cysticercus tenuicollis* vesicle in fetal structures: report of a case. *Reproduction in domestic animals*, 43(6), 764-766.
93. Pereckienė A., Kaziūnaitė V., Vyšniauskas A., Petkevičius, S., Malakauskas A., Šarkūnas M., Taylor M.A. (2007) A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Veterinary parasitology*. 149(1-2), 111-116.
94. Peregrine A. S., Molento M. B., Kaplan R. M., Nielsen M. K. (2014) Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Veterinary parasitology*, 201(1-2), 1-8.
95. Pigan M., Wójtowicz E. (2015) Historia pszczyńskich żubrów. *European Bison Conservation Newsletter*. 8, 97-102.
96. Pucek Z. (1991) History of the European bison and problems of its protection and management. In *Global trends in wildlife management trans. 18th IUGB congress, Krakow 1987*, 19-39. Swiat Press.
97. Pyziel A.M., Kowalczyk R., Demiaszkiewicz A.W. (2011) The Annual Cycle of Shedding *Eimeria* Oocysts by European Bison (*Bison bonasus*) in the Białowieża Primeval Forest, Poland. *Journal of Parasitology*. 97(4), 2011, 737–739.
98. Pyziel A.M., Jóźwikowski M., Demiaszkiewicz A.W. (2014) *Coccidia* (Apicomplexa: Eimeriidae) of the lowland European bison *Bison bonasus bonasus* (L.). *Veterinary Parasitology*. 202(3-4):138-44.
99. Pyziel A.M., Björck S., Wiklund R., Skarin M., Demiaszkiewicz A.W., Höglund J. (2018) Gastrointestinal parasites of captive European bison *Bison bonasus* (L.) with

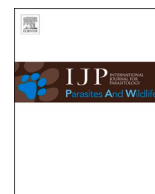
- a sign of reduced efficacy of *Haemonchus contortus* to fenbendazole. Parasitology research. 117:295-302.
100. Pyziel A.M., Demiaszkiewicz A.W., Klich D., Laskowski Z. (2019) A morphological and molecular comparison of *Eimeria bovis*-like oocysts (Apicomplexa: Eimeriidae) from European bison, *Bison bonasus* L., and cattle, *Bos taurus* L., and the development of two multiplex PCR assays for their identification. Veterinary parasitology. 275:108917.
 101. Pyziel A. M., Demiaszkiewicz A. W., Osińska B., Dolka I., Anusz K., Laskowski Z. (2020a) Usefulness of PCR–RFLP of 18S rRNA gene for rapid post-mortem diagnostics of highly pathogenic *Eimeria* spp.(Apicomplexa: Eimeriidae) of European bison, *Bison bonasus* L. with histopathological correlation. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 12, 13-18.
 102. Pyziel A.M., Laskowski Z., Dolka I., Kołodziej-Sobocińska M., Nowakowska J., Klich D., Bielecki W., Żygowska M., Moazzami M., Anusz K., Höglund J. (2020b) Large lungworms (Nematoda: Dictyocaulidae) recovered from the European bison may represent a new nematode subspecies. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.13:213-20.
 103. Pyziel-Serafin A.M., Vetter W., Klich D., Anusz K. (2023) Exchanged communities of abomasal nematodes in cervids with a first report on in red deer. Journal of Veterinary Research. 67(1):87-92.
 104. Raczyński J. (1978) Żubr [European Bison]. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warsaw, Poland.
 105. Roepstorff A., Nansen P. (1998) Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. Vol. 3. Rome: Fao.
 106. Roepstorff A., Mejer H., Nejsun P., Thamsborg S. M. (2011) Helminth parasites in pigs: new challenges in pig production and current research highlights. Veterinary parasitology, 180(1-2), 72-81.
 107. Rose H., Rinaldi L., Bosco A., Mavrot F., de Waal T., Skuce P., Charlier J., Torgerson P.R., Hertzberg H., Hendrickx G., Vercruysse J., Morgan E.R. (2015) Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. Veterinary Record. 176(21):546.
 108. Rose Vineer H., Morgan E.R., Hertzberg H., Bartley D.J., Bosco A., Charlier J., Chartier C., Claerebout E., de Waal T., Hendrickx G., Hinney B., Höglund J., Ježek J, Kašný M., Keane O.M., Martínez-Valladares M., Mateus T.L., McIntyre J.,

- Mickiewicz M., Munoz A.M., Phythian C.J., Ploeger H.W., Rataj A.V., Skuce P.J., Simin S., Sotiraki S., Spinu M., Stuenkel S., Thamsborg S.M., Vadlejch J., Varady M., von Samson-Himmelstjerna G., Rinaldi L. (2020) Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*. 27:69
109. Roy B.A., Kirchner J.W. (2000) Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution*. 54, 51–63.
 110. von Samson-Himmelstjerna G., Coles G.C., Jackson F., Bauer C., Borgsteede F., Cirak V.Y., Demeler J., Donnan A., Dorny P., Epe C., Harder A., Höglund J., Kaminsky R., Kerboeuf D., Küttler U., Papadopoulos E., Posedi J., Small J., Várady M., Vercruysse J. (2009) Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*. 105, 825–834.
 111. Shore D.A. (1939) Differentiation of eggs of various genera of nematodes parasitic in domestic ruminants in the United States. *Techn. Bull. U.S. Dept. of Agriculture*, 694 (1939), 1-11.
 112. Skryabin K.I., Shikhobalova N.P., Mozgovoi A.A. (1991) Skryabin K.I. (ed). *Key to Parasitic Nematodes, Volume 2 Oxyurata and Ascaridata*. Koln, Leiden, New York, Kobenhaven, 530-533.
 113. Springer A., Kloene .P, Strube C. (2022) Benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* in a wildlife park. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 164:51-9.
 114. Taylor M.A., Coop R..L, Wall R.L. (2007) *The laboratory diagnosis of parasitism. Veterinary parasitology*, Blackwell Publishing, Oxford. 798-799.
 115. Tessaro S.V. (1989) Review of the diseases, parasites and miscellaneous pathological conditions of North American bison. *Canadian Veterinary Journal* 30, 416–422.
 116. Thieltges D.W., Hof C., Dehling D.M., Brändle M., Brandl R., Poulin R. (2011) Host diversity and latitude drive trematode diversity patterns in the European freshwater fauna. *Global Ecology and Biogeography*. 20(5):675-82.
 117. Treboganova N. 2011. Capture and transportation of animals from European Bison Breeding Centre of Priksko-Terrasnyj Nature Biosphere Reserve. *European Bison Conservation Newsletter*, 4: 121–124.

118. Vadlejš J., Kyriánová I.A., Rylková K., Zikmund M., Langrová I. (2017) Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biological Invasions*. 2017;19(4):1121-5.
119. Vercruysse J., Charlier J., Van Dijk J., Morgan E.R., Geary T., von Samson-Himmelstjerna G., Claerebout E. (2018) Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology*. 145(13):1655-64.
120. Viggers K.L., Lindenmayer D.B., Spratt D.M. (1993) The importance of disease in reintroduction programs. *Wildlife Research* 20, 687–698.
121. Villalobos-Segura M.C., García-Prieto L., Rico-Chávez O. (2020) Effects of latitude, host body size, and host trophic guild on patterns of diversity of helminths associated with humans, wild and domestic mammals of Mexico. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 13, 221–230.
122. Walker J.G., Morgan R.R. (2014) Generalists at the interface: Nematode transmission between wild and domestic ungulates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2014; 3, 242–250.
123. Wang C., Paul M. (2020). eggCounts: Hierarchical modelling of faecal egg counts. R package version 2.2. <https://CRAN.R-project.org/package=eggCounts>.
124. Wang C., Torgerson P.R., Kaplan R.M., George M.M., Furrer R. (2018) Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 8(3), 386-93.
125. Welz M., Łoś P., Kondrat R., Orłowska B., Didkowska A., Anusz, K. (2023) Combating tuberculosis in European bison in the Bieszczady Mountains-the administrative aspect. *Medycyna Weterynaryjna* 2023, 79 (4), 168-171.
126. Williams E.S., Yuill T., Artois M., Fischer J., Haigh S.A. (2002) Emerging infectious diseases in wildlife. *Revue scientifique et technique-Office international des Epizooties*. 21(1), 139-58.
127. Willis H.H. (1921) A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia*. 8, 375-376.
128. Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B. Jr., Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M., Vercruysse J. (1995) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*. 58(3):181-213.

129. Wróblewski K. (1927) Żubr Puszczy Białowieskiej: monografia. Wydawnictwo Polskie; nakł. Ogrodu Zoologicznego.
130. Wyrobisz-Papiewska A., Kowal J., Łopieńska-Biernat E., Nosal P., Polak I., Paukzto Ł., Rehbein S. (2021) Morphometric and molecular analyses of *Ostertagia leptospicularis* Assadov, 1953 from Ruminants: species diversity or host influence? *Animals* 11, 182.
131. Yildirim A., Iça A., Beyaz L., Atasaver A. (2006) Acute *hepatitis cysticercosa* and *pneumonitis cysticercosa* in a lamb: case report. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 30(2), 108-111.
132. Yurchanka D., Anisimava A. (2015) Monitoring of the state of helminth infections in various populations of European bison (*Bison bonasus*) in Belarus. *European Bison Conservation Newsletter*. 8:69-74.
133. Ziomko I., Cencek T. (1999) Inwazje pasożytnicze zwierząt gospodarskich: wybrane metody diagnostyczne. Drukarnia Piotra Włodarskiego, Warszawa.
134. Zirintunda G., Biryomumaisho S., Kasozi K.I., Batiha G.E., Kateregga J., Vudriko P., Nalule S., Olila D., Kajoba M., Matama K., Kwizera M.R. (2022) Emerging anthelmintic resistance in poultry: can ethnopharmacological approaches offer a solution?. *Frontiers in pharmacology*. 12:774896.

8. Załączniki



Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, *Bison bonasus* designated for translocation: Comparison of two coprological methods

Marta Gałązka^{a,*}, Daniel Klich^b, Krzysztof Anusz^a, Anna M. Pyziel-Serafin^a

^a Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences - SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776, Warsaw, Poland

^b Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences, SGGW, Ciszewskiego 8, 02-787, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Coprospecty
European bison
McMaster method
Prediction of prevalence
Willis method

ABSTRACT

It is important to monitor the level of parasitic loads in herds of European bison and to identify threats early enough to prevent their spread to other populations or species. The aim of the present study was to compare the detection sensitivity of two fecal flotation techniques, viz. the modified Willis method (WM) with centrifugation and modified McMaster flotation technique (MM), in the diagnostics of gastrointestinal parasites of European bison before the translocation of animals.

Out of 166 feces samples, *Eimeria* spp. oocysts (84.3% in WM and 71.1% in MM) and Trichostrongylidae eggs (82.5% in WM and 53.6% in MM) predominated. These were accompanied by eggs from *Capillaria* spp. (prevalence: 13.9% in WM and 3.61% in MM), *Nematodirus* spp. (prevalence: 18.1% in WM and 4.8% in MM) and *Trichuris* spp. (prevalence: 12.7% in WM and MM) were identified. The lowest prevalence was noted for cestode eggs of *Moniezia* spp. (5.4% in WM and 3.0% in MM).

The Willis method yielded a higher prevalence of eggs and oocysts than the modified McMaster method, and hence has a higher probability of detecting parasitic structures than the modified McMaster method, especially in cases of very low levels of invasion.

As the two methods yield consistent results, it is recommended to use the Willis method for diagnosis of internal parasite infection in European bison. This test offers more sensitive method than McMaster technique of detecting the presence of low levels of a variety of parasite eggs and oocysts in feces, while also being inexpensive and adaptable to field work.

1. Introduction

The European bison (*Bison bonasus*), the largest terrestrial mammal in Europe, has had a tumultuous history. At one point, in 1919, the species was extinct in the wild and had to be restored from only 12 founders (Wróblewski, 1927; Raczynski, 1978; Pucek, 1991; Krasinska and Krasinski, 2007). Due to this extreme bottleneck, the species experienced a dramatic drop in genetic variability (Olech and Perzanowski, 2002), resulting in its inclusion in the IUCN Red List of Threatened Species (IUCN, 2021). The status of the European bison has since risen from vulnerable to near threatened; however, the species still requires concerted conservation efforts (Klich et al., 2018; Olech et al., 2019).

The wildlife health is a dynamic state depending on characteristics of

the individual and its environment. The comprehensive approach is crucial to determine health status, which depends on several interacting factors, among others: biologic, social and environmental (Stephen, 2014). Thus, the conservation projects conduct monitoring of the population in veterinary, genetic, spatial and ecological aspects to ensure the stability of the perspectives for the development of European bison population (Klich, 2017).

Due to the low genetic variability of the species, European bison populations face a number of biological and environmental threats, including infectious and invasive diseases (Kita and Anusz, 2006; Pyziel et al., 2014; Olech et al., 2019). The parasitic fauna of European bison has been well described and consists of 88 species of parasites. The most numerous groups of parasites are nematodes (43 species) and protozoa

* Corresponding author.

E-mail address: marta_zygowska1@sggw.edu.pl (M. Gałązka).

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.01.008>

Received 27 October 2021; Received in revised form 21 January 2022; Accepted 21 January 2022

Available online 24 January 2022

2213-2244/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(22 species), followed by mites (7 species), trematodes (4 species), cestodes (4 species) and Ixodidae ticks (4 species). The least numerous groups are Hippoboscidae flies (2 species) and Anoplura (1 species) (Karbowiak et al., 2014a).

Parasitism may serve as a tool of natural selection and it is important to distinguish if it is impacting the survival of endangered species as European bison. Parasitic invasions are common in European bison e.g. protozoans, gastrointestinal and lung nematodes and may cause severe symptoms including hemorrhagic diarrhea, cachexia and bronchitis, and can have a fatal outcome (Demiaszkiewicz et al., 2009b; Jolley and Bardsley, 2006; Kita and Anusz, 2006; Pyziel et al., 2018b). Severe damages threatening the reintroduction of E. bison may be caused by gastrointestinal parasites, e.g. blood-sucking abomasal nematode, *Ashworthius sidemi*, described as one of the most pathogenic among parasites found in European bison (Kołodziej-Sobocińska et al., 2018). *A. sidemi* invasion may cause deterioration of red blood cell parameters and increase in reticulocytes. In severe infections reticulocytosis may be insufficient to compensate significant loss in red blood cells. As a result it affects the animal's condition and increases its vulnerability to other pathogens (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016).

Another major concern is the occurrence of parasitic diseases which can cross the host-species barrier, and thus be transmitted between wildlife and livestock (Karbowiak et al., 2014a, 2014b). Most of the identified species of parasites can be found in other wild ungulates or cattle (Kita and Anusz, 2006; Krasinska and Krasinski, 2007). The most parasite species are shared with cattle (*Bos taurus*), deer (*Cervus* spp.) and other Bovidae, however groups of parasites are also shared with moose (*Alces alces*), Caprinae and Canidae. (Karbowiak et al., 2014b). Such cross-species transmission was observed for *Ashworthius sidemi*, which is believed to have been transmitted to Polish European bison by sika deer (*Cervus nippon*) from Ukraine and Slovakia (Drózd et al., 1998, 2003); over the years, the species colonized various local wild ruminant populations, such as European bison, red deer, roe deer and moose (Drózd et al., 1998, 2003). Subsequently *A. sidemi* was introduced to the Czech Republic along with European bison individuals translocated from Poland (Vadlejch et al., 2017).

Moreover, as illustrated by the case of *A. sidemi*, the translocation of animals carries a high risk of spreading pathogenic agents into native wildlife populations (Pyziel et al., 2018a; Demiaszkiewicz et al., 2009a, 2013; Vadlejch et al., 2017) and to domestic livestock (Moskwa et al., 2015). This threat highlights the need for effective parasitological supervision of European bison with the use of properly-chosen diagnostic methods (Karbowiak et al., 2014; Pyziel et al., 2019, 2020) and appropriate conservation efforts.

The preservation of genetic diversity plays the leading role in management of European bison population and it is achieved by capturing and transferring animals between enclosure conditions and free-living herds. Prior to translocation every individual have to be quarantined and undergo required health tests, which are listed by veterinarians at the place of destination (Hlawiczka, 2008; Kaczmarek-Okrój et al., 2016).

This paper evaluates two fecal flotation techniques that can be used for coprological examination of individual European bison in quarantine and before translocation. Ideally, they should yield quick results, and be easy to use and adaptable in the field.

To this end, the aim of this study was to compare two popular coprological methods, the modified Willis method (Willis, 1921; Ziomko and Cencek, 1999) and the modified McMaster technique (Gordon and Whitlock, 1939), with regard to their sensitivity in the diagnosis of gastrointestinal parasites of European bison.

2. Material and methods

2.1. Material collected and area of the study

A total of 166 individual fecal samples were collected from captive

and free-living herds of European bison in Poland in the years 2008 and 2011. Samples were taken from Borecka Forest (54.1222° N, 22.1036° E), Białowieża Forest (52.7229° N, 23.6556° E), Knyszyn Forest (53.2167° N, 23.2500° E), the West Pomeranian Voivodeship (53.4658° N, 15.1823° E), as well as in enclosures located in Gołuchów (51.8487° N, 17.9307° E), Pszczyna (49.9858° N, 18.9477° E), Smardzewice (51.4728° N, 20.0262° E), Niepołomice (50.0407° N, 20.2225° E) and Białowieża (52.7007° N, 23.8677° E). The samples were placed in 30-ml labeled plastic tubes and stored at 4 °C for laboratory investigation. The samples were examined immediately after delivery to the laboratory.

2.1.1. Coprological investigation

Each sample was mixed with a spoon, weighed and examined simultaneously with two coprological methods: the modified Willis method with centrifugation and the modified McMaster flotation technique. Both were performed in sucrose solution (SG = 1.27) using 3 g of feces per method (MAFF, 1986; Dryden et al., 2005; Blagburn et al., 2006; Pyziel et al., 2019). The samples were examined using an Olympus BX50 light microscope (Olympus, Japan) at × 100–400 magnification.

The eggs of gastrointestinal helminths were detected at genus or family level according to Taylor et al. (2007). Eimerians were detected at the species level according to Pyziel et al. (2014).

The direct flotation method, as modified by Willis (WM) (1921), was performed with the use of a centrifuge according to Ziomko and Cencek (1999), in sucrose solution according to Blagburn and Butler (2006). In each case, 3 g of feces was passed through a sieve in 10 ml of flotation solution, poured into test tubes and centrifuged for 2 min at 2000 rpm. The tubes were then filled with flotation solution until a convex meniscus was obtained. The meniscus was covered with a coverslip with dimensions of 24 mm × 24 mm for 20 min, allowing any floating oocysts and eggs to adhere to the glass. After this time, the coverslip was transferred to a microscope slide and examined with the use of light microscope at × 100–400 magnification (Olympus BX50, Olympus, Japan).

Although the Willis method is a qualitative and not a quantitative method, parasite eggs and oocysts were counted in every examined sample during microscope evaluation and an estimate of parasite eggs or oocysts per 3 g of feces was calculated based on the weight of the samples and volume of flotation solution (Jacobs et al., 2016).

The modified McMaster method (MM) was used to quantitatively evaluate the numbers of EPGs and OPGs (i.e. eggs and oocysts per gram of feces) in the feces samples (Jacobs et al., 2016) according to Taylor et al. (2007). Briefly, 3 g samples of feces were precisely pounded in 42 ml of water until the suspension appeared homogeneous, and the mixture was wiped through a sieve. The filtrate was transferred to a 15 ml test tube and centrifuged for 2 min at 2000 rpm. The supernatant was decanted and the tube was filled with sucrose solution. The sediment and the flotation solution were thoroughly mixed by mechanical agitation and the suspension was carefully pipetted into both chambers of a McMaster counting slide, ensuring no air bubbles remain. After three to 5 min, the slide was examined under the microscope at × 100–400 magnification (Olympus BX50, Olympus, Japan) according to Roepstorff and Nansen (1998).

