

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA



**UGOTAVLJANJE RAVNI KORTIZOLA Z INVAZIVNIMI
IN NEINVAZIVNIMI METODAMI VZORČENJA
PRI ALPSKIH KOZOROGIH (*Capra ibex*)
V ŽIVALSKEM VRTU**

Doktorska disertacija

Marjan Kastelic

Ljubljana, 2025

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina
Veterinarska medicina

UDK št. 159.944.4:303.52:577:581.524.2:59:069.029:616.15:636.111.2(043.3)

Marjan Kastelic

**UGOTAVLJANJE RAVNI KORTIZOLA Z INVAZIVNIMI IN
NEINVAZIVNIMI METODAMI VZORČENJA PRI ALPSKIH
KOZOROGIH (*Capra ibex*) V ŽIVALSKEM VRTU**

Doktorska disertacija

**ESTIMATION OF CORTISOL LEVELS WITH INVASIVE AND
NON-INVASIVE SAMPLING METHODS IN ALPINE CAPRA
(*Capra ibex*) IN A ZOO**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2025

Marjan Kastelic

Ugotavljanje ravni kortizola z invazivnimi in neinvazivnimi metodami vzorčenja pri alpskih kozorogih (*Capra ibex*) v živalskem vrtu

Delo je bilo opravljeno v Živalskem vrtu Ljubljana, na Enoti za fiziologijo in patofiziologijo Inštituta za predklinične vede in na Inštitutu za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Javni zagovor je bil opravljen: _____

Mentorica: prof. dr. Alenka Dovč

Somentorica: prof. dr. Gordana Gregurić Gračner

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina Čebulj Kadunc (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Član: prof. dr. Martin Dobeic (Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta)

Član:izr. prof. dr. Marko Samardžija (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

»Dober boj sem dobojeval, tek dokončal, vero ohranil«

(2 Tim 4,7)

IZVLEČEK

Ključne besede:

dobrobit živali; kortizol; neinvazivne metode vzorčenja; alpski kozorog (*Capra ibex*); živalski vrt

Lovljenje in invazivne metode vzorčenja za alpske kozorože – *Capra ibex* pomenijo velik stres, ne samo za posamezne živali, ampak tudi za celotno skupino. Neinvazivne metode vzorčenja prispevajo k zmanjšanju stresa pri živalih, saj jih ob tem ni treba odloviti, prav tako ni potreben poseg v telo (vbod z iglo), pri tem pa se zmanjšajo tudi nevarnosti poškodb pri živalih in oskrbnikih, ki izvajajo odlov. V preiskavo sta vključeni dve neinvazivni metodi odvzema krvnih vzorcev: odvzem s krvosesi stenicami in odvzem z medicinskimi pijavkami, ter preiskave iztrebkov, urina, dlake in solz. Primerjali smo koncentracijo kortizola, hematološke in biokemične parametre. Primerjalni rezultati v vzorcih, odvzetih z venepunkcijo in obema neinvazivnima metodama, so pokazali večjo uporabnost odvzema krvi s pijavkami. Najvišja povprečna koncentracija kortizola je bila izmerjena v krvi, sledijo dlaka in iztrebki (v katerih smo ugotavljali fekalne glukokortikoidne metabolite), najnižja povprečna vrednost je bila ugotovljena v slini. Vzorčenje urina in solz sta zahtevna postopka in zato manj primerna za določanje kortizola. Koncentracija kortizola v solzah se je najbolj približala povprečju koncentracije v slini. V urinu je koncentracija kortizola dosegla celo višje vrednosti kot v krvnem serumu/plazmi. V vzorcih krvi, pridobljenih z venepunkcijo, smo pri kozorogih, mlajših od enajstih mesecev in starejših od desetih let, ugotovili pomembno statistično razliko v koncentraciji kortizola. Ugotovljena je bila tudi pomembna razlika v koncentraciji fekalnih glukokortikoidnih metabolitov v vzorcih iztrebkov pri kozorogih, ki so pripadali skupini, mlajši od enajstih mesecev, in skupini, starejši od desetih let. V slini smo ugotovili statistično pomembno razliko v koncentraciji kortizola med samci in samicami. Prav tako je bila v dlaki ugotovljena statistično pomembna razlika v koncentraciji kortizola med vzorci, zbranimi poleti in jeseni. V drugem delu raziskave smo ugotavljali korelacijo med kortizolom in invadiranostjo z notranjimi zajedavci. Z laboratorijskimi preiskavami vzorcev iztrebkov smo potrdili strongilide, eimerije in v enem primeru kapilarije. Po uspešno izvedeni dehelmintizaciji nismo ugotovili statistično pomembnih razlik v koncentraciji kortizola pred zdravljenjem in tri tedne po njem.

V tretjem delu raziskave smo ugotavljali korelacijo med kortizolom in spolnimi hormoni. Testosteron smo sledili v iztrebkih, dlaki in serumu. Estradiol smo sledili le v iztrebkih. Statistično pomembne korelacije med koncentracijo kortizola in spolnimi hormoni nismo ugotovili. Zbrane hematološke in biokemične preiskave krvi in vzorcev dlake, iztrebkov, urina, solz in slin pri alpskih kozorogih lahko služijo kot zanesljiv pripomoček v hitrejši in ustrežnejši diagnostiki patoloških stanj in izpostavljenosti stresu pri tej vrsti.

ABSTRACT

Keywords:

animal welfare; cortisol; non-invasive sampling methods; alpine ibex (*Capra ibex*); zoo

Catching Alpine ibex and using invasive sampling methods cause a great deal of stress to both individual animals and the entire group. Non-invasive sampling methods contribute to reducing stress in animals because they do not require capture or handling (needle puncture), which in turn reduces the risk of injury to both the animals and the staff responsible for catching them. This study included two non-invasive blood sampling methods (i.e., sampling using bloodsucking bugs and medicinal leeches) and analyses of faeces, urine, hair, and saliva. Cortisol concentrations were compared along with haematological and biochemical parameters. The comparative results of samples collected through venipuncture and the two non-invasive methods showed that blood collection with leeches was more useful. The highest average cortisol concentration was measured in blood, followed by hair and faeces (in which glucocorticoid metabolites were measured), and the lowest average value was found in saliva. Urine and tear sampling is a complex procedure and hence less suitable for determining cortisol. The concentration of cortisol in tears came closest to the average value found in saliva. The cortisol concentration in urine reached even higher values than in the blood serum/plasma. In blood samples collected through venipuncture, a statistically significant difference in cortisol concentration was established between ibex younger than 11 months and those older than 10 years. A significant difference between the same age groups was also established in the concentration of faecal glucocorticoid metabolites. In saliva, a statistically significant difference in cortisol concentration was found between males and females. In hair, a statistically significant difference in cortisol concentration was found between samples collected in summer and those taken in autumn. The second part of the study focused on establishing the correlation between cortisol levels and infestation with internal parasites. *Strongylida*, *Eimeria*, and, in one case, *Capillaria* were confirmed by laboratory analyses of faecal samples. After successful deworming, no statistically significant differences in cortisol concentration were found before and 3 weeks after treatment.

The third part of the study investigated the correlation between cortisol and sex hormones. Testosterone was detected in faeces, hair, and serum. Estradiol was only found in faeces. No statistically significant correlations were established between cortisol levels and sex hormones. The haematological and biochemical analyses of the blood, hair, faecal, urine, tear, and saliva samples collected from Alpine ibex can serve as a reliable tool for faster and more accurate diagnosis of pathological conditions and stress exposure in this species.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	5
1 UVOD.....	17
1.1 NAMEN DELA.....	21
1.2 HIPOTEZE	22
2 PREGLED LITERATURE.....	23
2.1 BIOLOGIJA ALPSKIH KOZOROGOV (<i>Capra ibex</i>), NJIHOVE MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI	23
2.2 ZDRAVSTVENA PROBLEMATIKA ALPSKIH KOZOROGOV V NARAVI IN V UJETNIŠTVU	24
2.2.1 Zdravstvena problematika v naravi.....	24
2.2.2 Zdravstvena problematika v oborah in živalskih vrtovih	25
2.3 DOBROBIT ŽIVALI V ŽIVALSKIH VRTOVIH	27
2.3.1 Dobrobit alpskih kozorogov v živalskih vrtovih.....	28
2.4 NEINVAZIVNE METODE ODVZEMA VZORCEV ZA ENDOKRINOLOŠKE ANALIZE	30
2.4.1 Iztrebki.....	31
2.4.2 Dlaka.....	32
2.4.3 Slina	32
2.4.4 Urin.....	33
2.4.5 Solze.....	33
2.4.6 Alternativni načini odvzema krvi.....	34
2.4.6.1 Krvosesne stenice (<i>Rhodnius prolixus</i>)	34
2.4.6.2 Medicinske pijavke (<i>Hirudo medicinalis</i>).....	39
2.5 STRES IN STRESNI HORMONI.....	41
2.5.1 STRESNI ODGOVOR ORGANIZMA.....	41
2.5.2 Vloga glukokortikoidov pri stresnem odgovoru organizma	42
2.5.3 Diagnostika kortizola in drugih glukokortikoidov.....	46

2.6	SPOLNI HORMONI	48
2.7	HEMATOLOŠKI IN BIOKEMIČNI PARAMETRI PRI KOZOROGIH	49
3	MATERIAL IN METODE	52
3.1	ŽIVALI.....	52
3.2	ODVZETI VZORCI IN NAČIN ODVZEMA.....	57
3.2.1	Vzorčenje iztrebkov, dlake, solz, sline in urina.....	57
3.2.2	Odvzem krvi.....	59
3.2.2.1	Odvzem krvi z venepunkcijo.....	59
3.2.2.2	Odvzem krvi s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami.....	59
3.3	ANALIZA VZORCEV.....	64
3.3.1	Hematološke in biokemične preiskave krvi.....	64
3.3.2	Endokrinološke preiskave.....	64
3.3.3	Parazitološke preiskave.....	66
3.3.4	Statistična analiza rezultatov.....	67
4	REZULTATI.....	68
4.1	KONCENTRACIJA KORTIZOLA V RAZLIČNIH VZORCIH.....	68
4.2	KONCENTRACIJA KORTIZOLA IN FGCM V RAZLIČNIH VZORCIH GLEDE NA SPOL IN STAROST KOZOROGOVI IN LETNI ČAS ODVZEMA.....	75
4.3	VPLIV INVADIRANOSTI Z NOTRANJIMI ZAJEDAVCI NA STRES ŽIVALI	78
4.4	KONCENTRACIJA KORTIZOLA IN FGCM V KORELACIJI S SPOLNIMI HORMONI	81
4.4.1	Koncentracija kortizola in FGCM v korelaciji s koncentracijo testosterona.....	81
4.4.2	Koncentracija FGCM v korelaciji s koncentracijo estradiola	84
4.5	HEMATOLOŠKE IN BIOKEMIČNE PREISKAVE KRVI.....	86
4.5.1	Hematološke preiskave	86
4.5.2	Biokemične preiskave krvi.....	90

5	RAZPRAVA	92
6	SKLEPI	108
7	POVZETEK	109
8	SUMMARY	111
9	ZAHVALA.....	113
10	LITERATURA.....	115

KAZALO SLIK

Slika 1:	Vzroki za zdravstvene težave kozorogov v živalskih vrtovih v Evropi, vključenih v program EAZA	26
Slika 2:	Razvojni krog <i>Rhodnius prolixus</i>	35
Slika 3:	Prikaz velikosti <i>R. prolixus</i> pred sesanjem, po eni minuti in 20 minutah sesanja krvi	36
Slika 4:	Cevasto iztegljivi ustni del krvosesne stenice vrste <i>Dipetalogaster maxima</i>	37
Slika 5:	Anatomska zgradba krvosesne stenice <i>Rhodnius prolixus</i>	38
Slika 6:	Dominantni samec na ležišču	55
Slika 7:	Oralna aplikacija antiparazitika	56
Slika 8:	Skupina kozorogov ob odlovu	58
Slika 9:	Fiksacija živali med vzorčenjem	58
Slika 10:	Vzorčenje na terenu	60
Slika 11:	Neinvazivni metodi odvzema krvi: krvosesna stenica (<i>Rhodnius prolixus</i>) (levo) in medicinska pijavka (<i>Hirudo medicinalis</i>) (desno)	62
Slika 12:	Krvosesne stenice v različnih fazah hranjenja: pred sesanjem (zadaj); med sesanjem (na sredini); stenica, ki se je napila krvi (spredaj); proboscis je zapičen, zadek je poln krvi.....	63
Slika 13:	Krvosesne stenice in medicinske pijavke pijejo kri na kozorogu (levo); stenica, napita s krvjo (sredina); vzorec, odvzet stenici (desno)	63
Slika 14:	Individualne vrednosti koncentracije KORT v vzorcih krvnega seruma oz. plazme, pridobljenih z različnimi načini odvzema krvi	69
Slika 15:	Individualne vrednosti koncentracije KORT v slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih kozorogov	70
Slika 16:	Individualna koncentracija FGCM (ng/g) v iztrebkih pred dehelmintizacijo (avgust) in po njej (september)	79
Slika 17:	Individualna koncentracija testosterona v iztrebkih sedmih samcev poleti in jeseni (1 – dominantni kozorog)	81
Slika 18:	Individualna koncentracija estradiola v iztrebkih sedmih samic poleti in jeseni	84
Slika 19:	Absolutno individualno število nevtrofilcev, limfocitov in monocitov pri posameznih kozorogih ($\times 10^6/\text{ml}$)	88
Slika 20:	Individualne relativne vrednosti (%) diferencialne bele krvne slike pri 12 kozorogih	89

INDEX OF FIGURES

Figure 1: Causes of ibex health problems in European zoos participating in the EAZA programme from 1 January 2020 to 12 April 2024	26
Figure 2: Developmental cycle of <i>Rhodnius prolixus</i>	35
Figure 3: Presentation of <i>Rhodnius prolixus</i> size before sucking and after 1 and 20 minutes of sucking blood	36
Figure 4: Proboscis of the bloodsucking bug <i>Dipetalogaster maxima</i>	37
Figure 5: Anatomical structure of the bloodsucking bug <i>Rhodnius prolixus</i>	38
Figure 6: Dominant male in resting place	55
Figure 7: Oral application of antiparasitic drug	56
Figure 8: Group of ibexes being caught	58
Figure 9: Fixation of animal during sampling	58
Figure 10: Field sampling (top and middle: terrain preparation; bottom: fixation of ibex and sampling)	60
Figure 11: Non-invasive blood collection methods: the bloodsucking bug (<i>Rhodnius prolixus</i>) (left) and medicinal leech (<i>Hirudo medicinalis</i>) (right)	62
Figure 12: Bloodsucking bugs at different stages of feeding: before sucking (rear); during sucking (middle); a bloodsucking bug that has drunk blood (front); the proboscis is plugged and the rump is full of blood	63
Figure 13: Bloodsucking bugs and medicinal leeches sucking blood on an ibex (left); a bug full of blood (middle); a sample taken from a bug (right)	63
Figure 14: Individual cortisol concentrations in blood serum or plasma obtained with different blood sampling method	69
Figure 15: Individual cortisol concentrations in saliva and hair, and FGCM concentrations in faeces of ibexes	70
Figure 16: Individual concentration of FGCM (ng/g) in faeces before deworming (August) and after (September)	79
Figure 17: Individual faecal testosterone concentrations in seven males in summer and autumn (1 = dominant male)	81
Figure 18: Individual faecal estradiol concentration in faeces of seven females in summer and autumn.	84
Figure 19: Absolute individual neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts in ibex ($\times 10^6/\text{ml}$)	88
Figure 20: Individual relative values (%) of differential white blood counts in 12 ibexes	89