EPG and OPG values were calculated by multiplying the total numbers of eggs and oocysts observed in both chambers by 50 (Foreyt, 2013). This approach was used instead of the proposed technique of counting the number in one chamber and multiplying the value by 100 (Taylor et al., 2007), which has been found to be less accurate (Percekiene et al., 2007).

2.2. Statistical analysis

The prevalence of the identified egg and oocyst taxa, as well as *Eimeria* oocysts, were compared between the Willis and modified McMaster methods with the McNemar test. For taxa that presented higher prevalence, the efficiency of parasite detection by the modified

McMaster method was determined using logistic regression models created for each taxon separately. In each model, the dependent variable was the presence of the given taxon in the sample, as detected by the modified McMaster method, and the independent variable was the number of eggs/oocysts of that taxon detected by the Willis method. The presence of a taxon in the sample was always marked as 1 and its absence was always marked as 0.

Three linear regression models were also run to verify any relationship between the results of the modified McMaster and Willis method for each given taxon or *Eimeria* species: a) eggs/oocysts, b) *Eimeria* species, c) eggs/oocysts and *Eimeria* species in one model. The prevalence of a taxon in the modified McMaster method was used as the dependent variable, and the prevalence of that taxon according to the Willis method was the independent variable. All statistics were performed using SPSS software (version 24.0, IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

3. Results

The results of coprological investigation, obtained by both methods, are presented in Table 1. The examined European bison shed nematode eggs of Trichostrongylidae, *Capillaria* spp., *Nematodirus* spp. and *Trichuris* spp., as well as cestode eggs of *Moniezia* spp. in their feces (Tables 1 and 2).

Additionally, oocysts of eleven species of *Eimeria* were identified (Tables 1 and 2). These oocysts demonstrated the highest prevalence among all the identified parasite structures (prevalence: 84.3% in WM and 71.1% in MM, respectively). Trichostrongylidae eggs were seen in 82.5% of samples in WM and 53.6% samples in MM, whereas the prevalence of *Trichuris* spp., *Capillaria* spp. and *Nematodirus* spp. eggs ranged from 13.9 to 18.1% in WM, and 3.61–12.7% in MM. Eggs of *Moniezia* spp. were least frequently observed, being found in 5.4% of samples in WM and 3% of samples in MM (Table 1).

According to the Willis method, the highest mean and median amounts of eggs/oocysts per 3g were observed for *Moniezia* spp. ($x = 210$; $Me = 12$), *Trichuris* spp. ($x = 164.1$; $Me = 85$) and Trichostrongylidae ($x = 69.5$; $Me = 28$). The lowest mean and median were noted for *Capillaria* spp. (Table 1).

According to the modified McMaster method, the highest mean and median EPG/OPG values were observed for *Trichuris* spp. ($x = 692.9$; $Me = 350$), *Moniezia* spp. ($x = 560$; $Me = 350$), *Eimeria* spp. ($x = 463$; $Me = 150$) and Trichostrongylidae ($x = 239.2$; $Me = 150$). The lowest mean values were observed for *Nematodirus* spp. and *Capillaria* spp., and the lowest median for *Nematodirus* spp. (Table 1).

Among the eimerians, the most prevalent oocysts were those of *E. bovis* (74.7% in WM, 63.9% in MM), *E. zuernii* (39.8% in WM, 24.7% in MM) and *E. ellipsoidalis* (29.5% in WM, 12.6% in MM). The rarest were from *E. subspherica* (1.2% in WM, 2.4% in MM) and *E. brasiliensis* (1.8% in WM, 1.2% in MM) (Table 2).

Based on the modified Willis method, the highest mean numbers of oocysts were obtained for *E. bovis* ($x = 29.2$), *E. ellipsoidalis* ($x = 10.7$) and *E. alabamensis* ($x = 10.5$), whereas the lowest means were observed

for *E. bukidnonensis* ($x = 1.8$) and *E. cylindrica* ($x = 3.8$). Additionally, the highest median values were observed for *E. bovis* ($Me = 6$), *E. alabamensis* ($Me = 4$) and *E. subspherica* ($Me = 4$), while the lowest were found for *E. bukidnonensis* ($Me = 1$) and *E. canadensis* ($Me = 1.5$) (Table 2).

Based on the modified McMaster method, the highest mean OPGs were noted for *E. bovis* ($x = 322.6$), *E. auburnensis* ($x = 321$) and *E. subspherica* ($x = 260$), and the lowest for *E. bukidnonensis* ($x = 50$). The highest median value ($Me = 100$) was obtained by four species: *E. alabamensis*, *E. bovis*, *E. bukidnonensis* and *E. subspherica*. The lowest median ($Me = 50$) was noted in all other species except *E. pellita* ($Me = 75$) (Table 2).

Statistically significant differences in prevalence of eggs/oocysts were observed between the two methods for all taxa apart from *Moniezia* spp., *Trichuris* spp., *E. brasiliensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica* and *E. subspherica*, which were rarely found (Tables 1 and 2).

The results suggest that the detection of eggs/oocysts with the use of modified McMaster technique depended on the taxon of studied parasite. To have a probability of detecting eggs or oocysts higher than 0.5 with the use of MM, one oocyst had to be detected by WM in the case of *Eimeria* spp. (Fig. 1), while 17 eggs had to be detected by WM in the case of *Trichuris* spp., and 23 in the case of Trichostrongylidae (Figs. 2 and 3).

Additionally, significant relationships were observed between the two methods regarding the prevalence of detected eggs/oocysts on the taxa/genus level ($R^2 = 0.95$, $F = 73.25$, $p = 0.001$; Fig. 4). Consequently, both methods tended to yield similar values for the prevalence of eggs/oocysts (Fig. 4). Despite this, the regression coefficient ($B = 0.793$) indicated that the prevalence obtained with the use of MM was lower than that obtained with WM. Moreover, the coefficient for the intercept ($B_0 = -3.769$) indicated a very low prevalence of significant eggs/oocysts obtained with the use of WM, which may mean that they would not be detected with the use of MM (Fig. 4).

Additionally, a strong correlation was found between both analyzed methods regarding *Eimeria* spp. prevalence (Fig. 5). The linear regression model was also highly significant, and presented a high value of coefficient of determination ($R^2 = 0.93$, $F = 124.08$, $p = 0.001$). Also in this case, the relationship between prevalence values was positive, and the slope indicated that the MM method yielded lower prevalence values than the WM method ($B = 0.810$). Similarly, eimerians of a very low prevalence which were detected with the use of WM method may be not detected with MM ($B_0 = -3.408$).

In one regression model, including data from the above regressions for both the taxa and eimerians, all the included taxa presented similar results ($R^2 = 0.945$, $F = 257.79$, $p = 0.000$); this allowed their prevalence to be compared between methods. To predict the prevalence for the modified McMaster method based on the results of the Willis method, the following formula should be used:

$$y = 0.796x - 3.392$$

where: y - predicted prevalence in the modified McMaster method, and x - real prevalence in the Willis method, with the standard errors ($SE =$

Table 1

Comparison of coprological findings in European bison ($n = 166$) between Willis (WM) and McMaster (MM) method, and statistical comparison with Mc Nemar test, *statistically significant difference.

Parasite	Prevalence				Statistical difference (Mc Nemar)	Eggs/Oocysts per 3 g (WM)			EPG/OPG (MM)		
	%		95% CI			Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
	WM	MM	WM	MM							
<i>Capillaria</i> spp.	13.9	3.61	5.3	2.8	0.002*	4.7	3	1–14	83.3	100	50–100
<i>Eimeria</i> spp.	84.3	71.7	5.5	6.9	0.004*	38.7	7	1–658	463	150	50-6500
<i>Moniezia</i> spp.	5.4	3	3.4	2.6	0.500	210	12	1-1368	560	350	100-1050
<i>Nematodirus</i> spp.	18.1	4.8	5.9	3.3	<0.001*	51.3	7.5	1–521	81.3	50	50–300
Trichostrongyloidea	82.5	53.6	5.8	7.6	<0.001*	69.5	28	1-1316	239.2	150	50-2950
<i>Trichuris</i> spp.	12.7	12.7	5.1	5.1	1.000	164.1	85	2-1339	692.9	350	50-3100

Prevalence (% and 95% confidence interval), EPG/OPG: eggs/oocyst count per gram (average, X, and range).

Table 2

Comparison of *Eimeria* oocysts findings in European bison ($n = 166$) between Willis (WM) and McMaster (MM) method and statistical comparison with Mc Nemar test, *statistically significant difference.

Species	Prevalence				Statistical difference (Mc Nemar)	Eggs/Oocysts per 3 g (WM)			EPG/OPG (MM)		
	%		95% CI			Mean	Median	Range	Mean	Median	Range
	WM	MM	WM	MM							
<i>E. alabamensis</i>	12	4.8	4.94	3.25	0.004*	10.5	4	1–105	231.2	100	50-1200
<i>E. auburnensis</i>	25.3	11.5	6.61	4.85	<0.001*	8.7	2.5	1–77	321	50	50-4050
<i>E. bovis</i>	74.7	63.9	6.61	7.31	0.012*	29.2	6	1–530	322.6	100	50-6150
<i>E. brasiliensis</i>	1.8	1.2	2.02	1.66	1.000	7.7	4	1–18	100	100	50–150
<i>E. bukidnonensis</i>	6.6	1.2	3.78	1.66	0.012*	1.8	1	1–6	50	50	50
<i>E. canadensis</i>	10.8	10.2	4.72	4.60	1.000	10.1	1.5	1–105	81	50	50–450
<i>E. cylindrica</i>	6.6	4.2	3.78	3.05	0.508	3.8	2	1–12	100	50	50–250
<i>E. ellipsoidalis</i>	29.5	12.6	6.94	5.05	0.001*	10.7	2	1–345	195.2	50	50–1800
<i>E. pellita</i>	12.7	4.8	5.07	3.25	0.004*	4.9	2	1–23	81.3	75	50–150
<i>E. subspherica</i>	1.2	2.4	1.66	2.33	0.625	4	4	1–7	260	100	100–550
<i>E. zuernii</i>	39.8	24.7	7.45	6.56	0.001*	6.5	2	1–80	100	50	50–950

Prevalence (% and 95% confidence interval), EPG/OPG: eggs/oocyst count per gram (average, X, and range).

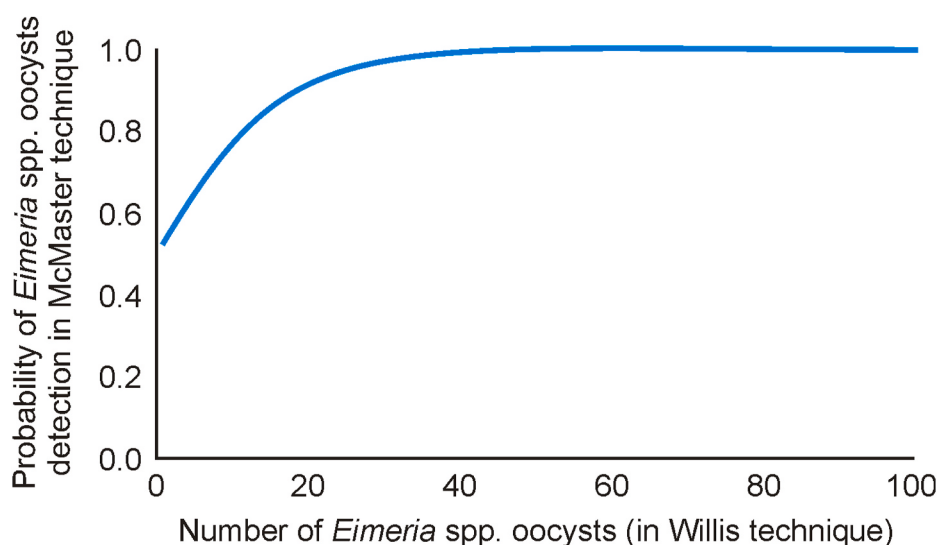


Fig. 1. Probability of detection of *Eimeria* spp. oocysts with the modified McMaster technique based on the number of oocysts detected using the Willis technique.

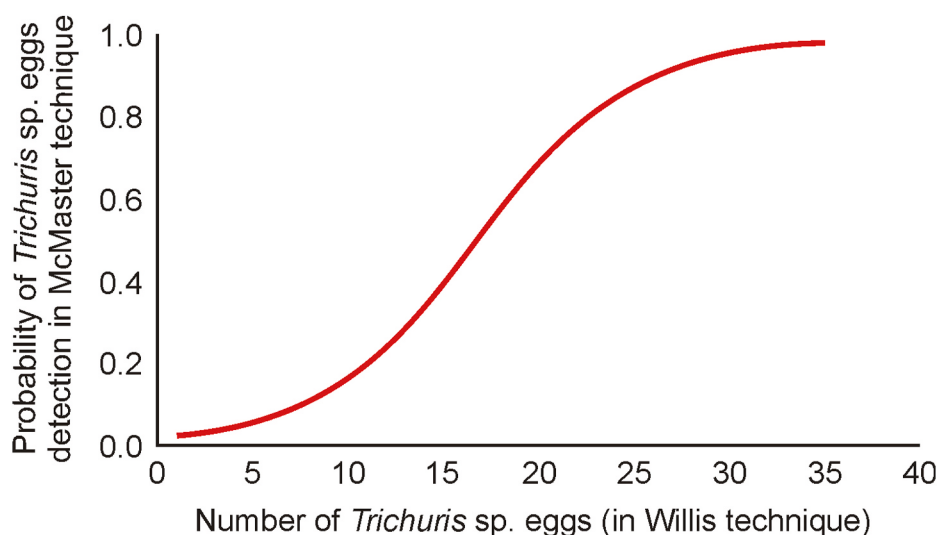


Fig. 2. Probability of detection of *Trichuris* sp. eggs with the modified McMaster technique based on the number of eggs detected using the Willis technique.

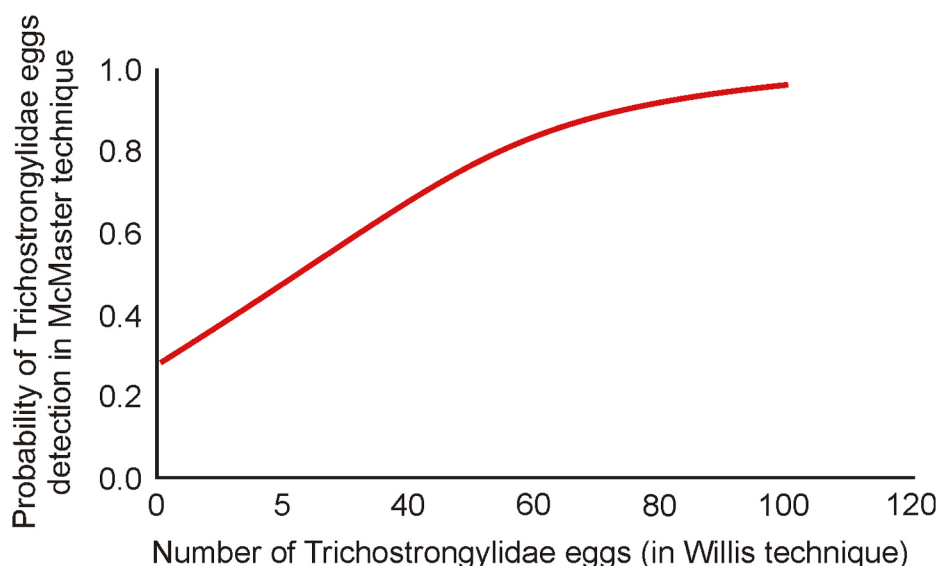


Fig. 3. Probability of detection of Trichostrongylidae eggs with the modified McMaster technique based on the number of eggs detected using the Willis technique.

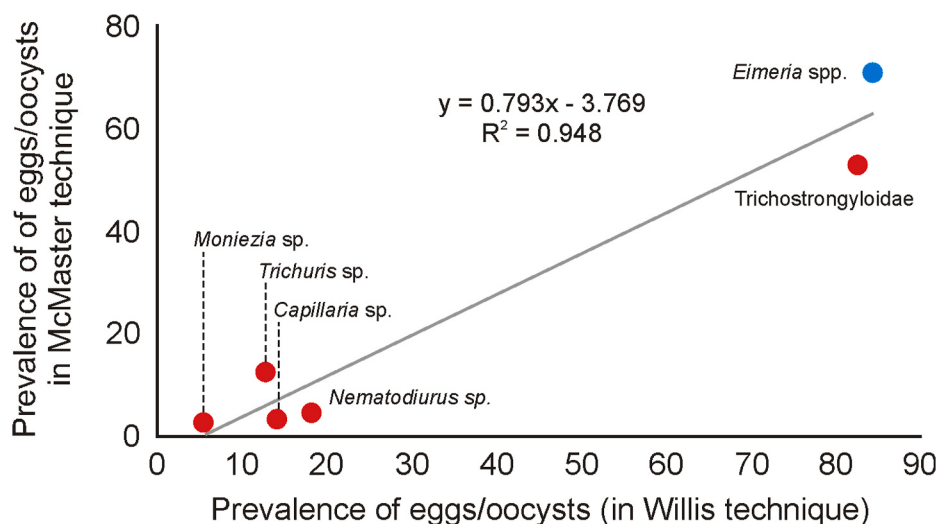


Fig. 4. The relationship between the prevalence of various taxa eggs/oocysts in European bison feces measured by the Willis and modified McMaster techniques (each point represents an individual taxon/genus, blue points stand for oocysts and red point for eggs). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

0.05, $SE = 1.855$, respectively).

Conversely the prevalence for the Willis method can be predicted based on the results of the modified McMaster method using the formula:

$$y = 1.178x + 5.443$$

where: y - predicted prevalence in Willis method, and x - real prevalence in the modified McMaster method, with the standard errors ($SE = 0.074$, $SE = 2.074$, respectively).

4. Discussion

Translocation of animals is essential element of conservation efforts focused on preservation of genetic diversity in endangered species. In case of European bison it involves relocation of individuals from both captive and free-living herds, which is connected with fulfilling certain requirements. All animals, kept in enclosure and captured from the free-living population, are obliged to be kept under quarantine conditions for

at least 30 days and need to be tested for the presence of diseases listed in the EU TRACES-document No. 92–65 and required by veterinarians at the place of destination. One of the recommended procedures prior the translocation of European bison is coprological evaluation and prophylactic anthelmintic treatment (Treboğanova, 2011; Kaczmarek-Okroj et al., 2016; Hławiczka, 2008).

Veterinary practice has at its disposal a variety of coprological techniques for the diagnosis of internal parasitic infections; one such tool is the flotation method, which is simple, quick, inexpensive and can be easily applied in the field (Pouillevet et al., 2017; Jolles et al., 2008; Sousa et al., 2016). However, this wide variety of methods limits the possibility for comparison of coprological results between different scenarios. Hence, one goal of our present study is to partially overcome these methodological barriers by attempting to unify the results of two widely-used approaches: the Willis and modified McMaster methods.

Both methods are flotation techniques, with the difference that the modified Willis method is a qualitative and the modified McMaster method is a quantitative technique. The modified Willis method is a direct flotation method helpful in detecting most gastrointestinal

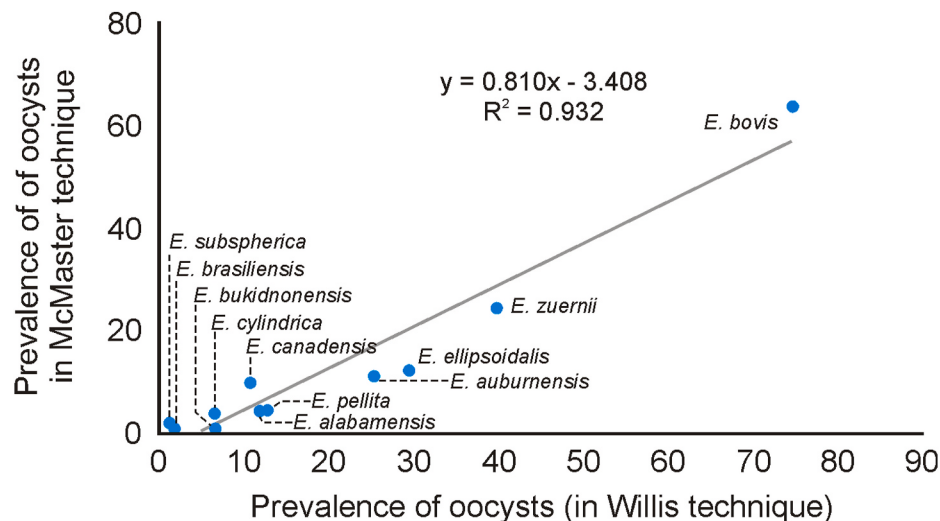


Fig. 5. The relationship between the prevalence of *Eimeria* spp. oocysts in European bison feces measured by the Willis and modified McMaster techniques (each point represents an individual parasite species).

parasites including helminth eggs and protozoan cysts in the feces, which is often used in preliminary surveys. It can be satisfactorily applied by the veterinarian in the field, because it is inexpensive, easy and fast to perform and doesn't require any specialized equipment (Foreyt, 1989; Carvalho et al., 2012; Sousa et al., 2016; Mesquita et al., 2017). The inefficiency may be observed while the number of eggs or oocyst is high in the sample and the precision in the egg counting procedure may be decreased due to lack of the grid on the coverslip.

The modified McMaster method enables to determine fecal egg count and is the most universally applied fecal egg count technique in veterinary parasitology. It is considered a standard reference method for detecting internal parasites, and is recommended by World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants (Wood, 1995) and for detecting anthelmintic resistance (Coles, 2006; Cringoli, 2010). Performing a modified McMaster method requires a McMaster chamber for counting parasite eggs and oocysts, whereas the analytic sensitivity of the method is established at 50 EPG. A significant disadvantage is that the height of the counting chamber may prevent the possibility to perform the examination under greater magnification than at $\times 200$, which may interfere with the identification of parasite structures (Kochanowski et al., 2013).

The aim of the study was to compare detection sensitivity of two different methods, qualitative and quantitative, modified Willis and modified McMaster methods in order to offer recommendation for technique applied for coprological examination of European bison prior to the translocation. In this aspect the most important information was the presence or absence of the parasites, identification of parasite species and the prevalence of invasion. As the parasite egg number in feces does not directly show infection intensity, it was impossible to validate the infection intensity because the difference of characteristics of compared methods prevented from analyzing EPG/OPG for both methods. Willis method is a qualitative technique which allows to obtain the values of eggs/oocysts in 3 g of feces and it cannot be converted to EPG/OPG because the score would not be reliable. The weight of the fecal sample was the same for both methods, which allowed to align the values and compare the prevalence of applied methods.

As predicted, the Willis and modified McMaster methods yielded different qualitative and quantitative findings. Significant differences in prevalence were noted for four out of the six identified genera, including *Capillaria* spp., *Nematodirus* spp. and the Trichostrongyloidea. Among *Eimeria* spp., noteworthy differences were observed for seven out of eleven identified species, including *E. alabamensis*, *E. auburnensis* and

E. bovis. The presence of a significant difference in the prevalence of *Eimeria* spp. between the two techniques seems to be more related to the level of parasitism than to the species.

However, while the two methods yielded similar prevalence for some taxa, this alone does not imply that their findings are comparable. Similarly, the results of the quantitative analysis (mean, median and range) cannot be compared due to discrepancies between the units: WM values are given in eggs/oocysts per 3g, while those for MM are in EPG/OPG (Tables 1 and 2). This is understandable, considering that WM is a qualitative direct flotation method used in detecting most gastrointestinal parasites, including helminth eggs and protozoan cysts in the fecal samples, and so is often used in preliminary surveys (Foreyt, 1989; Carvalho et al., 2012; Sousa et al., 2016; Mesquita et al., 2017), while MM is quantitative fecal egg count technique, which uses a McMaster counting chamber for counting helminth eggs and coccidian oocysts in 3g of feces (Gawor, 2017). Therefore, to allow some degree of comparison between the two methods, the results of the WM were based on the quantity of eggs or oocysts per 3g of feces by determining the sample weight and flotation solution volume (Jacobs et al., 2016).

Although the two methods were fundamentally different, the results of this calculation allowed a quantitative comparison of the WM and MM tests. Linear regression showing the relationship between prevalence in both methods, i.e. in which the prevalence values are convergent (Figs. 4 and 5) can be used to make a direct comparison of the prevalence in the same location, or the same herd in different periods.

For MM, prevalence can be predicted using the regression $y = 0.796x - 3.392$ (where: y - predicted prevalence in modified McMaster method, and x - real prevalence in the Willis method) and for WM, it can be predicted using $y = 1.178x + 5.443$ (where: y - predicted prevalence in Willis method, and x - real prevalence in the modified McMaster method). Both conversion methods are simple and easy applicable. Although the values used for linear regressions were based on a particular genus or species, the methods demonstrated a high percentage of mutual explanation ($R^2 = 0.945$). As such, we propose that these formulas should be used for comparisons of tests performed with the two methods.

Our findings demonstrate the detection sensitivity of the two methods. They also confirm the comparative sensitivity of WM and MM, and highlight their value in the diagnosis of gastrointestinal parasites in European bison in the field. WM appears to be more sensitive to the presence of eggs and oocysts than MM. Thus, performing a coprological examination with WM provides higher probability of detecting parasitic structures which may not be found with MM, especially in case of

parasitic invasions of very low prevalence. Low sensitivity of MM have been observed by Levecke et al. (2011, 2012) in the case of low baseline fecal egg counts; in addition, Cringoli et al. (2010) regard the modified MM method as inadequate for rigorous parasitological diagnosis.

Based on our present findings, we recommend the use of WM for the parasitological supervision of European bison prior to the translocation due to its higher sensitivity than MM. The use of WM instead of MM does not present a limitation as our findings confirm that the results obtained by the two methods are comparable.

We suggest that as a precaution, European bison intended for transfer should be placed in quarantine before translocation and that coprological examination should be performed based on the Willis method. Should a positive parasitological diagnosis be obtained, effective anti-parasitic treatment can be implemented.

5. Conclusion

It is recommended that the Willis method be used for the parasitological diagnosis before translocation of European bison, as the test offers more sensitive method than McMaster technique of detecting the presence of low levels of a variety of parasite eggs and oocysts in feces.

Alternatively, it is possible to predict the prevalence of parasite eggs and oocysts measured by the Willis methods based on the modified McMaster method and vice versa; this could be of value when reviewing coprological examinations obtained in previous studies.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

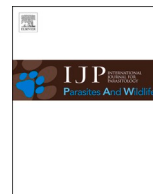
Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Blagburn, B.J., Butler, J.M., 2006. Optimize intestinal parasite detection with centrifugal fecal flotation. *Vet. Med.* 101, 455–463.
- Carvalho, G.L., Moreira, L.E., Pena, J.L., Marinho, C.C., Bahia, M.T., Machado-Coelho, G. L., 2012. A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Morae coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 80–84.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat. Protoc.* 5, 503–515.
- Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., Osinska, B., 2009. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Białowieża forest. *Pol. J. Vet. Sci.* 12, 385–388.
- Demiaszkiewicz, A.W., Kuligowska, I., Lachowicz, J., Pyziel, A.M., Moskwa, B., 2013. The first detection of nematodes *Ashworthius sidemi* in elk *Alces alces* (L.) in Poland and remarks of ashworthiosis foci limitations. *Acta Parasitol.* 58, 515–518.
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., 1998. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagaini*. *Acta Parasitol.* 43, 75–80.
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., 2003. Expansion of the Asiatic parasite *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in polish territory. *Parasitol. Res.* 89, 94–97.
- Dryden, M.W., Payne, P.A., Ridley, R., Smith, V., 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet. Therapeut.* 6, 15–28.
- Foreyt, W.J., 2013. *Veterinary Parasitology Reference Manual*. Blackwell Publishing, Iowa State University Press, Ames.
- Foreyt, W.J., 1989. Diagnostic parasitology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim.* 19, 979–1000.
- Gawor, J., 2017. Podstawowe metody diagnostyki koproskopowej inwazji pasożytów jelitowych u zwierząt. *Mag. Wet.* 3.
- Gordon, H. McL., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. CSIR* 12, 50–52.
- Hlawiczka, M., 2008. How European bison should be transported. In: *Proc. of the 1st International European Bison Congress* (Hardehausen).
- IUCN, 2021. The IUCN red list of threatened species. Version 2021-2. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on May 2021.
- Jacobs, D., Fox, M., Gibbons, L., Hermosilla, C., 2016. *Principles of Veterinary Parasitology*. Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex.
- Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., Etienne, R.S., Turner, W.C., Olff, H., 2008. Interactions between macroparasites and microparasites drive infection patterns in free-ranging African buffalo. *Ecology* 89, 2239–2250.
- Jolley, W.R., Bardsley, K.D., 2006. Ruminant coccidiosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 613–621.
- Kaczmarek-Okrój, M., Bruczyńska, M., Wojciechowska, M., Klich, D., Glowacz, K., Gajewska, K., Olech, W., 2016. Rules of capture and transport of wisent from Poland to other European countries. *Eur. Bison. Conserv. Newsl.* 9, 71–86.
- Karbowiak, G., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Wita, I., Moskwa, B., Werszko, J., Bień, J., Goździk, K., Lachowicz, J., Cabaj, W., 2014a. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 1. The summarizing list of parasites noted. *Acta Parasitol.* 59, 363–371.
- Karbowiak, G., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Wita, I., Moskwa, B., Werszko, J., Bień, J., Goździk, K., Lachowicz, J., Cabaj, W., 2014b. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2. The structure and changes over time. *Acta Parasitol.* 59, 372–379.
- Kita, J., Anusz, K., 2006. Health Threats for the European Bison Particularly in Free-Roaming Populations in Poland. The SGGW Publishers, Warsaw.
- Klich, D., Olech, W., Cielniak, K., 2017. A complex project for the conservation of European bison in Poland by State Forests (2017–2020). *Eur. Bison. Conserv. Newsl.* 10, 11–20.
- Klich, D., Olech, W., Łopucki, R., Danik, K., 2018. Community attitudes to the European bison *Bison bonasus* in areas where its reintroduction is planned and in areas with existing populations in northeastern Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* 64, 610.
- Kochanowski, M., Karamon, J., Dąbrowska, J., Cencek, T., 2013. Koproskopowe metody ilościowe w weterynaryjnej diagnostyce parazytologicznej – zastosowanie i problemy w szacowaniu ich skuteczności. *POST. MIKROBIOL* 52, 111–118.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., et al., 2016. Does the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae) cause deterioration of blood parameters in European bison (*Bison bonasus*)? *Eur. J. Wildl. Res.* 62, 781–785.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Kowalczyk, R., 2018. Increased parasitic load in captive-realised European bison (*Bison bonasus*) has important implications for reintroduction programs. *EcoHealth* 15, 467–471.
- Krasińska, M., Krasiński, Z.A., 2007. European bison. The Nature Monograph. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, Białowieża.
- Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Bosco, A., Vercruysse, J., Cringoli, G., 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Vet. Parasitol.* 188, 194–199.
- Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M.P., Morgogliano, M.E., Vercruysse, J., Cringoli, C., 2011. Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitol. Res.* 109, 953–957.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1986. *Manual of Veterinary Parasitological Techniques*. HMSO, London, p. 24.
- Mesquita, J.R., Esteves, F., Santos, C., Mega, C., Coelho, C., Cruz, R., Vala, H., Vasconcelos-Nóbrega, C., 2017. ABC series on diagnostic parasitology part 1: the Willis method. *Vet. Nurse J.* 8, 7.
- Moskwa, B., Bień, J., Cybulska, A., Kornacka, A., Krzysiak, M., Cencek, T., Cabaj, W., 2015. The first identification of blood-sucking abomasal nematode *Ashworthius sidemi* in cattle (*Bos taurus*) using simple polymerase chain reaction (PCR). *Vet. Parasitol.* 211, 106–109.
- Olech, W., Perzanowski, K., 2002. A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians December. *Biol. Conserv.* 108, 221–228.
- Olech, W., Klich, D., Perzanowski, K., 2019. Development of a new Action plan for the European bison. *Oryx* 53, 213–214.
- Pereckiene, A., Kaziunaite, V., Vysniauskas, A., Petkevicius, S., Malakauskas, A., Sarkunas, M., Taylor, M.A., 2007. A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Vet. Parasitol.* 149, 111–116.
- Pouillevet, H., Dibakou, S.-E., Ngoubangoye, B., Poirotte, C., Charpentier, M.J., 2017. A comparative study of four methods for the detection of nematode eggs and large Protozoan cysts in mandrill faecal material. *Folia Primatol.* 88, 344–357.
- Pucek, Z., 1991. History of the European bison and problems of its protection and management. In: *Global Trends in Wildlife Management*, 39. Świat Press, Kraków-Warsaw, Poland, p. 19.
- Pyziel, A.M., Józwiowski, M., Demiaszkiewicz, A.W., 2014. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of the lowland European bison *Bison bonasus* (L.). *Vet. Parasitol.* 202, 138–144.
- Pyziel, A.M., Björck, S., Wiklund, R., Skarin, M., Demiaszkiewicz, A.W., Höglund, J., 2018a. Gastrointestinal parasites of captive European bison *Bison bonasus* (L.) with a sign of reduced efficacy of *Haemonchus contortus* to fenbendazole. *Parasitol. Res.* 117, 295–302.
- Pyziel, A.M., Dolka, I., Werszko, J., Laskowski, Z., Steiner-Bogdaszewska, Z., Wiśniewski, J., Demiaszkiewicz, A.W., Anusz, K., 2018b. Pathological lesions in the

- lungs of red deer *Cervus elaphus* (L.) induced by a newly-described *Dictyocaulus cervi* (Nematoda: trichostrongyloidea). *Vet. Parasitol.* 261, 22–26.
- Pyziel, A.M., Demiaszkiewicz, A.W., Klich, D., Laskowski, Z., 2019. A morphological and molecular comparison of *Eimeria bovis*-like oocysts (Apicomplexa: Eimeriidae) from European bison, *Bison bonasus* L., and cattle, *Bos taurus* L., and the development of two multiplex PCR assays for their identification. *Vet. Parasitol.* 275.
- Pyziel, A.M., Demiaszkiewicz, A.W., Osińska, B., Dolka, I., Anusz, K., Laskowski, Z., 2020. Usefulness of PCR–RFLP of 18S rRNA gene for rapid post-mortem diagnostics of highly pathogenic *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) of European bison, *Bison bonasus* L. with histopathological correlation. *Int. J. for Parasitol. Parasites Wildl.* 12, 13–18.
- Raczyński, J., 1978. Żubr (European Bison). Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warsaw, Poland.
- Roepstorff, A., Nansen, P., 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. *FAO Animal Health Manual* 3, 161.
- Sousa, J.E., Carvalho, E.F., Levenhagen, M.A., Chaves, L.A., Costa-Cruz, J.M., 2016. Diagnosis of the pinworm *Syphacia muris* in the Wistar rat *Rattus norvegicus*. *J. Helminthol.* 90, 117–120.
- Stephen, C., 2014. Toward a modernized definition of wildlife health. *J. Wildl. Dis.* 50, 427–430.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 39–50, 69–73, 799.
- Treboganova, N., 2011. Capture and Transportation of Animals from European Bison Breeding Centre of Priksko-Terrasnyj Nature Biosphere Reserve, 4. *Eur. Bison. Conserv. Newsl.* pp. 121–124.
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Zikmund, M., Langrová, I., 2017. Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biol. Invasions* 19, 1121–1125.
- Willis, H.H., 1921. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med. J. Aust.* 8, 375–376.
- Wood, I.B., et al., 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 58, 181–213.
- Wróblewski, K., 1927. Żubr W Puszczy Białowieskiej. Wydawnictwo Polskie, Poznań.
- Ziomko, J., Cencek, T., 1999. Inwazje Pasożytnicze Zwierząt Gospodarskich. Wybrane Metody Diagnostyczne. Drukarnia Piotra Włodarskiego, Warszawa, p. 14.



Endoparasite loads and the efficacy of conventional anthelmintics against gastrointestinal nematodes in captive European bison

Marta Gałazka^{a,b,*}, Daniel Klich^c, Katarzyna Filip-Hutsch^a, Wanda Olech^c, Krzysztof Anusz^a, Anna M. Pyziel^a

^a Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences - WULS, Nowoursynowska 159, 02-776, Warsaw, Poland

^b Municipal Zoological Garden in Warsaw, Ratuszowa 1/3, 03-461, Warsaw, Poland

^c Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences - WULS, Ciszewskiego 8, 02-787, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Bison bonasus
Coproscopy
FECRT
EHT
LDT
Anthelmintic efficacy
Captive
Ungulate

ABSTRACT

Although little information exists on the efficacy of deworming in wild ruminants, gastrointestinal nematodes have been found to demonstrate increasing drug resistance. The spread of drug-resistant strains may be increased by transmission among livestock and susceptible wildlife species, thus posing a potential threat to endangered species, such as the European bison.

The aim of the study was twofold: to identify the parasite loads in captive European bison with the use of coprological techniques, and to test the influence of other nearby ungulates on the richness of bison parasitofauna. Additionally, the efficacy of deworming procedures against gastrointestinal nematodes in bison was evaluated. The survey was based on a coprological investigation of 285 fecal samples from 156 European bison in 15 enclosures.

The parasitofauna of the captive European bison was consistent with those of free-ranging populations. The highest prevalence was noted for *Eimeria* spp. oocysts (60.7%), strongyle eggs (50.9%), *Fasciola hepatica* eggs (13.1%), *Dictyocaulus viviparus* larvae (12.3%) and *Trichuris* sp. Eggs (9.47%). Moreover, the close proximity of other ungulate species resulted in a higher diversity of parasite species.

In all cases, deworming with albendazole, fenbendazole and ivermectin proved to be ineffective against strongylids and *Trichuris* sp. The results of fecal egg count reduction test (FECRT) ranged from 37.2 to 99.6% (95% CI <90%) for albendazole; values >95% (95% CI = 41–100) were noted for fenbendazole, and FECRT ranged from 63.2 to 97.5 (95% CI = 0–99) for ivermectin.

As the results of anthelmintic treatment are unsatisfactory, it seems justified to continue study in this area. Our study is the first large-scale attempt to evaluate the efficacy of anthelmintics in captive European bison. The potential sharing of parasite species between bison and other ungulates should also be further investigated from the perspective of minimizing the risk of the spread of drug-resistant parasite strains.