KAZALO TABEL

Tabela 1: Hematološki parametri pri kozorogih (<i>Capra sp.</i>)	50
Tabela 2: Biokemični parametri pri kozorogih (<i>Capra sp.</i>)	51
Tabela 3: Prikaz termina odvzema in števila odvzetih vzorcev pri preiskovanih kozorogih	53
Tabela 4: Povprečna koncentracija KORT v krvnem serumu oz. krvni plazmi, pridobljenima z različnimi načini odvzema krvi (venepunkcija, krvosesne stenice in medicinske pijavke), pri vzorčenju celotne skupine in pri individualnem sledenju	71
Tabela 5: Povprečna koncentracija KORT v slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih v vseh vzorcih, odvzetih pri preiskovanih kozorogih, in v vzorcih kozorogov, ki smo jih sledili individualno	73
Tabela 6: Primerjava koncentracije KORT (oz. FGCM v iztrebkih) v vzorcih, pridobljenih z invazivno tehniko, z vzorci, pridobljenimi z neinvazivno tehniko (na ležišču), pri dominantnem samcu	74
Tabela 7: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na spol kozorogov	75
Tabela 8: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na starost kozorogov	76
Tabela 9: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na letni čas odvzema (poletje in jesen)	77
Tabela 10: Rezultati parazitoloških preiskav pred dehelmintizacijo	78
Tabela 11: Rezultati parazitoloških preiskav po dehelmintizaciji	78
Tabela 12: Koncentracija FGCM (ng/g) v iztrebkih pred dehelmintizacijo in po njej.....	80
Tabela 13: Povprečna koncentracija FGCM v iztrebkih in testosterona v serumu pri sedmih samcih poleti in jeseni	82
Tabela 14: Individualna in povprečna koncentracija FGCM, KORT in testosterona v iztrebkih, serumu in dlaki pri sedmih samcih kozoroga jeseni	83
Tabela 15: Povprečna koncentracija FGCM in estradiola v iztrebkih pri sedmih samicah poleti in jeseni	85
Tabela 16: Vrednosti hematoloških parametrov pri šestih samcih in šestih samicah	87
Tabela 17: Vrednosti biokemičnih parametrov pri šestih samcih in šestih samicah	91

INDEX OF TABLES

Table 1:	Haematological parameters in ibexes (<i>Capra sp.</i>)	50
Table 2:	Biochemical parameters in ibexes (<i>Capra sp.</i>)	51
Table 3:	Time period and number of samples taken from the ibexes investigated	53
Table 4:	Mean cortisol concentration in the blood serum or plasma obtained with different methods of blood sampling (venipuncture, bloodsucking bugs, and medicinal leeches) in samples taken from all ibexes investigated and from the same ibexes in samples taken in parallel	71
Table 5:	Mean cortisol concentration in saliva and hair, and FGCM in faeces in all samples taken from ibexes investigated and samples of ibexes followed individually	73
Table 6:	Comparison of cortisol (or FGCM levels in faeces) in samples obtained by invasive technique with samples obtained by non-invasive technique (on a bed) from a dominant male	74
Table 7:	Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM by sex of ibexes	75
Table 8:	Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM, by age of ibexes	76
Table 9:	Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM, by season (summer and autumn)	77
Table 10:	Results of parasitological examinations before deworming	78
Table 11:	Results of parasitological examinations after deworming	78
Table 12:	Concentration of FGCM (ng/g) in faeces before and after deworming	80
Table 13:	Mean FGCM in feces and serum testosterone concentrations in seven males in summer and autumn	82
Table 14:	Individual and average concentration of FGCM, cortisol, and testosterone in faeces, serum, and hair of male ibexes in autumn. Testosterone in hair was measured for five animals	83
Table 15:	Mean FGCM and faecal estradiol concentrations in seven females during summer and autumn	85
Table 16:	Values of haematological parameters for six males and six females	87
Table 17:	Values of biochemical parameters for six males and six females	91

SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH	adenokortikotropni hormon (<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>)
CRH	kortikotropin sproščujoči hormon (<i>Corticotropin Releasing Hormone</i>)
EAZA	Evropska zveza živalskih vrtov in akvarijev (<i>European Association of Zoos and Aquaria</i>)
EIA	encimsko-immunski test (<i>Enzyme Immunoassay</i>)
ELISA	encimsko vezani imuno-absorpcijski test (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPG	število jajčec na gram iztrebka (<i>Eggs Per Gram</i>)
FGCM	fekalni glukokortikoidni metabolit (<i>Faecal Glucocorticoid Metabolite</i>)
FSH	folikel stimulirajoči hormon (<i>Follicle Stimulating Hormone</i>)
HPA	hipotalamus-hipofizno-adrenalna os (<i>Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis</i>)
KORT	kortizol
LC-MS	tekočinska kromatografija – masna spektrometrija (<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
LH	luteinizirajoči hormon (<i>Luteinizing Hormone</i>)
OPG	število oocist na gram iztrebka (<i>Oocysts Per Gram</i>)
RIA	radio-immunski test (<i>Radio Immuno Assay</i>)
WAZA	Svetovna zveza živalskih vrtov (<i>World Association of Zoos and Aquariums</i>)

1 UVOD

Skrb za dobrobit živali v živalskih vrtovih predstavlja eno od najpomembnejših področij dela z živalmi, kar je povezano že z načrtovanjem njihovih bivališč. Polnopravno članstvo v Evropski zvezi živalskih vrtov in akvarijev (EAZA) in Svetovni zvezi živalskih vrtov (WAZA) zato omogočata sodelovanje z drugimi živalskimi vrtovi in s tem prenos znanja za izboljšanje dobrobiti živali [1], ki se ji v zadnjem času strokovnjaki še posebej posvečajo [2].

Leta 2015 so Kagan in sod. [3] predlagali univerzalni okvir za dobrobit živali v živalskih vrtovih. Avtorji navajajo štiri glavne komponente, ki skupaj zagotavljajo dobrobit živali. Ključnega pomena so filozofija ustanove, njena politika in programska struktura izboljšave. Jones in sod. [4] poudarjajo, da samo upoštevanje standardov o primerni oskrbi živali še ne vodi v optimalno dobrobit posameznih vrst. Obvezno je vključiti tudi sledenje spremembam, ki se kažejo pri živalih in so posledica opravljenih izboljšav v načrtovanju, izvedbi in obogatitvi ograd, načinu rokovanja z živalmi, hranjenja, ustrezne spolne in vrsti primerne strukture živali, redne konzultacije, odgovornost zaposlenih in predanost delu. Zvišanje dobrobiti se pri živalih pokaže v boljšem zdravstvenem stanju, zmanjšanju stereotipij in uspešni reprodukciji. Sodobni živalski vrtovi so ustanove, v katerih se pri oskrbi živali uveljavlja najnovejša znanstvena spoznanja v povezavi z izkušnjami dobre prakse ob doslednem upoštevanju dobrobiti, o čemer govori tudi WAZA [1]. To strategijo izvaja vse več živalskih vrtov, med njimi tudi Živalski vrt Ljubljana.