1. Introduction

The last decade has seen an increase in cases of gastrointestinal nematode resistance to anthelmintics worldwide (Kaplan and Vidyashankar, 2012; Vercruysse et al., 2018). In addition to infecting livestock and causing economic losses to livestock farming, nematodes can also be transmitted to wild host species, thus increasing their spread, including that of drug-resistant strains (Barone et al., 2020). This phenomenon

could also affect the diversity of wild ruminants (Williams et al., 2002; Barone et al., 2020) and pose a potential threat to endangered species such as European bison, *Bison bonasus*, which is listed by the IUCN as a near-threatened species (IUCN, 2022). Very little information exists on the efficacy of deworming in wild ruminants. One key consideration is that long-term, routine deworming treatments are associated with drug resistance (Kaplan and Vidyashankar, 2012; Pyziel et al., 2018a).

According to recent data, the global European bison population

* Corresponding author. Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences - WULS, Nowoursynowska 159, 02-776, Warsaw, Poland.

E-mail address: marta.a.galazka@gmail.com (M. Gałazka).

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.06.005>

Received 7 March 2023; Received in revised form 17 May 2023; Accepted 17 June 2023

Available online 19 June 2023

2213-2244/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

currently comprises 9500 individuals, of which 25% live in captivity (Raczyński and Bołbot, 2022). Captive animals are important for the survival of the species as they are often used in reintroduction programs and conservation strategies (Tear et al., 1993; Mathews et al., 2006); this is also the case for European bison (Olech and Perzanowski 2022). All surviving European bison were restored from a small group of only 12 founders. This has resulted in a dramatic decrease in their genetic variation, making them particularly vulnerable to diseases, including parasitoses (Olech and Perzanowski, 2002; Kita and Anusz, 2006; Krasńska and Krasński, 2007; Demiaszkiewicz et al., 2009). Parasitic invasions are likely to cause severe symptoms, e.g., hemorrhagic diarrhea or bronchitis, and may pose major problems in captive populations (McCallum and Dobson, 1995; Jolley and Bardsley, 2006; Pyziel et al., 2018b).

Parasitic fauna characteristic of cervids, cattle and small ruminants are commonly found in European bison, which foster parasite exchange and the transmission of anthelmintic resistance mutations between domestic and wildlife species (Barone et al., 2020). In such cases, the risk of infection is strongly influenced by direct or indirect contact between European bison, livestock, and other free-ranging animals. In European bison, the most prevalent endoparasites are nematodes from the Trichostrongylidae family, as well as *Trichuris* sp. and *Fasciola hepatica* (Karbowski et al., 2014b). Bison most commonly share parasites with cattle (*Bos taurus*, e.g., *F. hepatica*, *Dictyocaulus* spp.), followed by roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*, e.g., *Spiculoptera* *asymmetrica*, *Cooperia surnabada*); however, cases of cross-transmission have also been recorded with moose (*Alces alces*) (e.g., *Parafasciolopsis fasciolaemorphia*) (Karbowski et al., 2014a, 2014b).

Stephens et al. (2019) indicate that the risk of infection in endangered species may be significantly increased by proximity to other species susceptible to the same parasites. We hypothesized that parasite diversity in European bison could also be increased by close proximity to other ungulate species that are susceptible to infestation with the same parasites.

The aims of the study were to identify the species of parasitofauna present in captive European bison in Poland and evaluate the efficacy of deworming procedures against gastrointestinal nematodes in the European bison. The study also evaluated the impact of other nearby ungulates on the richness of the parasitofauna in European bison.

2. Material and methods

2.1. Material collection and area of the study

The study was performed in 15 European bison enclosures in Poland in 2018–2020, including six breeding centers (Białowieża Breeding Center, Smardzewice Breeding Center, Niepołomice Breeding Center, Gołuchów Breeding Center, Pszczyna-Jankowice Breeding Center, Wolisko Breeding Center), five zoos (Bałtów zoo, Warsaw zoo, Ustroń zoo, Pszczyna zoo and Poznań zoo) and four enclosures (Białowieża enclosure, Kiermsy enclosure, Międzyzdroje enclosure, Muczne enclosure) (Fig. 1). The study was conducted on animals of both sexes in the age range <1–17 years (Tables 4–7), but there was no division into age groups.

Captive cervids such as red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and moose (*Alces alces*) were present in the vicinity of the Białowieża, Pszczyna-Jankowice and Gołuchów breeding centers and the Bałtów, Międzyzdroje, Pszczyna and Ustroń enclosures. The only neighboring equid species was the Polish konik (*Equus Fesus Caballus*) in the case of Gołuchów Breeding Center and Białowieża Enclosure. As for bovids, European mouflon (*Ovis aries musimon*) were kept in close proximity to the European bison in Pszczyna enclosure and Ustroń zoo, and scimitar oryx (*Oryx dammah*) was kept close to bison in Warsaw zoo (Table 1).

The proximity of other ungulate species was assessed based on the distance between the enclosures. Neighborliness was recognized in cases where enclosures of different animal species were bordered by a fence or were located in the same part of the reserve, but separated by a path or road. Locations where no other ungulate species were kept, or where the European bison were located in a distant part of the center, were considered not to meet these criteria. Neither the Białowieża, Smardzewice, Niepołomice or Wolisko Breeding Centers, nor the Kiermsy and Muczne enclosures or Poznań zoo were positioned near cervids, equids or bovids (Fig. 1).

A total of 285 fecal samples were collected. Collection was performed in the spring and fall seasons to account for seasonal fluctuations in parasite activity and the timeframes of annual deworming treatments; it was limited to individuals which had been in a given enclosure for at least one month.

Sampling was carried out under conditions without heavy rainfall and when identification of the studied individual was possible. Feces samples were collected from the top of freshly passed deposits on the

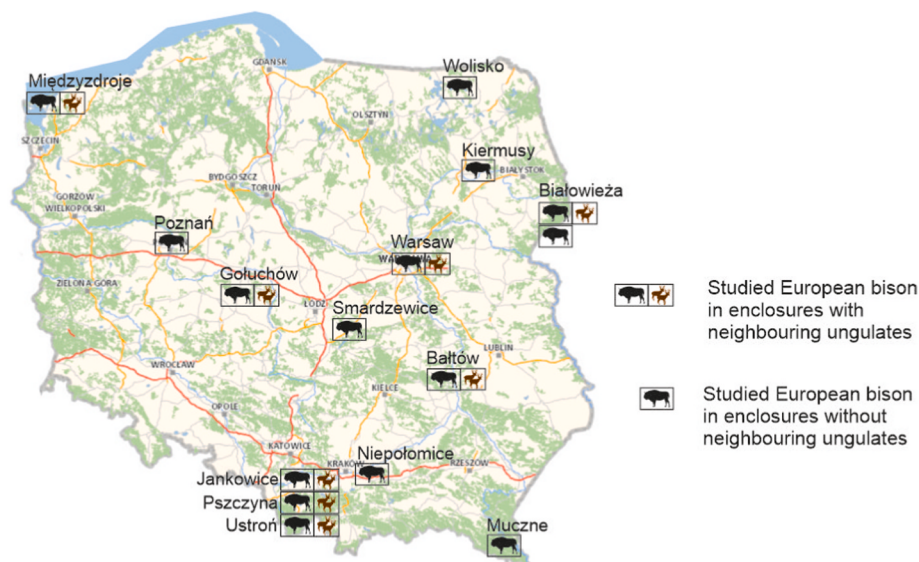


Fig. 1. Location of coproscopically examined European bison enclosures and other ungulate species in the vicinity of these enclosures in Poland.

Table 1

Number of faecal samples examined in European bison enclosures and other ungulate species in the vicinity of these enclosures.

Location of enclosure	No. of examined faecal samples	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Roe deer (<i>Capreolus</i>)	Fallow deer (<i>Dama</i>)	Moose (<i>Alces alces</i>)	Polish konik	European mouflon (<i>Ovis aries musimon</i>)	Scimitar oryx (<i>Oryx dammah</i>)
Enclosures								
Białowieża	23	+	+		+	+		
Kiermsy	2							
Międzyzdroje	9	+	+					
Muczne	53							
Breeding centers								
Białowieża	21							
Gołuchów	27			+		+		
Niepołomice	10							
Pszczyna-Jankowice	47	+	+	+				
Smardzewice	6							
Wolisko	9							
ZOOs								
Białtów	7			+				
Poznań	5							
Pszczyna	17	+		+			+	
Ustroń	17	+					+	
Warsaw	32							+

ground. These were placed in 50 ml plastic tubes at 4 °C and promptly transferred to the laboratory for coprological investigation. The samples were collected with the support of the staff at the breeding center or enclosure and with the consent of the authorities of the centers or enclosures; they were examined immediately, no later than 2 days after collection. Due to the nature of the study, approval was not required from local ethical commissions, according to Polish law.

2.2. Coprological investigation

All 285 samples, collected from 156 European bison, were examined by a modified McMaster technique in sucrose solution (SG = 1.27) to detect nematode eggs and *Eimeria* oocysts. The eggs were then identified to the species, genus or family level (Shorb, 1939; Skryabin et al., 1991; Taylor et al., 2007; Dellings et al., 2020). The oocysts were determined to the genus level according to Duszynski and Wilber (1997) and Pyziel et al. (2014, 2019). In total, 268 samples were tested for lungworm larvae using the Baermann technique (Eysker, 1997); 259 were tested for trematode eggs using the sedimentation method (Pyziel et al., 2014a). Thus, only 259 of all 285 samples were investigated using all three coprological methods. For each method, 3 g fecal samples were used. The samples were investigated using a LAB 40 light microscope (OPTA-TECH, Poland) at $\times 100$ –400 magnification for the McMaster technique, a stereoscopic microscope (Delta Optical) at $\times 100$ magnification for the Baerman technique, and $\times 40$ magnification for the sedimentation method.

2.3. Anthelmintic efficacy

In eight European bison reserves in spring or autumn, the efficacy of treatment against gastrointestinal nematodes with three groups of anthelmintics was evaluated: albendazole, fenbendazole (benzimidazole) and ivermectin (macrocyclic lactones), either alone or combined with praziquantel and levamisole (imidazothiazole).

The animals were treated with the following: albendazole (10 mg/kg P.O.; Valbazen 10%, Zoetis, Belgium) or fenbendazole (10 mg/kg P.O.; Fenbenat 40 mg/g, VETOS-FARMA, Poland) for five consecutive days; ivermectin (0.3 mg/kg P.O.; Ivermektyna Vetos-Farma 0.6g/100g, VETOS-FARMA, Poland) administered once, or levamisole (7.5 mg/kg P.O.; Levamol 5%, Vetoquinol Biowet, Poland) administered once.

In Ustroń and Warsaw zoos, as well as in Niepołomice Breeding Center, the body weight of each European bison was estimated, and the

dosages of anthelmintics were mixed with concentrate and administered individually. In Białowieża and Gołuchów Breeding Centers, Poznań and Pszczyna zoos, and Białowieża and Muczne enclosures, the animals were divided into groups based on the estimated body weight, and the drugs were administered by mixing them in pelleted feed. One day before deworming, the animals did not receive concentrate feed.

The Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) was used to determine the efficacy of anthelmintic treatment (Coles et al., 1992, 2006). FECRT was performed on 57 individual fecal samples using a modified McMaster technique (Taylor et al., 2007). Testing was performed one day before planned deworming (pretreatment control) and after anthelmintic treatment (McKenna, 1994). Only samples with egg counts (EPG) of 100 or greater were included in the study, as recommended for cattle (Coles et al., 2006); altogether, 35 samples were qualified for FECRT analysis and 22 were excluded.

The FECRT protocol for cattle was modified due to the low number of individuals in the enclosures. All animals were included in the study groups; no control groups were created, and the number of samples qualified for the FECRT was lower than recommended by WAAVP. To perform calculations on a larger group of samples, the overall FECRT analysis was performed taking into consideration all animals dewormed with the same drug in all enclosures. The overall FECRT score was calculated for each analyzed anthelmintic: albendazole, fenbendazole and ivermectin.

Anthelmintic efficacy was evaluated for both strongylids (30 samples) and *Trichuris* sp. (five samples). Post-treatment collection was performed depending on the drug used: benzimidazole 8–10 days after deworming, imidazothiazole 3–7 days later, macrocyclic lactones 14–17 days later.

Reduced deworming efficacy was determined according to the WAAVP guidelines: FECRT <95% and lower limit of 95% CI <90% (Coles et al., 1992). The analysis was performed using the eggCounts-2.3 module on R version 3.6.1, developed at the Department of Mathematics at the University of Zurich (Wang and Paul, 2018; Wang et al., 2018). Data were analyzed using a two-sample paired model, i.e., pre- and post-treatment egg counts, for each individual with a correction factor of 50.

2.4. Statistical analysis

2.4.1. Impact of other ungulate species on parasitofauna of the European bison

The statistical analyses only included the fecal samples obtained from European bison before deworming ($n = 207$). The influence of the proximity of other ungulates on the presence of parasites in European bison was tested using two generalized linear models with a Poisson distribution and a log link function. The analysis was divided into two parts based on the results of the McMaster technique. The first model analyzed the number of *Eimeria* species in samples from the European bison in the enclosures: the number of species found in each sample from an individual was the dependent variable, and the explanatory variables were season and the presence of other ungulates in the vicinity of European bison's enclosure. In the second model, the same analysis was performed, but the dependent variable was the number of genera of all parasites detected by the McMaster technique, *Eimeria* spp. included, with no distinction by species, i.e., if two different species of *Eimeria* occurred, only one genus was recorded. The sex and age of the European bison specimens were not included due to insufficient individual data.

Both models included two independent variables, viz. proximity and season, and the interaction proximity*season. Model selection was performed by analyzing all variants of the model, including the null model (Burnham and Anderson, 2002). Finally, we ranked the models according to their AIC values and used the highest ranked model with the lowest AIC.

3. Results

3.1. Coprological findings

The McMaster technique detected Oocysts of *Eimeria* spp. and eggs of gastrointestinal nematodes belonging to the order Strongylida, including representants of the superfamily Strongyloidea and Trichostrongyloidea (strongylids), the superfamily Ascaridoidea, as well as the genera *Trichuris*, *Nematodirus* and *Aonchotoca*, and the genus *Moniezia*. Larvae of lung nematodes from the genus *Dictyocaulus* were identified with the Baermann method. Trematode eggs of the genus *Fasciola* and family Paramphistomidae were found by sedimentation (Table 2).

The highest prevalence was noted for *Eimeria* spp. oocysts (60.7%), strongyle eggs (50.9%), *Fasciola hepatica* eggs (13.1%), *Dictyocaulus viviparus* larvae (12.3%) and *Trichuris* sp. Eggs (9.5%). The prevalence of other parasites did not exceed 4% (Table 2). The highest median oocyst/egg per gram (OPG/EPG) scores were obtained for *Eimeria* spp. (OPG = 250) and strongylids (EPG = 200), while the highest ranges were noted for *Trichuris* sp. (EPG = 50–13000), *Eimeria* spp. (OPG = 50–6600) and strongylids (EPG = 50–2850) (Table 2).

The enclosures exhibiting the highest diversity of parasitic genera in

the European bison were Pszczyna-Jankowice and Gołuchów (eight genera), followed by Wolisko, Białowieża Breeding Center and Białowieża enclosure (six genera). Eggs of *Moniezia* sp. were found only in Gołuchów and Pszczyna-Jankowice, whereas eggs of Ascaridoidea were found in animals kept in both Poznań Zoo and Białowieża enclosure.

Oocysts of eleven species of *Eimeria* were identified (Table 3). The most prevalent were *Eimeria bovis* (49.8%), *E. auburnensis* (18.6%) and *E. subspherica* (11.6%), whereas the highest medians were noted for *E. bovis* (OPG = 200) and *E. alabamensis* (OPG = 150). The greatest ranges were found for *E. bovis* (OPG = 50–6350) and *E. alabamensis* (OPG = 50–1650) (Table 3). The highest diversity of *Eimeria* species was observed in Pszczyna-Jankowice (nine species) and Bałtów and Muczne (seven species). Kiermusy was the only enclosure where no coccidia were noted. Detailed results for each enclosure are available in the supplementary material (Supplementary material 1).

3.2. Anthelmintic efficacy

3.2.1. Fecal egg count reduction test (FECRT)

Two benzimidazole drugs were used: viz. fenbendazole in three enclosures and albendazole in five. Ivermectin, a macrocyclic lactone, was used in two breeding centers (Tables 4–7). Levamisole, an imidazothiazole, was used in one location; in this case, the egg counts were lower than 100 EPG and the samples were excluded from the FECRT analysis.

In all cases (four reserves, 18 samples), deworming with albendazole was not efficient against strongylids, as shown by the FECRT results, which ranged from 37.2 to 99.6% (95% CI <90%) with a mean value of 48% (95% CI = 17–49) (Table 4). A similar result was obtained with the use of fenbendazole in the Białowieża and Gołuchów Breeding Centers, with FECRT results of >95% (95% CI = 41–100; 47–100, respectively). Taking these results together, and adding the single result from the Niepołomice Breeding Center, the total FECRT score was 99.8% (95% CI = 77–100) (Table 5).

The last examined anthelmintic, ivermectin, was also not effective against strongylids in the two reserves where it was used (five samples). The FECRT scores were 97.5 (95% CI = 41–99) in the Białowieża Breeding Center and 63.2% (95% CI = 0–57) in the Gołuchów Breeding Center. The overall FECRT score for ivermectin calculated from all enclosures was 76% (95% CI = 8–76) (Table 6).

Albendazole was also ineffective against *Trichuris* sp., with a FECRT score of 51.7% (95% CI = 19–52) in Warsaw Zoo and 99.5% (95% CI = 30–100) in the Muczne enclosure. Its mean FECRT score was 67.3% (95% CI = 47–67) (Table 7).

Of the twelve analyzed anthelmintic treatments, only five scored FECRT >95% and none reached the threshold of 95% CI >90%. Among the detected helminths, *F. hepatica* eggs, Paramphistomidae eggs and

Table 2

Coprological findings in European bison after examination by modified McMaster technique ($n = 285$), Baerman technique ($n_1 = 268$) and sedimentation method ($n_2 = 259$).

	McMaster method							Baerman technique	Sedimentation method	
	<i>Trichuris</i> sp.	<i>Eimeria</i> spp.	Trichostrongyloidea	<i>Nematodirus</i> sp.	<i>Moniezia</i> sp.	<i>Capillaria</i> sp.	Ascaridoidea	<i>Dictyocaulus viviparus</i>	<i>Fasciola hepatica</i>	Paramphistomidae
Prevalence (%)	9.47	60.70	50.88	2.46	0.70	1.75	0.70	12.31	13.13	3.86
Mean EPG/OPG/LPG	1601.85	538.29	385.52	100.00	150.00	140.00	75.00	9.55	5.38	3.10
SD	3464.64	865.70	453.19	70.71	141.42	74.16	35.36	11.46	5.92	2.42
Median EPG/OPG	100.00	250.00	200.00	50.00	150.00	150.00	75.00	6.00	3.00	2.00
Range EPG/OPG	50–13,000	50–6600	50–2850	50–200	50–250	50–250	50–100	1–53	1–27	1–8

EPG/OPG/LPG: eggs/oocyst/larvae count per gram.

Table 3*Eimeria* oocysts findings in European bison after examination by modified McMaster method ($n = 285$).

	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. bovis</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. bukidnonensis</i>	<i>E. canadensis</i>	<i>E. cylindrica</i>	<i>E. ellipsoidal</i>	<i>E. pellita</i>	<i>E. subspherica</i>	<i>E. zuernii</i>
Prevalence (%)	1.05	18.60	49.82	1.75	0.35	1.05	0.70	2.11	6.32	11.58	8.77
Mean OPG	133.33	221.70	506.87	60.00	250.00*	66.67	50.00	100.00	100.00	119.70	72.00
SD	28.87	300.08	903.51	22.36		28.87	0.00	44.72	127.19	99.95	45.83
Median OPG	150.00	100.00	200.00	50.00		50.00	50.00	100.00	50.00	100.00	50.00
Range OPG	100–150	50–1650	50–6350	50–100		50–100	50,00	50–100	50–550	50–450	50–250

OPG: oocyst count per gram; *result from only one sample.