Eno od pomembnih orodij za zagotavljanje dobrobiti pri divjih živalih je ugotavljanje stresa na osnovi merjenja stresnih hormonov, pri čemer proučujemo odnos med stresnim odgovorom in stresnimi hormoni [5]. Metode vzorčenja za dokaz stresnih hormonov so lahko različno invazivne, odvisno od vrste medija, v katerem vzorčimo. Koncentracija stresnega hormona kortizola (KORT) v različnih medijih/vzorcih je različna in s tem je posamezna metoda odvzema vzorcev bolj ali manj uporabna. Najprimernejši medij za ugotavljanje koncentracije hormonov je krvni serum, hkrati je odvzem krvi tudi ena bolj stresnih oziroma invazivnih metod odvzema.

Ob odvzemu vzorcev pri divjih živalih moramo razlikovati med invazivnimi in neinvazivnimi metodami ter med invazivnim in neinvazivnim pristopom ob vzorčenju. Invazivna metoda je jemanje krvi iz krvne žile (venepunkcija), ker je vbod z iglo tisti dejavnik, ki ločuje obe kategoriji. Van Herck s sodelavci je ugotovil, da jemanje krvi pri laboratorijskih podganah povzroči bolečino in stres [6], medtem ko so Meyer in sod. pri jemanju krvi ugotavljali tudi povišan kortikosteron v krvi in spremembe v mimiki obraza, značilne za bolečino [7]. Merjenje hormonov v iztrebkih, slini, dlaki, perju, urinu in mleku torej spada med neinvazivne metode.

O invazivnem pristopu govorimo, kadar moramo živali predhodno odloviti in fiksirati, v nekaterih primerih tudi sedirati, kar jim povzroča dodaten stres. Ta je po navadi še večji, kot je na primer sam vbod z iglo. Alternativni odvzemi krvi s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami spadajo med neinvazivne metode in pristope, za ta namen pa mora biti izdelano posebno ležišče, na katerem so v posodah nameščene krvosesne stenice in medicinske pijavke. Ko živali na takem ležišču počivajo, stenice in pijavke sesajo kri in tako pridobimo vzorec na neinvaziven način z neinvazivnim pristopom. Pri živalih v živalskih vrtovih se krvosesne stenice lahko aplicira na žival tudi s pomočjo kozarca z mrežico ali pa se krvosesno stenico preprosto položi na žival [8].

Koncentracija KORT v krvnih vzorcih kaže trenutno stanje tega hormona in s tem tudi raven stresa v krajšem časovnem obdobju. Pri presoji rezultatov moramo upoštevati, da se vrednosti zelo hitro zvišajo že ob sami manipulaciji z živaljo [7]. Pri treniranih živalih in živalih, ki so navajene rokovanja, je dejavnik stresa ob tem postopku veliko manjši kot pri divjih živalih, pri katerih je za odzem vzorca potreben odlov, kar vodi do spremembe vrednosti KORT in popačenja slike trenutnega stanja. Ta način vzorčenja predstavlja tudi tveganje poškodb pri živalih in sodelujočem osebju. Tudi odzem vzorcev slin, dlake in urina, sicer neinvazivnih metod vzorčenja, pri divjih živali navadno zahteva invazivni pristop, ker je treba živali prej odloviti, razen v primeru zbiranja vzorcev, ki jih živali pustijo [2], kar je najuporabnejše pri iztrebkih, urinu na primerni podlagi, ali dlaki na ograjah in drevesih po praskanju. V raziskavi smo razvijali neinvazivni pristop k jemanju krvi na posebnem ležišču, s katerim živali ne vznemirjamo.

Na ležišče smo namestili posodice s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami, ki se hranijo, ko živali na njem počivajo. Omenjena metoda bo zelo uporabna pri odvzemu vzorcev tudi pri drugih živalih, predvsem zvereh, s katerimi je težko rokovati brez anestezije.

V raziskavi smo proučevali alpske kozorožce, vrsto divje koze, ki živi v evropskih Alpah. Zaradi lova so bili v 19. stoletju skoraj iztrebljeni, ohranili so se samo v narodnem parku Gran Paradiso v severozahodnih italijanskih Alpah [9]. Ukrepi za zaščito populacije alpskih kozorogov so bili uvedeni že v 19. stoletju, vendar kljub prizadevanjem niso ustavili upada populacije [10]. Uspešno so jih znova naselili v začetku 20. stoletja v Alpah na območjih sedanje Avstrije, Francije, Nemčije, Italije, Slovenije in Švice na nadmorskih višinah od 1600 in 3200 metrov [9]. Leta 1906 se je začel obsežen ohranitveni program, ki je omogočil, da so se alpski kozorogi znova naselili na svoje prvotno območje razširjenosti; v prvotnem popisu so prešteli približno 100 živali, v najnovejšem popisu leta 2017 pa 50.000. Ukrepi za zaščito alpskih kozorogov predstavljajo enega najuspešnejših ohranitvenih projektov, saj je vnovična naselitev vrst, katerih naravne populacije upadajo, na prvotno območje razširjenosti ključna za njihovo preživetje [11]. Naselitev alpskih kozorogov predstavlja uspešen model vnovične naselitve ogrožene živalske vrste v njeno naravno okolje [10, 12].

V Živalskem vrtu Ljubljana čreda kozorogov predstavlja največjo skupino živali, v kateri smo lahko proučevali samce, samice in mladiče. Pri njih so bile izvedene različne metode odvzema vzorcev: odvzem krvi z venepunkcijo, s krvosesnimi stenicami – *Rhodnius prolixus* (*R. prolixus*) in medicinskimi pijavkami – *Hirudo medicinalis* (*H. medicinalis*), odvzem sline, dlake, iztrebkov, urina in solz. Opravljene so bile biokemične in hematološke preiskave krvi in endokrinološke preiskave sline, dlake, iztrebkov, urina in solz.

Koncentracijo KORT in njegovih metabolitov smo ugotavljali v krvi, iztrebkih, dlaki, slini, solzah in urinu ob različnih stresnih dejavnikih (npr. ob parazitozah, socialnih nesoglasjih v skupini ...). Primerjali smo povezanost med koncentracijama KORT in spolnih hormonov (testosteron in estrogen) v krvi, pridobljeni z venepunkcijo, iztrebkih in dlaki.

V nalogi smo poleg standardnega odvzema krvi z venepunkcijo izpostavili in proučili tudi uporabnost alternativnega odvzema krvi s krvosesi stenicami in medicinskimi pijavkami, ki jih lahko uporabimo tudi za odvzem krvi pri drugih divjih živalih, kot so zveri, žirafe in sloni [8]. Predpostavili smo, da sta ti dve metodi manj stresni kot jemanje krvi iz žile, medij za ugotavljanje pa je enak. Kri, pridobljena z alternativnimi metodami, je uporabna tudi za druge namene, na primer za ugotavljanje specifičnih protiteles v diagnostiki kužnih bolezni in ugotavljanje hematoloških in biokemičnih vrednosti v krvi [13, 14]. V disertaciji smo preverjali, če se taka kri lahko uporablja tudi v endokrinologiji. Za jemanje krvi s stenicami in pijavkami je bilo izdelano posebno ležišče, katerega uporabnost smo želeli preizkusiti za neinvazivno jemanje krvi pri kozorogih.

Rezultati doktorske disertacije so izvirni prispevek k znanosti in nudijo doprinos k dobrobiti alpskih kozorogov in posledično drugih živali v živalskih vrtovih in oborah. Ob takem načinu odvzema krvnih vzorcev se zmanjša nevarnost poškodb živali in strokovnega osebja pri odlovu, ob tem pa se zmanjša tudi vznemirjanje živali. Zelo pomembna sta neinvazivni pristop in neinvazivna metoda vzorčenja pri bolnih in oslabeledih živalih, pri katerih odlov ali anestezija, ki sta potrebna za pristop, lahko pomenita veliko nevarnost za preživetje ob samem posegu.

1.1 NAMEN DELA

Z raziskavami smo želeli preveriti uporabnost različnih vzorcev za ugotavljanje koncentracije kortizola pri alpskih kozorogih (*Capra ibex*), kot so kri, iztrebki, dlaka, slina, urin in solze. Ob tem smo želeli ugotoviti, kakšne so razlike v koncentraciji kortizola med spoloma, glede na starost živali in letni čas, kakšen vpliv imajo prisotnost zajedavcev, socialni odnosi v čredi in drugi stresni dejavniki, kot je na primer obdobje reprodukcije.

Namen doktorske disertacije je bil proučiti možnosti uporabe alternativnih metod vzorčenja krvi s krvosnimi stenicami in medicinskimi pijavkami, ki so veliko manj invazivne kot odvzem krvi z venepunkcijo. To je zelo pomembno zaradi neinvazivnega pristopa k vzorčenju in s tem izboljšanja ravni dobrobiti živali, saj za pridobitev vzorcev ni potreben odlov, ki živalim povzroča stres in nevarnost poškodb. Odvzem vzorcev krvi se lahko izvaja na prostorih za počivanje brez vznemirjanja živali. S tem namenom smo v rutinsko delo vpeljali tudi gojenje krvosnih stenic v živalskem vrtu.

Namen doktorske disertacije je bil tudi ugotoviti, kako bi lahko izboljšali raven dobrobiti pri alpskih kozorogih predvsem pri različnih vzorčenjih, ter spoznati socialne strukture, odnose in način prilagoditve življenja v živalskih vrtovih. Na modelu alpskih kozorogov lahko uporabnost različnih metod in tehnik vzorčenja razširimo na druge divje in prostoživeče živali v živalskih vrtovih, oborah in v naravi.

1.2 HIPOTEZE

V raziskavi smo preverjali naslednje hipoteze:

1. Predvidevamo, da bodo za ugotavljanje koncentracije kortizola poleg krvi uporabni mediji tudi iztrebki, dlaka in slina (v tem vrstnem redu), medtem ko bo postopek vzorčenja urina in solz morda težje izvedljiv.
2. V nalogi bomo poleg odvzema krvi z venepunkcijo izpostavili in proučili tudi uporabnost alternativnega odvzema krvi s krvosesnimi stenicami (*R. prolixus*) in medicinskimi pijavkami (*H. medicinalis*). Predvidevamo, da sta ti dve metodi za kozoroge manj stresni zaradi drugačnega pristopa do živali – ker odlov in fiksacija živali nista potrebna.
3. Menimo, da bo primerjava rezultatov biokemičnih in hematoloških preiskav, ki bodo narejene vzporedno s tremi različnimi načini odvzema krvi (odvzem krvi z venepunkcijo, odvzem s krvosesnimi stenicami in odvzem z medicinskimi pijavkami – vsi trije odvzemi bodo izvedeni ob predhodni fiksaciji kozorogov), statistično zanemarljiva. Prav tako predvidevamo, da bo razlika v koncentraciji kortizola pri načinu vzorčenja ob predhodnem lovljenju in fiksaciji ter vzporednem odvzemu vzorcev pri posamezni živali statistično zanemarljiva.
4. Menimo, da bo raven kortizola v vzorcih, odvzetih s tremi različnimi načini odvzema krvi (odvzem krvi z venepunkcijo in predhodno fiksacijo, odvzem s krvosesnimi stenicami na ležišču in medicinskimi pijavkami v globoki posodi), statistično značilno različna.
5. Predvidevamo, da bomo pred dehelmintizacijo (prisotnost notranjih zajedavcev) ugotovili višjo raven kortizola kot tri tedne pozneje, torej po opravljeni dehelmintizaciji in izvedenem zdravljenju.
6. Predvidevamo, da bomo jeseni (parjenje) ugotavljali višjo raven kortizola kot spomladi in poleti. Menimo, da bomo ugotovili tudi statistično značilne korelacije med koncentracijo kortizola in spolnimi hormoni.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 BIOLOGIJA ALPSKIH KOZOROGOVI (*Capra ibex*), NJIHOVE MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Alpski kozorog (*Capra ibex*), ki ga je prvi opisal Carl Linnaeus leta 1758 in ga uvrstil v rod koz (*Capra*) z najmanj sedmimi vrstami divjih koz, ima kratko in široko glavo, gosto dlako sivorjave barve po večini telesa, svetel trebuh in temneje obarvano brado, vrat in liso na hrbtu. Na glavi imata roge oba spola, vendar so pri samcih veliko večji kot pri samicah. Pri samcu dosežejo dolžino od 75 do 98 centimetrov in imajo prečne grbe. Njihova telesna masa se giblje od 67 do 117 kilogramov, z višino vihra pa dosežejo do 93 centimetrov. Samice so manjše in lažje s krajšimi in manj grbastimi rogovi [9]. Kot odlični plezalci naseljujejo skalna območja nad gozdno mejo in okoli snežne meje na nadmorski višini od 1100 do 3300 metrov [15]. Čeprav so alpski kozorogi socialne živali, sezonsko oziroma glede na letni čas samci in samice bivajo ločeno in naseljujejo različne habitate, pri čemer imajo samice raje strmejša področja kot samci [16]. Pozimi se živali obeh spolov pomaknejo na skalna pobočja z manj snega in izbirajo strmine z naklonom od 30 do 45 stopinj, kjer za zaščito in zavetje koristijo manjše jame in skalne previse [9]. V naravi obstajajo štiri najpogostejše skupine: skupina odraslih samcev, skupina samic z mladiči, skupina mladih, dve do tri leta starih živali, in mešana skupina [9, 17]. Kozorogi so pašne živali. Glavni del njihove prehrane predstavljajo trave, manjši del pa mahovi, cvetovi, listje in veje [9]. Zingg [18] je z mikrohistološkim analizami rastlinskih delcev v iztrebkih zbrala kvantitativne podatke o sestavi krme alpskega kozoroga. Ugotovila je, da se prevladujoča krma, tj. travno rastlinje, skozi letne čase ni bistveno razlikovala. Bistvene razlike je našla pri zauživanju enokaličnic (*Cyperaceae* – ostričevke in *Poaceae* – trave) in dvokaličnic. Poudarja, da so del njihovega jedilnika tudi iglavci (4,9 %), različne vrste praproti in mahovi.