Table 4

Efficacy of albendazole against Strongylidae infection in European bison.

Location of enclosure	Sex	Age [years]	No. of examined faecal samples	No. of faecal samples with EPG ≥ 100	FECRT %	95%CI	Efficacy of deworming
Ustroń zoo	females	2, 12	3	2	94.3	10–96.8	inefficient
	males	17					
Pszczyna zoo	females	7, 11, 9	6	6	37.2	0–33	inefficient
	males	2, 2, 7					
Ustroń zoo	females	2	3	3	60.2	0–55	inefficient
	males	<1, 17					
Białowieża enclosure	females	8, 8, 10, 16	5	4	90.8	55–92	inefficient
	males	5					
Muczne enclosure	females	1, 1, 9, 9, 11, 11	9	3	99.6	47–100	inefficient
	males	1, 1, 11					
Total			26	18	48.1	17–49	

Table 5

Efficacy of fenbendazole against Strongylidae infection in European bison.

Location of enclosure	Sex	Age [years]	No. of examined faecal samples	No. of faecal samples with EPG ≥ 100	FECRT %	95%CI	Efficacy of deworming
Białowieża Breeding Center	females	8, 8, 10, 16	5	3	99.5	41–100	inefficient
	males	5					
Goluchów Breeding Center	females	11, 11	6	3	99.6	47–100	inefficient
	males	1, 1, 3, 11					
Niepołomice Breeding Center	females		1	1	–	–	inefficient
	males	10					
Total			12	7	99.8	77–100	

Table 6

Efficacy of ivermectin against Strongylidae infection in European bison.

Location of enclosure	Sex	Age [years]	No. of examined faecal samples	No. of faecal samples with EPG ≥ 100	FECRT %	95%CI	Efficacy of deworming
Białowieża Breeding Center	females	1, 1, 1, 1.5	6	3	97.5	41–99	inefficient
	males	1, 1					
Goluchów Breeding Center	females	1, 12, 12	5	2	63.2	0–57	inefficient
	males	4, 12					
Total			11	5	76	8–76	

Table 7Efficacy of albendazole against *Trichuris* sp. infection in European bison.

Location of enclosure	Sex	Age [years]	No. of examined faecal samples	No. of faecal samples with EPG ≥ 100	FECRT %	95%CI	Efficacy of deworming
Warsaw ZOO	females	<1, 1, 1.5, 3, 8.5, 8.5	8	3	51.7	19–52	inefficient
	males	2.5, 11.5					
Muczne enclosure	females	1, 1, 9, 9, 11, 11	9	2	99.5	30–100	inefficient
	males	1, 1, 11					
Total			17	5	67.3	47–67	

D. viviparus larvae were noted in 14%, 5.3% and 5.3% of samples, respectively, before deworming, and in 8.7%, 6.5% and 6.4% of samples following treatment, but the efficacy of treatment against trematodes

was not evaluated in this study.

3.3. Impact of other ungulate species on parasitic fauna in European bison

The European bison kept near to other ungulates showed an average number (1.5) of parasite types/genera. This value was significantly higher ($p = 0.031$) than in the European bison without ungulate neighbors (mean = 1.2 parasite types).

In addition, European bison kept close to other ungulate species also demonstrated an increased diversity of *Eimeria* species (Fig. 1) in autumn ($p = 0.000$) and winter ($p = 0.035$). In these two seasons, the mean number of parasite species was higher than 1.5 in enclosures with neighboring ungulates, while in enclosures without neighboring ungulates it was half the value (Fig. 2). In contrast, no differences were observed in spring ($p = 0.740$), when European bison in both sets of enclosures had a mean score of 0.8.

4. Discussion

The present study is the first large-scale attempt to evaluate the efficacy of anthelmintics in captive European bison. In all cases analyzed, based on WAAVP criteria, deworming proved to be ineffective for both strongylids and *Trichuris* sp. when using albendazole, fenbendazole and ivermectin. Therefore, the FECRT results in our study indicate the possible development of drug resistance in gastrointestinal nematodes in Polish enclosures. Previously, the only available data on FECRT examination in European bison was obtained in Avesta Visentpark in Sweden. The findings suggest that fenbendazole has reduced efficacy against strongylids, particularly *H. contortus* (Pyziel et al., 2018a). In addition, a study in Springe, Germany reported the presence of fenbendazole-resistant *H. contortus*, as well as suspected macrocyclic lactone resistance, although the latter was not confirmed (Springer et al., 2022). The low efficacy of albendazole against *Trichuris* sp. in our study might be a result of the generally low effectiveness of benzimidazoles in relation to this genus (Borgsteede, 1979; Hansen et al., 2014; Adegnik et al., 2015).

The FECRT protocol applied in our study in European bison differed from the standard WAAVP protocol recommended in livestock (Coles et al., 1992, 2006), thus the results should be interpreted with caution. From a total of 2500 European bison living in Poland, only about 200 specimens are kept in captivity (Raczyński and Bołbot, 2022). Therefore, deviations from the basic WAAVP guidelines included the small group sizes of the examined animals, thus there were no control groups and low pretreatment EPG values. Nevertheless, local parasite populations seem to have drug-resistant traits, which highlights the need for further research. It is reasonable to introduce preventive measures such as

enclosure rotations and differentiated deworming protocols, and every newly imported animal should be treated as being potentially infected with drug-resistant parasites (Conder and Campbell, 1995; Gałazka et al., 2022). Drug resistance may develop for various reasons in captive non-domestic animals, such as inaccurate determination of body weight, which results in incorrect anthelmintic drug doses; in addition, individual drug administration and ensuring complete dosage intake can also be problematic, and there may be limited possibilities for enclosure rotation (Conder and Campbell, 1995; Coles et al., 2006).

The parasites' eggs, oocysts and larvae detected during our study match data on species diversity and the prevalence and intensity of parasitic infestation in European bison in central Europe (Balčiauskas, 1999; Forte et al., 2012, 2012a, 2012b; Yurchanka and Anisimava, 2015), but most available reports concern free-living populations. The highest prevalence was found for coccidia, with *E. bovis* as the most common species, which has also been commonly observed in European bison in previous studies (Pyziel et al., 2011, 2018a; Demiaszkiewicz et al., 2014, 2018, 2020, 2022; Klich et al., 2021). The high values of OPG for *Eimeria* spp. noted in our study may be a result of a range of individual and environmental factors, including limited or no enclosure rotation in captive European bison, the age of the examined animals, increased oocyst production in infected but subclinical animals, and high animal density in enclosures (Larsson et al., 2006; Pyziel et al., 2011). The presence of eggs of *F. hepatica* varied in both captive and free-living animals, depending on the examined populations (Demiaszkiewicz et al., 2014, 2022), while the prevalence of strongyle and *Trichuris* sp. Eggs and *D. viviparus* larvae in our study was generally lower in comparison to free-living European bison (Demiaszkiewicz et al., 2014, 2022). The examined animals were in good condition, were kept in small herds, and were regularly dewormed, therefore they may have demonstrated strong resistance to parasitic infections, which could have resulted in lower fecal egg counts (Medzhitov et al., 2012; Budischak et al., 2018; Roy and Kirchner, 2000). On the other hand, captive European bison might be genetically more susceptible to pathogens (Olech and Perzanowski, 2002; Krasnińska and Krasniński, 2007). As such, living in restricted spaces, often with high population densities, could favor parasite transmission and lead to development of disease symptoms (Olech and Perzanowski, 2002; Kołodziej-Sobocińska et al., 2018).

Furthermore, our results suggest that the diversity of parasite species infecting European bison may be positively influenced by the presence of other ungulate species in neighboring enclosures. Cross-transmission of parasite species between European bison and other wild or domestic ruminants has previously been reported (Drózd, 1961; Drózd et al., 2003; Karbowski et al., 2014a, 2014b; Walker and Morgan, 2014;

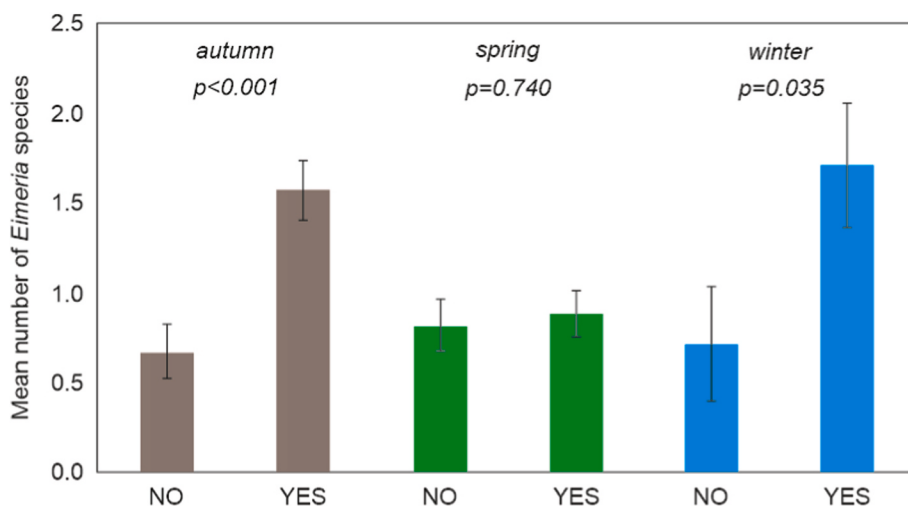


Fig. 2. Mean ($\pm$ SE) number of *Eimeria* species in European bison without ungulate neighbors (NO) and kept near other ungulates (YES) for seasons, calculated in a generalized linear model. Differences were statistically significant in the pairwise comparison for autumn and winter (p values shown above the bars).

Vadlejch et al., 2017; Pyziel et al., 2018a). This also applies to coccidia, whose interspecies transmission between domestic and wild bovids has also been observed (Sayin, 1968; Penzhorn et al., 1994; Pyziel et al., 2014, 2020; Dubey, 2018). However, as shedding of parasite eggs and oocysts depends on many other environmental and individual factors (Larsson et al., 2006; Pyziel et al., 2011), the impact of other ungulates on the parasite species diversity in captive European bison should be thoroughly confirmed in the future.

Evaluation of deworming efficacy is a very important part of monitoring the health status of endangered animals. European bison have become extinct in the wild but their population has recovered from captive animals, thus highlighting the importance of monitoring the efficacy of anthelmintic treatment in captive populations. Since the results of our study indicate that anthelmintic treatments are unsatisfactory, it seems justified to continue study in this area. The potential sharing of parasite species between European bison and other ungulates should also be further investigated from the perspective of minimizing the risk of spreading drug-resistant parasite strains.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Wanda Olech reports financial support was provided by Forest Fund Poland, contract no. OR.271.3.10.2017.

Acknowledgements

This study was conducted as part of the Doctoral thesis of Mrs. Marta Gałazka. This work was supported by the Forest Fund, Poland as part of 'Complex project of European bison conservation by State Forests' [contract no. OR.271.3.10.2017].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.06.005>.

References

- Adegnika, A.A., Lötsch, F., Mba, R.M.O., Ramharter, M., 2015. Update on treatment and resistance of human trichuriasis. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2, 218–223.
- Balčiauskas, L., 1999. European Bison (*Bison bonasus*) in Lithuania: status and possibilities of range extension. *Acta Zool. Lit.* 9, 3–18.
- Barone, C.D., Wit, J., Hoberg, E.P., Gilleard, J.S., Zarlenga, D.S., 2020. Wild ruminants as reservoirs of domestic livestock gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 279, 109041.
- Borgsteede, F.H.M., 1979. The activity of albendazole against adult and larval gastrointestinal nematodes in naturally infected calves in The Netherlands. *Vet. Q.* 1, 181–188.
- Budischak, S.A., O'Neal, D., Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., 2018. Differential host responses to parasitism shape divergent fitness costs of infection. *Funct. Ecol.* 32, 324–333.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (Eds.), 2002. *Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-Theoretic Approach*. Springer, New York.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P. J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44, 35–44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136, 167–185.
- Conder, G.A., Campbell, W.C., 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Adv. Parasitol.* 35, 1–84.
- Delling, C., Thielebein, J., Dausgies, A., Schmäsche, R., 2020. *Toxocara vitulorum* infection in European bison (*Bison bonasus*) calves from Central Germany. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 22, 100499.
- Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., Osińska, B., 2009. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Białowieża forest. *Pol. J. Vet. Sci.* 12, 385–388.
- Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Kuligowska, I., Lachowicz, J., 2014. Monitoring of parasite infections in the European bison from three forests of north-eastern Poland (Białowieża primeval forest, borecka forest, knyszynska forest) in 2011–2013. *European Bison Conservation Newsletter* 7, 35–42.
- Demiaszkiewicz, A.W., Bielecki, W., Rodo, A., Pyziel, A.M., Filip, K.J., 2018. Parasitofauna of European bison *Bison bonasus* (L.) in borecka forest. *Med. Weter.* 74, 253–256.
- Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Filip-Hutsch, K., Januszczak, M., Olech, W., 2020. Parasitological monitoring of European bison in the Bieszczady mountains. *Med. Weter.* 76, 111–114.
- Demiaszkiewicz, A.W., Filip-Hutsch, K., Olech, W., 2022. Parasitological monitoring of European bison in the West Pomeranian voivodeship on the basis of coproscopical examination. *Med. Weter.* 77, 6717–2022.
- Drózd, J., 1961. A study on helminth and helminthiasis in bison, *Bison bonasus* (L.) in Poland. *Acta Parasitol. Pol.* 9, 55–95, 45.
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., 2003. Expansion of the asiatic parasite *Ashworthius sidemi* (nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in polish territory. *Parasitol. Res.* 89, 94–97.
- Dubey, J.P., 2018. A review of coccidiosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Vet. Parasitol.* 256, 50–57.
- Duszynski, D.W., Wilber, P.G., 1997. A guideline for the preparation of species description in the Eimeriidae. *J. Parasitol.* 83, 333–336.
- Eysker, M., 1997. The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves. *Vet. Parasitol.* 69, 89–93.
- Forste, C., Diaferia, M., Manganelli, E., Piergili Fioretti, D., Tralbalza Marinucci, M., Olivieri, O., 2012. The European bison living in the national park of Poloniny, Slovakia: dietary habits and dynamics of endoparasite population. In: *Zborník Referátov Z 9. Národnej Konferencie O Biosférických Rezerváciách Na Slovensku*.
- Gałazka, M., Klich, D., Anusz, K., Pyziel-Serafin, A.M., 2022. Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, *Bison bonasus* designated for translocation: comparison of two coprological methods. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 17, 166–173 (hnnn).
- Hansen, T.V.A., Friis, C., Nejsun, P., Olsen, A., Thamsborg, S.M., 2014. Uptake of benzimidazoles by *Trichuris suis* in vivo in pigs. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* 4, 112–117.
- IUCN, 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org>, 12.22.
- Jolley, W.R., Bardsley, K.D., 2006. Ruminant coccidiosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 22, 613–621.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78.
- Karbowiak, G., Demiaszkiewicz, A., Pyziel, A., Wita, I., Moskwa, B., Werszko, J., Bień, J., Goździk, K., Lachowicz, J., Cabaj, W., 2014a. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 1 the summarising list of parasites noted. *Acta Parasitol.* 59.
- Karbowiak, G., Demiaszkiewicz, A., Pyziel, A., Wita, I., Moskwa, B., Werszko, J., Bień, J., Goździk, K., Lachowicz, J., Cabaj, W., 2014b. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2 the structure and changes over time. *Acta Parasitol.* 59.
- Kita, J., Anusz, K., 2006. In: Kita, J., Anusz, K. (Eds.), *Health Threats for the European bison Particularly in Free-Roaming Populations in Poland*. The SGGW Publishers, Warsaw.
- Klich, D., Łopucki, R., Gałazka, M., Ścibior, A., Gołębiewska, D., Brzezińska, R., Kruszyński, B., Kaleta, T., Olech, W., 2021. Stress hormone level and the welfare of captive European bison (*Bison bonasus*): the effects of visitor pressure and the social structure of herds. *Acta Vet. Scand.* 63, 24.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Kowalczyk, R., 2018. Increased parasitic load in captive-released European bison (*Bison bonasus*) has important implications for reintroduction programs. *EcoHealth* 15, 467–471.
- Krasiński, M., Krasiński, Z.A., 2007. European bison. The Nature Monograph. Mammal Research Institute Polish Academy of Sciences, Białowieża.
- Larsson, A., Dimander, S.O., Rydzik, A., Uggla, A., Waller, P.J., Höglund, J., 2006. A 3-year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle—effects on animal performance. *Vet. Parasitol.* 142, 197–206.
- Mathews, F., Moro, D., Strachan, R., Gelling, M., Buller, N., 2006. Health surveillance in wildlife reintroductions. *Biol. Conserv.* 131, 338–347.
- McCallum, H., Dobson, A., 1995. Detecting disease and parasite threats to endangered species and ecosystems. *Trends Ecol. Evol.* 10, 190–194.
- McKenna, P.B., 1994. Criteria for diagnosing anthelmintic resistance by the fecal egg count reduction test. *N. Z. Vet. J.* 42 (4), 153–154.
- Medzhitov, R., Schneider, D.S., Soares, M.P., 2012. Disease Tolerance as a Defense Strategy. *vol. 335. Science*, New York, N.Y., pp. 936–941.
- Olech, W., Perzanowski, K., 2002. A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. *Biol. Conserv.* 108, 221–228.
- Olech, W., Perzanowski, K. (Eds.), 2022. *European Bison (Bison Bonasus) Strategic Species Status Review 2020*. IUCN SSC Bison Specialist Group and European Bison Conservation Center, Warsaw, pp. 1–138.
- Penzhorn, B.L., Knapp, S.E., Speer, C.A., 1994. Enteric coccidia in free-ranging American bison (*Bison bison*) in Montana. *J. Wildl. Dis.* 30, 267–269.
- Pyziel, A.M., Kowalczyk, R., Demiaszkiewicz, A.W., 2011. The annual cycle of shedding Eimeria oocysts by European bison (*Bison bonasus*) in the Białowieża Primeval Forest, Poland. *J. Parasitol.* 97, 737–739.
- Pyziel, A.M., Józwiński, M., Demiaszkiewicz, A.W., 2014. Coccidia (apicomplexa: eimeriidae) of the lowland European bison *Bison bonasus* (L.). *Vet. Parasitol.* 202, 138–144.
- Pyziel, A.M., Demiaszkiewicz, A.W., Kuligowska, I., 2014a. Molecular identification of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) from red deer from South Western Poland (Lower Silesian Wilderness) on the basis of internal transcribed spacer 2 (ITS-2). *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 523–525.