Pri alpskih kozorogih se obdobje parjenja (ruka) začne decembra in traja približno šest tednov. V tem času črede samcev razpadejo na manjše skupine, samci začnejo iskati samice. V prvem delu ruka se samci približajo samicam v estrusu in jim začnejo dvoriti, v drugem delu pa se samec z eno samico loči od tropa, jo varuje pred drugimi samci in se z njo pari. Po končanem roku se samec vrne k skupini in ponovi obred parjenja [9]. Brejost traja povprečno 167 dni. Konča se s porodom enega mladiča, približno petina kotitev pa z dvema mladičema [19].

2.2 ZDRAVSTVENA PROBLEMATIKA ALPSKIH KOZOROGOVI V NARAVI IN V UJETNIŠTVU

2.2.1 Zdravstvena problematika v naravi

Alpske kozoroge pestijo številne bolezni, ki so lahko tudi usodne. Najpogostejše so garje (*Sarcoptes scabiei* var. *caprae*) [20], bakterijska pljučnica (*Mycoplasma agalactiae*), infekcijski keratokonjunktivitis (*Mycoplasma conjunctivae*), pastereloza (*Pasteurella* sp.), gniloba stopal oziroma infekcijski pododermatitis (*Dichelobacter nodosus*) in druge okužbe parkljev (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides melaninogenicus*), kužni ektim (*Poxviridae*) in paratuberkuloza (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) [9, 21-23]. Pomemben dejavnik pri zmanjševanju populacij v naravi predstavljajo agensi, ki povzročajo abortuse. Živali v švicarskih Alpah so bile seropozitivne na *Coxiella brunetti*, *Leptospira* sp., *Salmonella abortusovis*, *Chlamydia abortus*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* in *Pestivirus* (bovina virusna diareja) [9, 24]. Bruceloza (*Brucella melitensis*) je bila v raziskavi pri alpskih kozorogih v francoskih Alpah leta 2012 ugotovljena pri 38 odstotkih pregledanih živali, pri čemer so bile samice odgovorne za 90 odstotkov prenosov [25, 26]. Med letoma 1995 in 2010 je bil izbruh garjavosti (*Sarcoptes scabiei*) v vzhodnih Alpah vzrok za več kot 90-odstotni upad populacije, kar je privedlo do skorajšnjega izumrtja alpskih kozorogov [27]. Pri močno infestiranih iberskih kozorogih so zaradi garjavosti poleg anemije ugotavljali še sekundarne okužbe kože in posledično značilni nevtrofilijo in limfopenijo [28].

Pljučnica zaradi okužbe s pljučnimi nematodi je eden od najpogostejših vzrokov poginov pri alpskih kozorogih [29]. Najpogosteje gre za invazijo zajedavcev iz rodov *Muellerius* sp., *Protostrongylus* sp., *Neostrongylus* sp., *Cystocaulus* sp. in *Dictyocaulus* sp. [29, 30]. Gastrointestinalni zajedavci so bili ugotovljeni pri vseh preiskanih živalih. Najpogostejši so strongilidi (100 %), *Eimeria* sp. (100 %), *Muellerius* sp. (79,8 %) in *Nematodirus/Marshallagia* sp. (79,0 %) [31]. Infekcijski keratokonjunktivitis, ki ga povzroča *Mycoplasma conjunctivae*, je zelo nalezljiva očesna okužba alpskih kozorogov, za katero je značilno vnetje veznice in roženice, ki povzroči motnost in perforacijo roženice; smrtnost je lahko do 30-odstotna [9, 32].

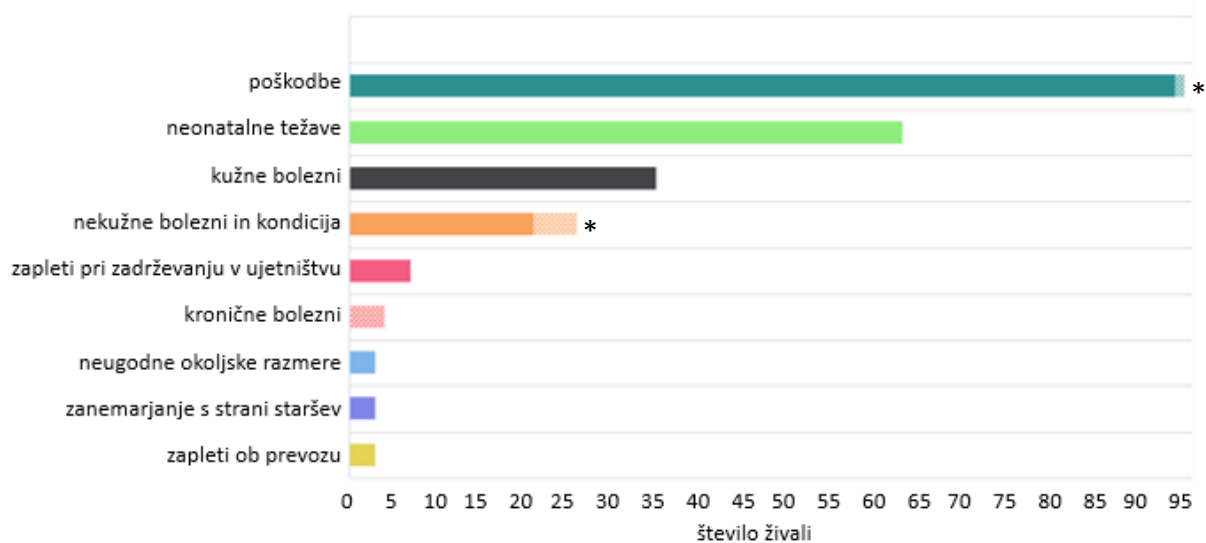
Nalezljivi ektim je bolezen, ki jo povzroča parapoxvirus. Okužba prizadene domače in divje male prežvekovalce, med katere spadajo tudi alpski kozorogi. Značilen je proliferativni dermatitis s papulami in pustulami, ki običajno prizadenejo usta, ustnice in nos. Lezije se lahko razširijo na sluznico ustne votline, požiralnika in siriščnika ter na kožo glave, stegen, perianalne regije, skrotuma, prepucija, vulve in seskov. Valdeperes in sod. (2023) v svojem članku poleg nalezljivega ektima opisujejo ostale aktualne bolezni iberskega kozoroga (*Capra pyrenaica*), ki je bližnji sorodnik alpskega kozoroga [33].

2.2.2 Zdravstvena problematika v oborah in živalskih vrtovih

V Evropi deluje najmanj 17 živalskih vrtov, ki zadržujejo alpske kozoroge v ujetništvu [34]. Veljavna uredba (Uredba (EU) 2016/429 – »Pravila o zdravju živali«) [35], ki nadomešča direktivo BALAI (Direktiva Sveta 92/65/EGS), veljavno do aprila 2021, predstavlja najvišji strokovni standard poslovanja živalskih vrtov in hkrati predvideva strokovno delo in odličen strokovni napredek, ki se kaže tudi pri spremljanju zdravstvenega varstva živali.