- Pyziel, A.M., Björck, S., Wiklund, R., Skarin, M., Demiaszkiewicz, A.W., Höglund, J., 2018a. Gastrointestinal parasites of captive European bison *Bison bonasus* (L.) with a sign of reduced efficacy of *Haemonchus contortus* to fenbendazole. *Parasitol. Res.* 117, 295–302.
- Pyziel, A.M., Dolka, I., Werszko, J., Laskowski, Z., Steiner-Bogdaszewski, Ż., Wiśniewski, J., Demiaszkiewicz, A.W., Anusz, K., 2018b. Pathological lesions in the lungs of red deer *Cervus elaphus* (L.) induced by a newly-described *Dictyocaulus cervi* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Vet. Parasitol.* 261, 22–26.
- Pyziel, A.M., Demiaszkiewicz, A.W., Klich, D., Laskowski, Z., 2019. A morphological and molecular comparison of *Eimeria bovis*-like oocysts (Apicomplexa: eimeriidae) from European bison, *Bison bonasus* L., and cattle, *Bos taurus* L., and the development of two multiplex PCR assays for their identification. *Vet. Parasitol.* 275, 108917.
- Pyziel, A., Demiaszkiewicz, A., Osińska, B., Dolka, I., Anusz, K., Laskowski, Z., 2020. Usefulness of PCR–RFLP of 18S rRNA gene for rapid post-mortem diagnostics of highly pathogenic *Eimeria* spp. (Apicomplexa: eimeriidae) of European bison, *Bison bonasus* L. with histopathological correlation. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 12, 13–18.
- Raczyński, J., Bolbot, M., 2022. European bison Pedigree Book 2021 (Białowieża).
- Roy, B.A., Kirchner, J.W., 2000. Evolutionary dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* 54, 51–63.
- Sayin, F., 1968. The sporulated oocysts of *Eimeria ankarensis* n. sp. and of other species of *Eimeria* of buffalo in Turkey and transmission of four species of *Eimeria* from buffalo to cow calves. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 15, 3–4.
- Shorb, D.A., 1939. Differentiation of eggs of various genera of nematodes parasitic in domestic ruminants in the United States. *Techn. Bull. U.S. Dept. of Agriculture*. 694, 1–11.
- Skryabin, K.I., Shikhobalova, N.P., Mougovoi, A.A., 1991. In: Brill, E.J. (Ed.), *Key to Parasitic Nematodes*, ume 2. Oxyurata and Ascaridata. Koln, Leiden, New York, Kobenhaven, pp. 530–533.
- Springer, A., Kloene, P., Strube, C., 2022. Benzimidazole resistant *Haemonchus contortus* in a wildlife park. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 164, 51–59.
- Stephens, P.R., Altizer, S., Ezenwa, V.O., Gittleman, J.L., Moan, E., Han, B., Huang, S., Pappalardo, P., 2019. Parasite sharing in wild ungulates and their predators: effects of phylogeny, range overlap, and trophic links. *J. Anim. Ecol.* 88, 1017–1028.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. The laboratory diagnosis of parasitism. In: Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (Eds.), *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 798–799.
- Tear, T.H., Scott, J.M., Hayward, P.H., Griffith, B., 1993. Status and prospects for success of the endangered species act - a look at recovery plans. *Science* 262, 976–977.
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Zikmund, M., Langrová, I., 2017. Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biol. Invasions* 19, 1121–1125.
- Vercruysse, J., Charlier, J., Van Dijk, J., Morgan, E.R., Geary, T., von Samson-Himmelstjerna, G., Claerebout, E., 2018. Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology* 145, 1655–1664.
- Walker, J.G., Morgan, R.R., 2014. Generalists at the interface: nematode transmission between wild and domestic ungulates. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 242–250.
- Wang, C., Paul, M., 2018. *eggCounts: Hierarchical Modelling of Fecal Egg Counts. R-Packages version 2.2*. <https://CRAN.R-project.org/package=eggCounts>, 1.19.23.
- Wang, C., Torgerson, P.R., Kaplan, R.M., George, M.M., Furrer, R., 2018. Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.* 8, 386–393.
- Williams, E.S., Yuill, T., Artois, M., Fischer, J., Haigh, S.A., 2002. Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev. Sci. Tech.* 2, 139–7.
- Yurchanka, D., Anisimava, A., 2015. Monitoring of the state of helminth infections in various populations of European bison (*Bison bonasus*) in Belarus. *European Bison Conservation Newsletter* 8, 69–74.

Research Article

Cite this article: Gałązka M, Filip-Hutsch K, Klich D, Olech W, Anusz K, Pyziel AM (2024). The variety of abomasal nematode communities of captive and free-roaming populations of European bison, *Bison bonasus* (L.): a morphometric and molecular approach. *Parasitology* 1–10. <https://doi.org/10.1017/S003118202400088X>

Received: 21 March 2024
Revised: 15 July 2024
Accepted: 22 July 2024

Keywords:

Bison bonasus; enclosures; molecular biology; morphology; parasites; wildlife

Corresponding author:

Marta Gałązka;
Email: marta.a.galazka@gmail.com

The variety of abomasal nematode communities of captive and free-roaming populations of European bison, *Bison bonasus* (L.): a morphometric and molecular approach

Marta Gałązka^{1,2} , Katarzyna Filip-Hutsch¹, Daniel Klich³, Wanda Olech³, Krzysztof Anusz¹ and Anna M. Pyziel¹ 

¹Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences (WULS), Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland; ²Municipal Zoological Garden in Warsaw, Ratuszowa 1/3 03-461 Warsaw, Poland and ³Department of Animal Genetics and Conservation, Institute of Animal Sciences, Warsaw University of Life Sciences – WULS, Ciszewskiego 8, 02-787 Warsaw, Poland

Abstract

Most studies concerning parasitic infections in European bison have been performed on free-ranging animals: comparatively little is known about the abomasal nematodes of captive wisents, which are widely used in reintroduction programmes. The aim of the study was to determine the infection level and species composition of abomasal nematodes in captive European bison in enclosures (including zoos) and breeding centres compared to free-ranging individuals. It also includes a morphological analysis of the parasites based on figures and measurement data. Altogether, 11 species of nematodes were detected, with both captive and free-ranging animals demonstrating similar species compositions. Among those, 2 species of blood-sucking nematodes were detected, including *Ashworthius sidemi* and *Haemonchus contortus*. Interestingly, *A. sidemi* was found in almost all free-roaming animals, but only in 1 captive European bison. In addition, *H. contortus* was predominant in captive animals. The morphological identification was confirmed molecularly for 5 nematode species: *A. sidemi*, *H. contortus*, *Ostertagia kolchida*, *O. ostertagi* and *Spiculopteragia boehmi*. The identification was performed using small subunit ribosomal rDNA. The study provides the first available set of specular lengths of the gastric nematodes of European bison, and the first molecular data of *O. kolchida* and *S. boehmi* derived from the same host species. Our findings may simplify the morphometrical and molecular identification of Trichostrongylidae species infecting European bison, and can be useful in developing new management strategies for populations of this near-threatened species in Europe.

Introduction

The global population of European bison (*Bison bonasus*) currently stands at over 10 000 individuals, with the largest groups inhabiting Poland, where the population was estimated at over 2300 free-living individuals and over 200 animals kept in captivity at the end of 2022 (Raczyński, 2023). However, the species remains near-threatened (ICUN), with its main threats being infectious diseases and parasite infestation (Kita and Anusz, 2006; Krasińska and Krasiński, 2013). European bison are known to host a wide diversity of parasites: studies have recorded 88 species, with many being typical for cattle, small ruminants and cervids, but also few species specific to European bison (Karbowiak *et al.*, 2014a). Of these, the most numerous group in European bison are the nematodes, represented by 43 species, with gastrointestinal nematodes (GINs) being the most prevalent (Karbowiak *et al.*, 2014b). Among the GINs, the blood-sucking nematodes of the Haemonchinae subfamily are considered to be of considerable pathogenic and economic importance in both domestic and wild ruminants worldwide (Osińska *et al.*, 2010; Gilleard, 2013); 2 taxa of note include the alien species *Ashworthius sidemi*, brought to Poland with Asiatic deer, and *Haemonchus contortus*, which quickly develops resistance to anthelmintics used in its control (Gilleard, 2013; Demiaszkiewicz *et al.*, 2017; Pyziel *et al.*, 2018). Serious infestation can be fatal for the host, due to the blood loss from the mucosal lesions associated with parasite feeding causing haemorrhagic anaemia (Gilleard, 2013; Kołodziej-Sobocińska *et al.*, 2016a, 2016b).

While the morphological aspects of the parasitofauna of free-ranging European bison are relatively well understood, little molecular data exists regarding their GINs. Also, little is known of the diversity of abomasal nematodes of captive wisents, as most studies of parasitic infections in European bison concern free-roaming individuals. In fact, these are the captive wisents that serve as a genetic reservoir for the species, and are more often translocated, i.e. between breeding centres, zoos or enclosures in Poland and abroad. Furthermore, while considerable data concerning the morphological identification of GINs is available for many ruminant species (Lichtenfels and Pilitt, 1991; Pyziel-Serafin *et al.*, 2023), the morphology of the GIN flora of European bison remains sparse. A thorough understanding of the

© The Author(s), 2024. Published by Cambridge University Press. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution and reproduction, provided the original article is properly cited.



Figure 1. Location of examined European bison in Poland

composition of the parasitofauna of captive animals will help limit the health risks associated with translocation of animals, prevent the spread of alien parasite species and monitor the efficacy of deworming of captive animals (Vadlejch *et al.*, 2017; Gałązka *et al.*, 2022, 2023).

The present study examines the infection level and composition of GINs in the abomasa of European bison, and compares the nematode species present in captive European bison with those in free-ranging animals. It also describes the morphometric characteristics of the identified nematodes to enable more accurate morphological diagnosis.

Materials and methods

Material collection and area of the study

Abomasa were collected during post-mortem examinations of 30 European bison, *viz.* 23 captive and 7 free-ranging individuals, in Poland during the years 2018–2023. All animals had died due to natural causes or culling for breeding and health reasons.

The examined captive animals were kept in 4 breeding centres (Smardzewice Breeding Center, Niepołomice Breeding Center, Pszczyna-Jankowice Breeding Center and Wolisko Breeding Center), 3 zoos (Bydgoszcz zoo, Warsaw zoo and Ustroń zoo) and 2 enclosures (Kiermsy enclosure and Muczne enclosure) (Fig. 1). The free-ranging animals inhabited the Borecka Forest, Białowieża Forest, Knyszyn Forest and Bieszczady Mountains (Fig. 1). Three management types were considered

in the study: enclosures and zoos with smaller paddock area; breeding centres with larger pastures and free-living herds (Table 1). Detailed information about the number of animals examined in each location is available in the online Supplement (Tables S1, S2).

Parasitological dissections were performed in the field, according to the principles of dissecting technique and parasitological procedures (Drózd, 1966; Malicka, 2008). In each case, the abomasa were removed from the abdominal cavity, ligated at both ends and secured for examination. The material was transported to the laboratory and examined immediately, or frozen at -20°C and examined after thawing.

Each abomasum was placed in standing water. Its wall was cut along the greater curvature and the contents were then decanted and a sample of 1/10 of the total volume of the sediment was prepared. The sediment was poured into Petri dishes (in portions) and investigated under a Delta Optical SZ-450 T stereomicroscope (Delta Optical, Mińsk Mazowiecki, Poland) using $40\times$ magnification. The observed GINs were isolated with a use of a dissecting needle and counted. Afterwards, the male and female individuals were separated and each group was preserved in 70% ethanol.

Morphological identification of nematodes

Male nematodes were isolated from 1/10 of the abomasal contents. These were used for morphological species identification due to the species-specific structure of the copulatory bursa.

Table 1. Prevalence of abomasal nematodes of examined European bison according to management type

Location	Enclosures and zoos	Breeding centres	Free-ranging	Total
<i>n</i>	9	14	7	30
Nematode species	Prevalence (%)			
<i>A. sidemi</i>	11.1		57.1	16.7
<i>H. contortus</i>	55.6	71.4	57.1	63.3
<i>O. ostertagi</i>	55.6	100	71.4	80.0
<i>O. lyrata</i>	22.2	64.2	28.6	43.3
<i>O. leptospicularis</i>			28.6	6.7
<i>O. kolchida</i>	11.1	35.7	42.9	30.0
<i>T. circumcincta</i>	22.2	7.1		10.0
<i>C. oncophora</i>		28.6	14.3	16.7
<i>C. surnabada</i>		7.1		3.3
<i>S. boehmi</i>		14.3	28.6	13.3
<i>S. asymmetrica</i>		14.3	14.3	10.0

n, number of examined animals.

The caudal part of the body was cut off with scalpel and placed in Amman's lactophenol (10 g of phenol + 10 g of lactic acid + 20 g of glycerol + 10 g of distilled water) for 20 min to increase the translucency of the cuticle and improve the visibility of the spicules. The rest of the body was placed in a labelled vial filled with 70% ethanol for subsequent species verification using molecular biology techniques. When removed from lactophenol, the caudal body parts of male nematodes were placed on a basal slide and identified to the species level; identification was based on the shape and length of the spicules and copulatory sac under a LAB40 microscope (OPTA-TECH, Warsaw, Poland) under 100× to 400× magnification (Drózd, 1966, 1995; Drózd *et al.*, 1998). The spicules were photographed and measured with a digital camera and OPTA View-15 2019 software (OPTA-TECH). The female nematodes were identified to the sub-family level and counted.

Molecular identification of nematodes

Genomic DNA was extracted individually from the ethanol-preserved anterior male parts of *A. sidemi*, *Cooperia oncophora*, *H. contortus*, *O. leptospicularis*, *O. kolchida* (a minor morph of *O. leptospicularis*), *O. ostertagi*, *O. lyrata* (a minor morph of *O. ostertagi*), *Spiculopteragia boehmi* and *Teladorsagia circumcincta*. The extraction was performed using a NucleoSpic Tissue DNA extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Identification was performed by PCR using various combinations of primer sets. A partial region of the internal transcribe spacer 2 (ITS-2) and large subunit (LSU) of the ribosomal DNA was amplified using the following set of primers: forward-NC1 (5'-ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT-3') and reverse-NC2 (5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3') according to Gasser *et al.* (1993). Additionally, 2 sets of primers amplifying a partial region of the small subunit ribosomal rDNA (SSU) were designed for the purpose of this study, namely: forward-N380F (5'-AAG CGA GCA GGC GCG AAA C-3') and reverse-N1690R (5'-ACC CGG TTC AAG CCA TTG CGA-3'); forward-N350F (5'-GAG CCT TAG AAA CGG CTA CCA CAT CCA-3') and reverse-N1287R (5'-AGC AGG CTA GAG TCT CGC TCG T-3').

Other combinations of primer sets targeting SSU were also used, including: forward SSU07 (5'-AAA GAT TAA GCC ATG CAT G-3') and reverse BNR1 (5'-ACC TAC AGA TAC CTT

GTT ACG AC-3'); forward SSU07 and reverse N1070R (5'-TTG CAA CCA TAC TAC CCC AGG AAC CGA A-3'); forward N800F (5'-GGG CAT TCG TAT CCC TGC GCG AGA G-3') and reverse NBR1; forward NF50 (5'-TGA AAC TGC GAA CGG CTC AT-3') and reverse BNR.

All PCRs were performed in a T100 thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in a volume of 50 µL. Each 50 µL PCR reaction contained 20 µL of Molecular Biology Reagent Water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 25 µL of AccuStart II PCR ToughMix (×2 concentration) (Quantabio, Beverly, MA, USA), 1 µL of GelTrac Loading Dye (×50 concentration) (Quantabio), 1 µL of forward primer (20 mM), 1 µL of reverse primer (20 mM), and 2 µL of template DNA. The conditions for PCRs were as follows: 94°C for 2 min to denature the DNA, 35 cycles at 94°C for 45 s, 60°C (for ITS-2 and LSU)/57°C (for SSU) for 60 s, and 72°C for 45 s, and a final extension of 10 min at 72°C to ensure complete amplification.

The PCR products were verified on 1% agarose gel containing ethidium bromide (0.5 µg mL⁻¹), with Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) loaded as a reference. The products were identified by exposure to UV light using a Gel Doc XR+ (Bio-Rad) gel documentation system, equipped with Image Lab 6.1 Software (Bio-Rad Laboratories, USA). The PCR products were purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), eluted with 30 µL of Molecular Biology Reagent Water (Sigma-Aldrich) and sequenced in both directions by Genomed S.A. (Warsaw, Poland) using the primers previously used for amplification (5 mm). The sequences were assembled into contigs using CodonCode Aligner version 8.0 (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA). The obtained nucleotide sequences were compared to the NCBI database of sequences using the basic local alignment search tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) and submitted to the GenBank database.

Statistical analysis

Due to the low intensity of nematode infection in the examined European bison, statistical analysis allowing for the identification of factors explaining the intensity of nematode infection was limited. Therefore, the analysis was restricted to 2 areas. The first evaluated the number of nematode species according to European bison maintenance type (enclosures (including zoos), breeding



Figure 2. Male caudal body parts of abomasal nematodes found in European bison: 1 – *Ashworthius sidemi* (×10); 2 – *Haemonchus contortus* (×10); 3 a, b – *Ostertagia ostertagi* (×20); 4 a, b – *Ostertagia lyrata* (×20); 5 – *Ostertagia leptospicularis* (×20); 6 – *Ostertagia kolchida* (×20); 7 a, b – *Teladorsagia circumcincta* (×10); 8 – *Cooperia oncophora* (×20); 9 – *Cooperia surnabada* (×20); 10 a, b – *Spiculopteria boehmi* (×20); 11 – *Spiculopteria asymmetrica* (×20).

centres and free-living herds) using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test with Bonferroni correction.

In addition, the number of nematodes of each selected nematode species was analysed. Briefly, after analysing the number of nematodes present, 3 species were subjected for detailed statistical analysis: *H. contortus*, *O. ostertagi* and *O. lyrata*. The numbers of these species were assessed for collinearity using Pearson's *r* and

Kendall's *b* correlation coefficients. Following this, the number of nematodes in each species was analysed separately based on a generalized linear model with a negative binomial distribution and a log link function. The number of nematodes in the European bison was used as the dependent variable, while bison sex, maintenance type [enclosures (including zoos), breeding centres and free-living herds], and northern gradient were used as

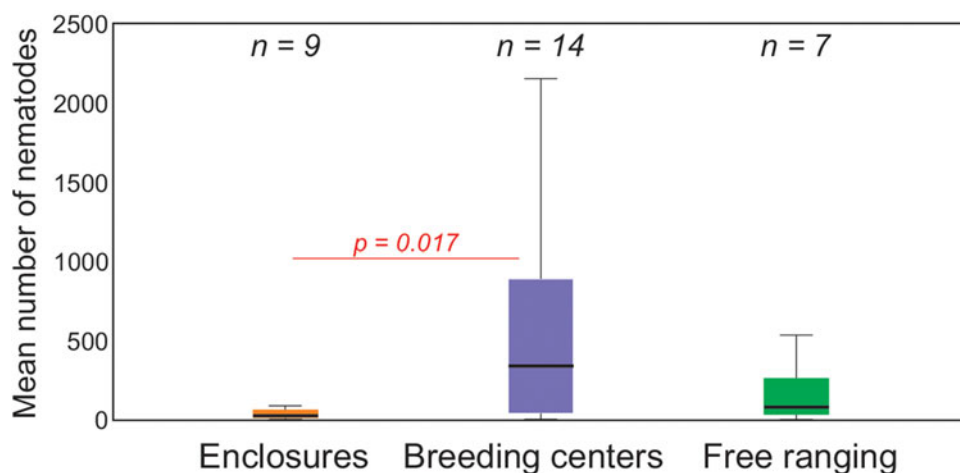


Figure 3. Boxplot of intensity of infection with GINs in European bison with regard to maintenance type. In Kruskal–Wallis test only animals in breeding centres presented higher intensity of infection with GINs than in enclosures and zoos (enclosures) (Dunn's test statistic = 10.38, $P = 0.017$). Free ranging animals didn't differ significantly from those in enclosures and zoos (Dunn's test statistic = 5.67, $P = 0.604$) nor from breeding centres (Dunn's test statistic = 4.71, $P = 0.741$, for Kruskal–Wallis test: $P = 0.022$) (n , number of examined animals).

explanatory variables. The northern gradient variable was introduced into the analysis to account for the effect of the north-south gradient on the occurrence of various parasite species (e.g. Thielges *et al.*, 2011; Klich *et al.*, 2022) and the distribution of samples from the north to the south of Poland (Fig. 1). Each model underwent a selection process comparing all model variants (variable composition, including a null model), and the highest ranked model was selected based on the Akaike information criterion, i.e. the highest AIC value (Burnham and Anderson, 2002). All statistical analyses were performed with IBM SPSS v29.0 (Armonk, New York).