Pri spremljanju zdravstvenega stanja živali v živalskih vrtovih se posebej poudarja reden nadzor zdravstvenega stanja, ki poleg opazovanja kondicije živali zajema tudi parazitološke in krvne preiskave. Ugotavljanje protiteles v serumu je pomembno tudi zaradi nadzora nad določenimi boleznimi v čredi na osnovi Uredbe (EU) 2016/429 [35]. V Živalskem vrtu Ljubljana v okviru omenjene Uredbe testirajo kozoroge na brucelozo (*Brucella melitensis*), Maedi-visna/virusni artritis encefalitis koz (maedi visna virus in virus kozjega artritisa in encefalitisa), Q-mrzlico (*Coxiella burnetti*), paratuberkulozo (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) in herpesvirusno infekcijo. Pri živalih v živalskih vrtovih eno večjih zdravstvenih težav zaradi velike koncentracije živali na manjšem prostoru predstavljajo endoparaziti. Pri alpskih kozorogih v Živalskem vrtu Ljubljana je bilo v skupini kozorogov potrjenih šest različnih vrst patogenov: *Eimeria sp.*, *Trichuris sp.*, *Ostertagia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Strongylidae sp.* in *Strongyloides sp.* [36, 37].

Slika 1 prikazuje zdravstveno problematiko alpskih kozorogov v živalskih vrtovih, ki so vključeni v Evropsko zvezo živalskih vrtov in akvarijev (program EAZA). V obdobju od 1. januarja 2000 do 12. aprila 2024 je bilo v bazo ZIMS (Zoological Information Management System) vpisanih 234 alpskih kozorogov [38]. Baza ZIMS je računalniški program, v katerega so vpisani vsi veterinarski posegi na posamezni živali, dokumentacija pa je dostopna vsem strokovnim delavcem, ki delajo z živalmi v živalskih vrtovih, ki so člani EAZA in uporabljajo omenjeni program.



* temni del stolpca – individualni primeri; svetli del stolpca – težava v celi skupini

Slika 1: Vzroki za zdravstvene težave kozorogov v živalskih vrtovih v Evropi, vključenih v program EAZA v obdobju od 1. januarja 2020 do 12. aprila 2024 [38].

Figure 1: Causes of ibex health problems in European zoos participating in the EAZA programme from 1 January 2020 to 12 April 2024 [38].

2.3 DOBROBIT ŽIVALI V ŽIVALSKIH VRTOVIH

Polnopravno članstvo v Evropski zvezi živalskih vrtov in akvarijev (EAZA) in Svetovni zvezi živalskih vrtov (WAZA) omogočata sodelovanje z drugimi živalskimi vrtovi in s tem spremljanje smernic in priporočil za dobrobit živali, ki se jim v zadnjem času strokovnjaki še posebej posvečajo [1].

Sodobni živalski vrtovi niso več samo mesta za prikazovanje živali, ampak so pomembne ustanove, kjer se najnovejša znanstvena spoznanja v povezavi z izkušnjami dobre prakse uveljavljajo pri oskrbi živali, pri čemer je upoštevanje dobrobiti na visoki ravni, o čemer govori tudi WAZA [1]. To strategijo izvaja vse več živalskih vrtov, med njimi tudi Živalski vrt Ljubljana.

V živalskih vrtovih je dobrobit živali zelo pomembna. Z načrtovanjem ograd skušajo posnemati naravne habitate, živalim omogočati vrsti primerne vzorce vedenja, brez stereotipij in drugih negativnih oblik spremenjenega obnašanja, kar poleg zdravja vpliva tudi na spolno aktivnost živali, kar je še posebej pomembno pri ohranjanju ogroženih živalskih vrst zaradi zagotavljanja populacije v živalskih vrtovih in vračanja v naravo. Pri vrednotenju dobrobiti je zelo pomemben monitoring, s katerim lahko med drugimi dejavniki sledimo tudi spolno aktivnost živali in izpostavljenost stresu. Ugotavljanje koncentracije fekalnih glukokortikoidnih metabolitov (FGCM) v iztrebkih je ena od zelo uporabnih tehnik.

Prav tako ima pri vrednotenju dobrobiti pomembno vlogo tudi ugotavljanje spolnih hormonov oziroma njihovih metabolitov v iztrebkih, kar je podlaga za načrtovanje reprodukcije in izbiro primerne časa združevanja živali za preprečenje medsebojne agresije, posebno pa je pomembno pri umetnem osemenjevanju. V nadaljevanju opisujemo strategije spremljanja in upravljanja reprodukcijskih procesov pri nekaterih živalskih vrstah, ki so stresu bolj izpostavljene tudi zaradi svoje »divje« narave [39, 40]. Največ raziskav je bilo narejenih na slonih. Pri 50 odstotkih slonic v evropskih živalskih vrtovih se spremlja dinamika spolnih hormonov, kar je privedlo do povečanja populacije slonov v živalskih vrtovih.

V ZDA se vzorci krvi za sledenje dinamike spolnih hormonov jemljejo enkrat tedensko, v Evropi pa se jemljejo urinski vzorci. Spremljanje spolnega ciklusa slonic na podlagi spolnih hormonov je še posebej pomembno zaradi vse pogostejšega izvajanja umetne osemenitve pri uravnavanju populacije [41].

Proučevane so bile tudi štiri vrste nosorogov (afriški črni in beli, indijski in sumatranski nosorog). Prvi trije imajo spontano ovulacijo, pri sumatranskem pa je inducirana s parjenjem. Brejost se ugotavlja z merjenjem koncentracije progesteronskih metabolitov v slini, iztrebkih, urinu in plazmi. Pri severnoameriških črnih medvedih so bile prve raziskave v diagnostiki hormonov narejene v krvi. Razvita je diagnostika iz iztrebkov, pri pandah tudi iz urina. Medvedi se pariyo sezonsko, v obdobju do 2,5 meseca. Določajo se estrogenski metaboliti v urinu z namenom parjenja ali umetne oploditve. Poleg tega je razvita tudi metoda vaginalne citologije, ugotavljanja luteinizirajočega hormona (LH) v urinu in estrogenski vrh v iztrebkih. Večina mačk ima inducirano ovulacijo in je sezonsko aktivnih. Zaradi težavnosti odvzema vzorcev krvi za analize se pri njih hormoni merijo v iztrebkih in tudi v urinu [41].

Odvzem vzorcev krvi je za ribe bolj stresen kot za druge višje razvite vretenčarje, saj jih je treba vzeti iz naravnega okolja, tj. vode. Zato se zadnjih 15 let še posebej intenzivno razvijajo metode odvzema vzorcev za določanje steroidnih hormonov iz površinskega sloja sluzi, okolne vode ter iz iztrebkov in urina rib [42].

2.3.1 Dobrobit alpskih kozorogov v živalskih vrtovih

Za ugotavljanje stresa, ki so mu izpostavljene živali v živalskih vrtovih, se uporablja merjenje stresnih hormonov. Večino živali v zooloških vrtovih je za namene diagnostike pred odvzemom vzorcev treba fiksirati in v nekaterih primerih tudi sedirati. Živali so zato izpostavljene dodatnem stresu, kar lahko vodi do poškodb živali in osebja [1, 43]. Treniranje živali je v živalskih vrtovih zelo pomembno orodje, s katerim se pri njih zmanjša stres ob odvzemu vzorcev [41].

Ugotavljanje stresnih hormonov za vrednotenje ravni dobrobiti živali, ki živijo v večjih skupinah, kot so na primer kozorogi, je v živalskih vrtovih zelo pomembno, saj so živali nenehno izpostavljene različnim stresnim dejavnikom. Ti so na primer spolna struktura črede, ki pogosto ni enaka kakor v naravi, prevelika koncentracija živali pa tudi bližina obiskovalcev, ki s seboj pripeljejo pse, ki kozorogom lahko predstavljajo plenilce. Ukrep za dobrobit je poleg namena približevanja pogojem življenja, podobnim naravnim, tudi oblikovanje primerne spolne strukture črede, saj vodi v bolj uspešno reprodukcijo in nenazadnje normalen socialni odnos med živalmi, kar je izrednega pomena. Ob tem se zmanjša tako nevarnost poškodb zaradi agresivne interakcije med posamezniki kot tudi pojavnost bolezni, ki so povezane s stalnim stresom, predvsem parazitov.