Results

Morphological identification of nematodes

In the study, 11 GIN species were identified: *H. contortus*, *A. sidemi*, *O. ostertagi*, *O. lyrata* (a minor morph of *O. ostertagi*), *O. leptospicularis*, *O. kolchida* (a minor morph of *O. leptospicularis*), *T. circumcincta*, *C. oncophora*, *C. surnabada*, *S. boehmi* and *S. asymmetrica* (Fig. 2). Among these, *H. contortus*, *A. sidemi*, *O. ostertagi*, *O. lyrata*, *O. kolchida*, *C. oncophora*, *S. boehmi* and *S. asymmetrica*

were noted in both free-roaming and captive animals. However, *T. circumcincta* and *C. surnabada* were exclusively found in captive bison and *O. leptospicularis* in free-roaming animals. The overall prevalence of GIN infection in examined European bison was 90% (i.e. 27 positive out of 30 examined abomasa). The median and mean intensity of GIN infection were respectively 725 and 5065.7 per animal (range 0–47 030 nematodes per animal). The general prevalence was the highest in breeding centres (100%), followed by free-ranging herds (85.7%) and enclosures including zoos (77.8%).

The most common, and also most abundant, species was *Ostertagia ostertagi* (prevalence: 80%), followed by *H. contortus*, *O. lyrata* and *O. kolchida* (prevalence: 63.3, 43.3 and 30%, respectively) (Table 1). The rarest nematode species was *C. surnabada* (prevalence: 3.3%) (Table 1). Regarding maintenance type, *O. ostertagi* and *H. contortus* were found to have similar prevalences in free-roaming and captive European bison (both types of maintenance), whereas the greatest difference between maintenance types was noted for *A. sidemi*: the second most prevalent species in free-ranging animals (prevalence: 57.1%) but one of the rarest in captive wisents (prevalence in enclosures and zoos 11.1%, breeding centres 0%) (Table 1).

Table 2. Intensity of abomasal nematodes of examined European bison according to management type

Location	Enclosures and zoos			Breeding centres			Free-ranging		
<i>n</i>	9			14			7		
Intensity									
Nematode species	Average	Median	Range	Average	Median	Range	Average	Median	Range
<i>A. sidemi</i>	20 ^a						12.6	4	40–710
<i>H. contortus</i>	5.9	5	50–230	16.3	3	10–580	20.3	5	50–680
<i>O. ostertagi</i>	14.9	1	10–610	351.1	87.5	10–21 230	25.6	5	40–800
<i>O. lyrata</i>	0.7	0	10–680	14.6	6.5	10–680	0.3	0	10
<i>O. leptospicularis</i>							0.7	0	20–30
<i>O. kolchida</i>	40 ^a			2.5	0	10–310	3	0	10–160
<i>T. circumcincta</i>	0.6	0	10–40	20 ^a					
<i>C. oncophora</i>				1.2	0	10–50	40 ^a		
<i>C. surnabada</i>				40 ^a					
<i>S. boehmi</i>				0.36	0	10–40	2.4	0	70–100
<i>S. asymmetrica</i>				1.1	0	80	20 ^a		

n, number of examined animals.

^aNematodes found only in 1 examined European bison.

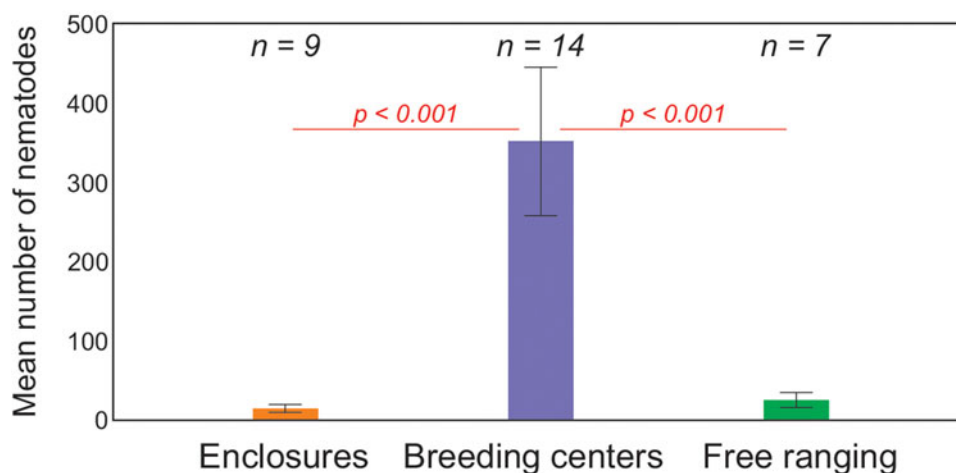


Figure 4. Mean ($\pm$ s.e.) number of *O. ostertagi* specimens in European bison with regard to maintenance type. Animals in breeding centres differed significantly from those in enclosures and free-ranging animals ($P < 0.001$ in both cases) in generalized linear model. Free ranging animals did not differ significantly from animals in enclosures ($P = 0.336$) (for whole model: $\chi^2 = 50.81$, $P < 0.001$) (n , number of examined animals).

GIN composition was found to be related to the management type of the European bison. *Ashworthius sidemi* occurred in most free-ranging herds, but was noted in only one enclosure, where the species was also present in the wild population (Table 1, online Supplementary Table S1). *Teladorsagia circumcincta* and *C. surnabada* were only found in captive animals; *O. leptospicularis* was noted only in free-ranging animals; all other GINs were present in both captive and free-ranging animals. In addition, mixed infections comprising 2 to 8 GIN species were noted in 25 cases; however, no relationship was found between the number of species and the type of maintenance.

The parasite loads differed regarding the maintenance type. The European bison in breeding centres presented higher intensity of infection with GINs than in enclosures and zoos (Fig. 3). Free ranging animals did not differ significantly from those in enclosures and zoos. Regarding the most prevalent GINs, the highest average and median values, as well as the widest range of specimens, were observed for *O. ostertagi* in breeding centres (351.1; 87.5; 10–21 230, respectively). In free-ranging European bison the highest intensity of infection was noted also for *O. ostertagi* (40–800), with the highest average and median (25.6 and 5, respectively) (Table 2).

Ostertagia ostertagi and *O. lyrata* were found at significantly higher intensities in animals kept in breeding centres than in enclosures or in wild herds (Figs 4 and 5), but such a difference was not observed in *H. contortus* (online Supplementary Table S3). Free ranging animals did not differ significantly from animals in enclosures for all 3 nematode species. *Haemonchus contortus* was present at significantly higher intensity in cows than in bulls (Fig. 6), but for *O. ostertagi* and *O. lyrata* no sex differences were found (online Supplementary Table S3). Interestingly, the intensity of *H. contortus* infection decreased as the location became more northerly, regardless of maintenance type; for *O. ostertagi* and *O. lyrata* northern gradient was not significant in the model (online Supplementary Table S3). More detailed data about the prevalence and intensity of parasitic infections in the examined European bison in all locations is given in the online Supplementary material (Tables S1 and S2).

Nematode species were identified based on the morphology and length of the male copulatory bursa and the spicules; the morphological differences between *H. contortus* and *A. sidemi* can be seen in Fig. 2. In *H. contortus*, the lateral rib is clearly visible in the spicules. This difference allows accurate identification of this species by light microscopy, as confirmed by our present molecular analysis (Fig. 2.2). However, all species demonstrated a wide range of spicule lengths. In *A. sidemi*, *T. circumcincta* and *S. boehmi*, the median spicule length was significantly higher

than the mean length due to the occurrence of significantly lower values (Table 3).

Molecular identification of nematodes

Nucleotide sequences were obtained for 5 species of abomasal nematodes, including *A. sidemi*, *H. contortus*, *O. ostertagi*, *O. kolchida* and *S. boehmi* (Table 4). None of the primer sets used in the investigation provided a PCR product for all nematode species included in the study. The following primer pairs proved to be completely unsuccessful for the purpose of this research: SSU07 + BNR1, SSU07 + N1070R, N800F + NBR1 and NF50 + BNR1. The reason for this is the fact that no PCR product was produced by these sets of primers. However, the remaining primer sets were selectively useful, i.e. they could accurately identify only certain nematode species.

The general primer set NC1 + NC2 obtained sequences for ITS2 and LSU from *A. sidemi*, *H. contortus* and *O. ostertagi*; the products varied in length from 239 to 257 bp. Partial SSU sequences were obtained for *A. sidemi*, *H. contortus*, *O. kolchida* and *S. boehmi*; these varied in length from 830 bp (for *O. kolchida*) to 1211 bp (for *S. boehmi*). The 350F + N1287R set was useful for only *O. kolchida*, whereas primer set 380F + N1690R obtained sequences from the 3 remaining nematode species.

Discussion

In total, 11 GIN species of the family Trichostrongylidae were isolated from the alimentary tracts of European bison. Although our study concerned mostly captive animals, the GIN species composition was similar to that of free-living European bison obtained by other authors worldwide (Drózd et al., 1994; Karbowski et al., 2014a, 2014b; Demiaszkiewicz et al., 2020). GINs are the most significant parasites of European bison and other grazing ruminants (Karbowski et al., 2014b) and the general prevalence of parasitic infections in our research was high, reaching 90%.

Our morphometric analysis found that most GIN species demonstrated high size ranges, and this corresponded with values obtained in other ruminant species (Lichtenfels and Pilitt, 1991; Jacquet et al., 1997; Pyziel-Serafin et al., 2023). The morphological identification was made possible by the structure of the nematode spicules, and these results were confirmed in the molecular analysis. Our results represent the first available set of spicule lengths of GINs in European bison. Nevertheless, due to the limited sample size the descriptions may not be comprehensive for all possible sizes and it is advised to perform further measurements of nematode spicules.

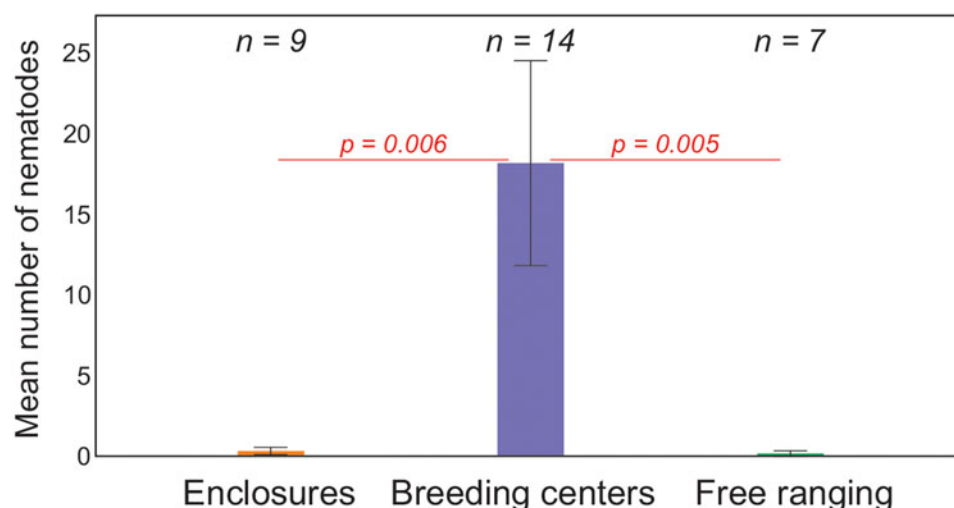


Figure 5. Mean ($\pm$ s.e.) number of *O. lyrata* specimens in European bison with regard to maintenance type. Animals in breeding centres differed significantly from those in enclosures and free-ranging animals ($P < 0.01$ in both cases) in generalized linear model. Free ranging animals did not differ significantly from animals in enclosures ($P = 0.529$) (for whole model: $\chi^2 = 54.18$, $P < 0.001$) (n , number of examined animals).

Unfortunately, limited data is available on the nucleotide sequences of abomasal nematodes of ruminants, and as it was not possible to acquire many of the sequences of the SSU and ITS genetic markers in the studied GIN from European bison. Even so, a nucleotide sequence was acquired from *O. kolchida* (GenBank: OP320518.1), and this is the first to be made available in GenBank regarding any genetic marker gene of the species. Similarly, the obtained SSU sequence of *S. boehmi* (GenBank: OP320506.1) is the first SSU sequence of the species available, and first molecular data from *S. boehmi* isolated from European bison. In addition, the acquired second sequence of ITS2 and LSU of *O. ostertagi* (GenBank: OP787667.1) is the second to be derived from European bison. The previous molecular data on the species were obtained from Lowland-Caucasian wisent from Avesta Visentpark in Sweden (GenBank: KX358862.1) (Pyziel *et al.*, 2018).

In contrast, sequences of blood-sucking *H. contortus* and *A. sidemi* are more available. In addition to the data on *H. contortus* obtained in this study (GenBank: OP577478.1, OP320502.1), sequences have been derived from European bison inhabiting Almindingen in Danish island, Bornholm (GenBank: ON677956.1, ON677957.1, ON677958.1) and Avesta Visentpark in Sweden (GenBank: KX358860.1). Our data regarding the molecular features of an alien *A. sidemi* isolated from European bison are the third set to be published (GenBank: OP787564.1, OP320470.1). This issue was discussed previously by Moskwa

et al. (2014) in Poland (GenBank: KF414629.1) and by Vadlejch *et al.* (2017) in the Czech Republic (GenBank: KX228148.1, KX228149.1).

The most prevalent GIN was *O. ostertagi*, a parasite typical for bovids and considered one of the most common GINs of European bison. It has been observed in both captive and free-living animals since the beginning of the European bison restitution (Karbowski *et al.*, 2014b). Other parasites typical of bovines, like *H. contortus* and *O. lyrata* were also very common, followed by *O. kolchida*, characteristic for cervids. Indeed, during its reintroduction, the European bison has become a host for many parasite species originally characteristic for other mammals (Drózd *et al.*, 1998, 2002), which is consistent with our study.

As the development and spread of parasitic infections are affected by many environmental and individual factors (Kołodziej-Sobocińska, 2019), some differences between captive and free-living animals might be expected. In our study, 2 nematode species, *T. circumcincta* and *C. surnabada*, were isolated only from European bison in captivity. Both nematodes are considered typical parasites of domestic ruminants and have been rarely reported in free-living animals (Demiaszkiewicz and Pyziel, 2010; Karbowski *et al.*, 2014b). In contrast, *O. leptospicularis* was not present in captive animals but isolated only from free-living ones. *Ostertagia leptospicularis* is primarily a parasite of cervids (Wyrobisz-Papiewska *et al.*, 2021), but it has been adapted by free-living European bison as a result of inter-species parasite transmission (Drózd *et al.*, 1989; Karbowski *et al.*, 2014b). Previous studies indicate that the parasitofauna of free-ranging bison might be enriched with species typical for cervids which are rarely present in captive individuals (Drózd *et al.*, 2002).

Similar differences between captive and free-ranging European bison were observed in relation to nematodes from Haemonchiinae subfamily, including *H. contortus* and *A. sidemi*. *Ashworthius sidemi* was imported to Poland with sika deer (*Cervus nippon*) from Asia in the end of XXth century. It has since become a common parasite of free-living European bison (Drózd *et al.*, 1998; Demiaszkiewicz *et al.*, 2009; Kołodziej-Sobocińska *et al.*, 2016a, 2016b); however, in the present study, it was isolated only from one individual in enclosure, and the predominant Haemonchiinae species in most captive European bison was *H. contortus*. Other authors attribute the presence of *A. sidemi* in captive European bison to accidental contact with infected wild ruminants in the study area, as enclosure is not always a sufficient barrier to transmission of infectious diseases (Kowal *et al.*, 2012; Rendón-Franco *et al.*, 2013; Mazur *et al.*, 2018).

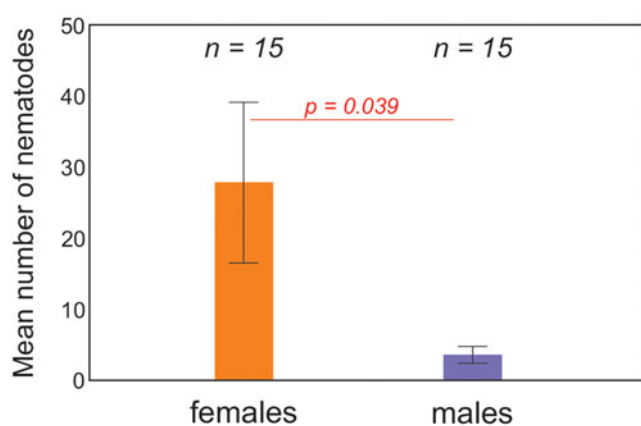


Figure 6. Mean ($\pm$ s.e.) number of *H. contortus* specimens in European bison with regard to sex of animals. Females differed significantly from males ($P = 0.039$) in generalized linear model (for whole model: $\chi^2 = 26.51$, $P < 0.001$) (n , number of examined animals).

Table 3. Comparison of the spicule length of abomasal nematodes of European bison

Species	<i>n</i>	Average $\pm$ s.d.	Median	Range [μ m]
<i>Ashworthius sidemii</i>	6	686.4 $\pm$ 144.56	699.5	(436–877)
<i>Haemonchus contortus</i>	22	416.6 $\pm$ 21.52	414	(370–475)
<i>Ostertagia ostertagi</i>	60	213.5 $\pm$ 9.88	214	(170–235)
<i>O. lyrata</i>	43	216.1 $\pm$ 12.91	217	(178–245)
<i>O. leptospicularis</i>	4	168.4 $\pm$ 5.13	168.5	(160–176)
<i>O. kolchida</i>	4	195.9 $\pm$ 23.27	189.5	(169–234)
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	7	583.7 $\pm$ 151.62	694	(351–718)
<i>Cooperia oncophora</i>	10	266.6 $\pm$ 8.25	266	(254–285)
<i>C. surnabada</i>	3	241.3 $\pm$ 12.45	242.5	(226–255)
<i>Spiculopteragia boehmi</i>	8	154.7 $\pm$ 22.01	161.5	(99–175)
<i>S. asymmetrica</i>	7	254.3 $\pm$ 32.33	252	(216–303)

s.d., standard deviation.

Overall, the median and mean intensity of infection (725; 5065.7 nematodes per animal, respectively) were lower than those reported in previous studies of European bison in Poland (Drózd et al., 1989; Demiaszkiewicz et al., 2018; Kołodziej-Sobocińska et al., 2018). The lower parasite burden may be related to management type, e.g. captive animals are dewormed biannually to prevent the spread of parasitic disease (Viggers et al., 1993), while the free-ranging European bison are not receiving anthelmintics due to lack of control over the drug intake and a potential development of anthelmintic resistance. Nonetheless, the infection intensity was higher in animals in breeding centres compared with animals in enclosures and zoos and free-living herds; this may be due to the other factors faced by captive animals, such as higher population density, close proximity to other animals (Gałazka et al., 2023), higher stress and specific environmental conditions (Papini et al., 2012). Moreover, herds living in breeding centres were larger than those enclosures and zoos, which may pose a potential difficulty in estimating the body mass of all animals and administering a correct dosage of anthelmintic drugs to a group, which may lead to inefficient deworming and development of drug resistance in parasites (Gałazka et al., 2023). However, only a relatively small number of samples, especially from free-living individuals were examined and further study with emphasis on management type in European bison should be undertaken.

Among the examined European bison, a higher infection intensity of *H. contortus* was found among females than males;

however, this pattern was not noted for other GINs. Female-biased parasitism has been reported in European bison before (Kraśnińska et al., 2000; Pyziel et al., 2011; Kołodziej-Sobocińska, 2019; Filip-Hutsch et al., 2022). It has been attributed to the higher exposure of females to parasites due to their living among other animals, which favours transmission of diseases between individuals. Their susceptibility to parasitic infection may also be enhanced by immunosuppression caused by pregnancy and lactation (Lloyd, 1983).

For one of the most common GINs, *H. contortus*, infection intensity was found to change depending on the latitude. While other authors also report a tendency for increasing parasite species richness when moving away from the equator, there is no strong evidence indicating that latitude has a direct effect on mammal parasitofauna (Kamiya et al., 2014). It is more likely that affect the latitudinal patterns of helminth diversity are influenced indirectly by several additional factors, such as temperature, precipitation and host availability (Villalobos-Segura et al., 2020). Moreover, most sheep and goat farming occurs in the south of Poland, while more cattle farming occurs in the north, which might be taken under consideration in explanation of the higher intensity of infection with nematodes commonly associated with small ruminants (*H. contortus*) in the southern enclosure locations (Łączyński et al., 2022). However, this issue is more complex, as indicated by regional differences in the observed contacts between European bison and cattle which were not always corresponding to cattle numbers in given region (Klich

Table 4. Obtained nucleotide sequences of abomasal nematodes of captive European bison

Organism	Gene	Primer F	Primer R	GenBank no.	Length (bp)
<i>Ashworthius sidemi</i>	ITS2 + LSU	NC1	NC2	OP787564.1	239
	SSU	N380F	N1690R	OP320470.1	1132
<i>Haemonchus contortus</i>	ITS2 + LSU	NC1	NC2	OP783972.1	255
	SSU	N380F	N1690R	OP577478.1	977
	SSU	N380F	N1690R	OP320502.1	1191
<i>Ostertagia kolchida</i>	SSU	N350F	N1287R	OP320518.1	839
<i>Ostertagia ostertagi</i>	ITS2 + LSU	NC1	NC2	OP787667.1	257
<i>Spiculopteragia boehmi</i>	SSU	N380	N1690R	OP320506.1	1211

*NC1: 5'-ACGTCTGTTTCAGGGTTGTT-3'; NC2: 5'-TTAGTTTCTTTCTCCGCT-3'; N380F: 5'-AAGCGAGCAGGCGCAAA-3'; N1690R: 5'-ACCCGGTTCAAGCCATTGCGA-3'; N350F: 5'-GAGCCTTAGAACGCTACACATCCA-3'; N1287R: 5'-AGCAGGCTAGAGTCTCGCTGT-3'

et al., 2023). Due to limited access to invasive sampling from endangered species the sampling was not randomized, and since further research ought to be conducted to investigate potential correlations, the sampling protocol requires to consider this methodological aspect in the future.

As captive-bred animals are widely used in reintroduction programmes (Mathews *et al.*, 2006; Kołodziej-Sobocińska *et al.*, 2018), it is especially important to monitor their health status. Despite this, few studies have examined the extent and nature of parasitic infections in captive European bison. Our study has implications for managing the captive European bison reintroduction process. Although individuals from breeding centres are better adapted to natural conditions, they may constitute a significant reservoir of nematodes. However, the intensity of GIN infection is not high in all individuals, so a preliminary assessment of this intensity should be carried out before selecting specimens for transportation. Moreover, animals in breeding centres may be reservoirs of nematode species that occur in the local environment, even though they do not live in the wild. Therefore, if a species of nematode unknown to the target place for reintroduction was found in the environment in the source region a thorough analysis of the nematode species composition of animals from breeding centre before transportation is highly justified. This study provides new data about GINs in captive European bison in Poland, which might simplify the morphometrical and molecular identification of Trichostrongylidae species, and help develop new management strategies for the European bison population, such as, preventing from transporting alien or potentially threatening species to new locations and free-living populations.

Supplementary material. The supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1017/S003118202400088X>

Acknowledgements. The authors would like to thank the following individuals for assistance throughout all aspects of our study: Wojciech Bielecki, Mieczysław Hławiczka, Stanisław Kaczor, Elwira Plis-Kuprianowicz, Zbigniew Pawliński, Patryk Gałązka. This study was conducted as part of the Doctoral thesis of Mrs. Marta Gałązka.

Authors' contributions. MG conceived and designed the study, collected the abomasa of European bison, conducted molecular investigation. MG, KFH conducted morphological investigation, wrote the article. DK performed statistical analysis and created the visualization. WO, KA supervised the study. AMP conducted molecular investigation, supervised the study and edited the article.

Financial support. This work was supported by the Forest Fund, Poland as part of 'Complex project of European bison conservation by State Forests' [contract no. OR.271.3.10.2017].

Competing interests. None.

Ethical standards. No individual was killed for research purposes; samples were only collected on occasion. Culling of European bison was carried out by designated persons and approved by the General Directorate for Environmental Protection in Poland, based on the Act Of 16 April 2004 on The Protection of Nature. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Namely, the collection and storage of samples of dead individuals for the study were based on the decision of the Regional Director of Environmental Protection in Warsaw. According to this decision, the collection of dead animals for scientific purposes does not need any permit. Permission was given for the storage of the biological samples of the European bison without any time limit.

Data availability statement. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author (MG).

References

Burnham KP and Anderson DR (2002) *Model Selection and Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*, 2nd Edn. New York: Springer-Verlag. doi: 10.1007/b97636

- Demiaszkiewicz AW and Pyziel AM (2010) Forming of European bison helminth fauna in Białowieża forest. In Kowalczyk R, Ławreszuk D and Wójcik JM (eds), *European Bison Conservation in the Białowieża Forest. Threats and Prospects of the Population Development*. Białowieża: Zakład Badania Ssaków, pp. 63–74.
- Demiaszkiewicz AW, Lachowicz J and Osińska B (2009) *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Białowieża Forest. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12, 385–388.
- Demiaszkiewicz AW, Merta D, Kobielski J, Filip KJ and Pyziel AM (2017) Expansion of *Ashworthius sidemi* in red deer and roe deer from the Lower Silesian Wilderness and its impact on infection with other gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitologica* 62, 852–857.
- Demiaszkiewicz AW, Bielecki W, Rodo A, Pyziel AM and Filip K (2018) Parasitofauna of European bison *Bison bonasus* (L.) in Borecka Forest. *Medycyna Weterynaryjna* 74, 253–256.
- Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Filip-Hutsch K, Januszczak M and Olech W (2020) Parasitological monitoring of European bison in the Bieszczady Mountains. *Medycyna Weterynaryjna* 76, 111–114.
- Drózd J (1966) Studies on helminths and helminthiases in Cervidae II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. *Acta Parasitologica* 14, 1–13.
- Drózd J (1995) Polymorphism in the Ostertagiinae (Lopez-Neyra, 1947) and comments on the systematics of these nematodes. *Systematic Parasitology* 32, 91–99.
- Drózd J, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J (1989) Kształtowanie się helmintofauny żubrów (*Bison bonasus* L.) i jeleniowatych (Cervidae) w Puszczy Białowieskiej. *Wiadomości Parazytologiczne* 35, 571–576.
- Drózd J, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J (1994) The helminth fauna of free-ranging European bison, *Bison bonasus* (L.), studied again 8 years after reduction of bison, in the Białowieża Forest. *Acta Parasitologica* 39, 88–91.
- Drózd J, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J (1998) *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagarini*. *Acta Parasitologica* 43, 75–80.
- Drózd J, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J (2002) Exchange of gastrointestinal nematodes between roe and red deer (Cervidae) and European bison (Bovidae) in the Bieszczady Mountains (Carpathians, Poland). *Acta Parasitologica* 47, 314–317.
- Filip-Hutsch K, Laskowski Z, Myczka W, Czopowicz M, Moskwa B and Demiaszkiewicz AW (2022) The occurrence and molecular identification of *Thelazia* spp. in European bison (*Bison bonasus*) in the Bieszczady mountains. *Scientific Reports* 12, 22508.
- Gałązka M, Klich D, Anusz K and Pyziel-Serafin AM (2022) Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, *Bison bonasus* designated for translocation: Comparison of two coprological methods. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 17, 166–173.
- Gałązka M, Klich D, Filip-Hutsch K, Olech W, Anusz K and Pyziel AM (2023) Endoparasite loads and the efficacy of conventional anthelmintics against gastrointestinal nematodes in captive European bison. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 21, 224–231.
- Gasser RB, Chilton NB, Hoste H and Beveridge I (1993) Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. *Nucleic Acids Research* 21, 2525–2526.
- Gilleard JS (2013) *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology* 140, 1506–1522.
- Jacquet P, Cabaret J, Cheikh D and Thiam E (1997) Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. *Parasitology Research* 83, 82–86.
- Kamiya T, O'Dwyer K, Nakagawa S and Poulin R (2014) What determines species richness of parasitic organisms? A meta-analysis across animal, plant and fungal hosts. *Biological Reviews Cambridge Philosophical Society* 89, 123–134.
- Karbowiak G, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Wita I, Moskwa B, Werszko J, Bień J, Goździk K, Lachowicz J and Cabaj W (2014a) The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 1. The summarising list of parasites noted. *Acta Parasitologica* 59, 363–371.
- Karbowiak G, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Wita I, Moskwa B, Werszko J, Bień J, Goździk K, Lachowicz J and Cabaj W (2014b) The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2. The structure and changes over time. *Acta Parasitologica* 59, 372–379.

- Kita J and Anusz K (eds) (2006) *Health Threats for the European Bison Particularly in Free-Roaming Populations in Poland*. Warsaw, Poland: SGGW Publishers.
- Klich D, Nowicki M, Didkowska A, Bełkot Z, Popczyk B, Wiśniewski J and Anusz K (2022) Predicting the risk of *Alaria alata* infestation in wild boar on the basis of environmental factors. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **17**, 257–262.
- Klich D, Didkowska A, Pyziel-Serafin AM, Perlińska-Teresiak M, Wołoszyn-Gałęza A, Żoch K, Balcerak M and Olech W (2023) Contact between European bison and cattle from the cattle breeders' perspective, in the light of the risk of pathogen transmission. *Plos one* **18**(5), e0285245. doi: [10.1371/journal.pone.0285245](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285245)
- Kołodziej-Sobocińska M (2019) Factors affecting the spread of parasites in populations of wild European terrestrial mammals. *Mammal Research* **64**, 301–318.
- Kołodziej-Sobocińska M, Demiaszkiewicz AW, Lachowicz J, Borowik T and Kowalczyk R (2016a) Influence of management and biological factors on the parasitic invasions in the wild-spread of blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* in European bison (*Bison bonasus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **5**, 286–294.
- Kołodziej-Sobocińska M, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Marczuk B and Kowalczyk R (2016b) Does the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae) cause deterioration of blood parameters in European bison (*Bison bonasus*)? *European Journal of Wildlife Research* **62**, 781–785.
- Kołodziej-Sobocińska M, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM and Kowalczyk R (2018) Increased parasitic load in captive-released European bison (*Bison bonasus*) has important implications for reintroduction programs. *Ecohealth* **15**, 467–471.
- Kowal J, Nosal P, Bonczar Z and Wajdzik M (2012) Parasites of captive fallow deer (*Dama dama* L.) from southern Poland with special emphasis on *Ashworthius sidemi*. *Annals of Parasitology* **58**, 23–26.
- Krasińska M and Krasiński ZA (2013) *European Bison. The Nature Monograph*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.
- Krasińska M, Krasiński ZA and Bunevich AN (2000) Factors affecting the variability in home range size and distribution in European bison in the Polish and Belarussian parts of the Białowieża Forest. *Acta Theriologica* **45**, 321–334.
- Łączyński A, Kuliś M, Przypaśniak J, Wiczorkowski R, Dach-Oleszek I and Tylkowska-Siek A (2022) Farm animals in 2021. Retrieved from Statistics Poland. Agriculture Department. Available at <http://www.stat.gov.pl> (accessed 15 February 2024).
- Lichtenfels JR and Pilitt PA (1991) A redescription of *Ostertagia bison* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species of Ostertiaginae with a tapering lateral synlophe from domestic ruminants in North America. *Journal of the Helminthological Society of Washington* **58**, 231–244.
- Lloyd S (1983) Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **4**, 153–176.
- Malicka E (2008) *Sekcja Zwłok Zwierzęty*. Warsaw, Poland: SGGW.
- Mathews F, Moro D, Strachan R, Gelling M and Buller N (2006) Health surveillance in wildlife reintroductions. *Biological Conservation* **131**, 338–347.
- Mazur J, Tkacz E, Staniszewski M and Barański M (2018) Wisents in stuposiany forest district. *European Bison Conservation Newsletter* **11**, 61–72.
- Moskwa B, Bień J, Goździk K and Cabaj W (2014) The usefulness of DNA derived from third stage larvae in the detection of *Ashworthius sidemi* infection in European bison, by a simple polymerase chain reaction. *Parasites and Vectors* **7**, 215.
- Osińska B, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J (2010) Pathological lesions in European bison (*Bison bonasus*) with infestations by *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae). *Polish Journal of Veterinary Sciences* **13**, 63–67.
- Papini R, Girivetto M, Marangi M, Mancianti F and Giangaspero A (2012) Endoparasite infections in pet and zoo birds in Italy. *The Scientific World Journal* **1**, 1–9.
- Pyziel-Serafin AM, Vetter W, Klich D and Anusz K (2023) Exchanged communities of abomasal nematodes in cervids with a first report on *Mazamastrongylus dagestanica* in red deer. *Journal of Veterinary Research* **67**, 87–92.
- Pyziel AM, Kowalczyk R and Demiaszkiewicz AW (2011) The annual cycle of shedding *Eimeria* oocysts by European bison (*Bison bonasus*) in the Białowieża primeval forest, Poland. *Journal of Parasitology* **97**, 737–739.
- Pyziel AM, Björck S, Wiklund R, Skarin M, Demiaszkiewicz AW and Höglund J (2018) Gastrointestinal parasites of captive European bison *Bison bonasus* (L.) with a sign of reduced efficacy of *Haemonchus contortus* to fenbendazole. *Parasitology Research* **117**, 295–302.
- Raczyński J (2023) *European Bison Pedigree Book 2022*. Białowieża, Poland: Białowiecki Park Narodowy.
- Rendón-Franco E, Romero-Callejas E, Villanueva-García C, Osorio-Sarabia D and Muñoz-García CI (2013) Cross transmission of gastrointestinal nematodes between captive neotropical felids and feral cats. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **44**, 936–940.
- Thieltges DW, Hof C, Dehling DM, Brändle M, Brandl R and Poulin R (2011) Host diversity and latitude drive trematode diversity patterns in the European freshwater fauna. *Global Ecology and Biogeography* **20**, 675–682.
- Vadlejch J, Kyriánová IA, Rylková K, Zikmund M and Langrová I (2017) Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biological Invasions* **19**, 1121–1125.
- Viggers KL, Lindenmayer DB and Spratt DM (1993) The importance of disease in reintroduction programs. *Wildlife Research* **20**, 687–698.
- Villalobos-Segura MC, García-Prieto L and Rico-Chávez O (2020) Effects of latitude, host body size, and host trophic guild on patterns of diversity of helminths associated with humans, wild and domestic mammals of Mexico. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **13**, 221–230.
- Wyrobisz-Papiewska A, Kowal J, Łopieńska-Biernat E, Nosal P, Polak I, Paukzto Ł and Rehbein S (2021) Morphometric and molecular analyses of *Ostertagia leptospicularis* Assadov, 1953 from Ruminants: species diversity or host influence? *Animals* **11**, 182.

9. Oświadczenia współautorów

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt. Veterinary monitoring of gastrointestinal parasites in European bison, *Bison bonasus* designated for translocation: Comparison of two coprological methods. . International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, Volume 17, 2022, Pages 166-173.

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Opis wkładu w powstanie publikacji	Data i podpis współautora
Marta Gałązka	70%	opracowanie koncepcji i planu badania, współudział w zbieraniu materiału do badań i badaniach koproskopowych, opracowaniu wyników, sformułowaniu wniosków i przygotowaniu i redakcji manuskryptu	29.10.24 Marta Gałązka
Daniel Klich	10%	wykonanie analiz statystycznych i współudział w opracowaniu wyników i korekcie artykułu	29.10.2024 Daniel Klich
Krzysztof Anusz	5%	współudział w korekcie manuskryptu	29.10.2024 Krzysztof Anusz
Anna M. Pyziel	15%	opracowanie koncepcji badania, nadzorowanie prawidłowości prowadzonego badania, współudział w badaniu parazytologicznym oraz przeprowadzenie korekty manuskryptu	29.10.2024 Anna M. Pyziel

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt. Endoparasite loads and the efficacy of conventional anthelmintics against gastrointestinal nematodes in captive European bison. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, Volume 21, 2023, Pages 224-231.

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Opis wkładu w powstanie publikacji	Data i podpis współautora
Marta Gałązka	70%	opracowanie koncepcji i planu badania, zbieranie materiału do badań, wykonanie badań koproskopowych, opracowanie wyników, sformułowanie wniosków i przygotowanie i redakcja manuskryptu	29.10.24 Marta Gałązka
Daniel Klich	10%	wykonanie analiz statystycznych i współudział w opracowaniu wyników i korekcie artykułu	29.04.2024 Daniel Klich
Katarzyna Filip-Hutsch	5%	współudział w opracowaniu wyników i korekcie manuskryptu	29.04.2024 K. Filip-Hutsch
Wanda Olech	3%	współudział w korekcie manuskryptu	29.10.2024 W. Olech
Krzysztof Anusz	2%	współudział w korekcie manuskryptu	29.10.2024 K. Anusz
Anna M. Pyziel	10%	współudział w opracowaniu koncepcji badania, w przeprowadzeniu badania parazytologicznego oraz w korekcie manuskryptu	29.10.2024 Anna Pyziel

Oświadczenie współautorów publikacji

Niniejszym podaję procentowy wkład autorski w publikację pt. The variety of abomasal nematode communities of captive and free-roaming populations of European bison, *Bison bonasus* (L.): a morphometric and molecular approach. Parasitology 1–10, 2024. <https://doi.org/10.1017/S003118202400088X>

Imię i nazwisko współautora	Procentowy wkład autorski	Opis wkładu w powstanie publikacji	Data i podpis współautora
Marta Gałązka	70%	opracowanie koncepcji i planu badania, pobranie materiału do badań, wykonywanie sekcji zwłok, wykonanie badań parazytologicznych, opracowanie wyników, sformułowanie wniosków i przygotowanie i redakcja manuskryptu	29.10.24 Marta Gałązka
Katarzyna Filip-Hutsch	10%	współudział w wykonywaniu badań parazytologicznych i korekcie manuskryptu	28.10.2024 K.Filip-Hutsch
Daniel Klich	5%	wykonanie analiz statystycznych i współudział w korekcie artykułu	28.10.2024 Daniel Klich
Wanda Olech	3%	współudział w korekcie manuskryptu	29.10.2024 W.Olech
Krzysztof Anusz	2%	współudział w korekcie manuskryptu	29.10.2024 K.Anusz
Anna M. Pyziel	10%	współudział w opracowaniu koncepcji badania i w korekcie manuskryptu	29.10.2024 Anna M. Pyziel

Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.

.....

(czytelny podpis autora pracy)