Podatki o določanju koncentracije kortizola (KORT) za presojo dobrobiti pri alpskih kozorogih so zelo skopi. Ugotavlja se, da na koncentracijo KORT vpliva veliko različnih dejavnikov. Prandi in sod. [44] so bili prvi, ki so opisali ugotavljanje stresnih hormonov v dlaki alpskih kozorogov. Najnovejše rezultate o koncentraciji KORT v različnih medijih so podali Kastelic in sod. [45]. Sartorelli in sod. [46] so merili koncentracijo KORT v krvi samic kozorogov in ugotovili, da je odvisna od podnebnih razmer.

Perez in sod. [47] so potrdili, da lahko različno življenjsko okolje kozorogov oz. področje različno vpliva na aktivacijo hipotalamus-hipofizno-adrenalne (HPA) osi in s tem na različno koncentracijo kortizola v dlaki, kar kaže na razlike v prilagoditvi na različna okolja. Casas in sod. [48] so poleg hematoloških in biokemičnih parametrov pri iberskih kozorogih (*Capra pyrenaica*) izmerili tudi koncentracijo KORT v krvi.

2.4 NEINVAZIVNE METODE ODVZEMA VZORCEV ZA ENDOKRINOLOŠKE ANALIZE

Hormonski monitoring je dobro razvito orodje za ugotavljanje hormonalne aktivnosti prostoživečih in divjih živali. Ker so divje živali v naravi in živalskih vrtovih v večini primerov bolj izpostavljene stresu ob vzorčenju od domačih živali, se zanje razvijajo neinvazivne metode in neinvazivni pristopi k jemanju vzorcev. Od leta 2010 se število člankov o neinvazivnem vzorčenju vztrajno povečuje [2]. To je pomembno tudi za izboljšanje dobrobiti živali, saj o omejevanju bolečine in stiske v »Načelu 3Rs« govorita že Russell in Burch [49], kar je najprej veljalo za laboratorijske, zdaj pa se počasi uveljavlja tudi za divje živali [2].

Najbolj natančne in najhitrejše so preiskave krvi, pri katerih se ugotavljajo steroidni hormoni (kortizol, estrogeni, progestageni, androgeni) in proteinski hormoni (FSH, LH, prolaktin, inhibin, relaxin). V živalskih vrtovih se monitoring najpogosteje izvaja pri slonih, nosorogih, medvedih in vrstah velikih mačk [41], pri čemer pa so živali ob jemanju vzorcev izpostavljene stresu, kar lahko vpliva na povišane vrednosti glukokortikoidov [50]. Pred odvzemom vzorcev krvi je treba živali odloviti, kar lahko privede do poškodb živali ali sodelujočega osebja, ali jih anestezirati, kar prav tako predstavlja tveganje za živali.

V nekaterih primerih, ki zahtevajo vzorčenje krvi, je to pri divjih živalih navadno povezano z odlovom ali odstrelom [51]. V živalskih vrtovih razvijajo tehnike za neinvazivno vzorčenje krvi [13, 14, 45]. Razvile so se metode, s katerimi lahko ugotavljamo vrednosti v krvi, odvzeti na neinvaziven način, s pomočjo krvosesnih stenic in medicinskih pijavk, s čimer živali ne vznemirjamo, sam postopek pa je za živali neboleč in niso podvržene stresu ali nevarnosti poškodb. V primerih, ko za preiskave ni nujna kri, lahko ugotavljamo vrednosti hormonov v iztrebkih, urinu, slini, mleku, dlaki, solzah, perju in jajčnih lupinah. Pomembno je vedeti, da se proteinski hormoni lahko določajo samo v krvi, ker se v iztrebkih in urinu ne izločajo v imunogeni obliki [41].

Pri vzorčenjih pri divjih živalih se metoda vzorčenja in metoda pristopa k vzorčenju velikokrat prepletata. Poznamo invazivni pristop, ko je treba žival odloviti, in neinvazivni pristop, ko živali zaradi odvzema vzorcev ne vznemirjamo, ter invazivno (odvzem krvi z vbodom z iglo) in neinvazivno metodo vzorčenja. Lahko izvajamo neinvazivno metodo, hkrati pa je pristop do živali invaziven, kar lahko povzroči spremenjene vrednosti kortizola. Odvzema vzorcev slin in solz sta načeloma neinvazivni metodi vzorčenja, ki pa za divje živali, nevajene rokovanja, predstavljata invaziven pristop, ki je za njih stresen, ker jih je treba prej odloviti. Zato se kot neinvazivna metoda in pristop najpogosteje uporabljajo vzorčenja iztrebkov (50 %), dlake, perja (15 %) in urina (8 %) [2].

2.4.1 Iztrebki

Pomembna neinvazivna in zato v praksi uporabna metoda je ugotavljanje hormonov oziroma njihovih metabolitov (*Fecal Glucocorticoid Metabolite*; FGCM) v iztrebkih, ki se s pridom uporablja tako pri prostoživečih živalskih vrstah v naravi kot tudi v živalskih vrtovih [44, 52].

Glukokortikoidi se po večini inaktivirajo in metabolizirajo v jetrih, iz katerih se z žolčem izločijo v črevo in iz telesa z iztrebki. Primerjava rezultatov različnih raziskav kaže, da imajo domače živali nižje koncentracije FGCM v iztrebkih kot enake vrste v naravi, kar je bilo proučevano pri divjih in domačih svinjah, divjih bizonih ter domačih bikih in kravah, pri volku in psu, evropski divji in domači mački ter pri divji in laboratorijski podgani [53].

V iztrebkih ugotavljamo hormonsko stanje v času od enega do dveh dni, lahko tudi več po stimulaciji, odvisno od trajanja pasaže vzdolž črevesja. Za natančno časovno določanje časa stresa moramo odvzeti vzorce iztrebkov v določenih časovnih razmikih, ki lahko trajajo več dni. Metoda določanja hormonov iz iztrebkov je uporabna za določanje kratko in dlje trajajočega stresa [53].

Metode ugotavljanja stresa, ki so nam trenutno na voljo, lahko pripomorejo k dobroti najrazličnejših vrst živali. Eden od novejših člankov govori o ugotavljanju KORT v iztrebkih pri ljubiteljskih kuncih med transportom. Znanstveniki ugotavljajo pomemben dvig koncentracije FGCM v vzorcih iztrebkov ne glede na ponujene priboljške med transportom in navidezno nestresno situacijo [54].

2.4.2 Dlaka

Koncentracijo KORT, s katero vrednotimo intenzivnost stresnega odgovora, lahko določamo v različnih bioloških materialih, vključno z dlako. KORT se v dlako nalaga med njeno rastjo iz krvnih žil, ki oskrbujejo dlačni folikel, in z difuzijo iz tkiv, ki obdajajo rastočo dlako [55, 56]. Ker je rast dlak dolgo trajajoči proces, lahko z analizo KORT v dlaki ugotavljamo dlje trajajoči oziroma kronični stres [53].

Dlako najlažje odvezamemo na mestih, kjer se živali zadržujejo in drgnejo, lahko tudi na ograjah, za kar ne potrebujemo invazivnega pristopa. Lahko pa jo odvezamemo tudi s striženjem ob invazivnem pristopu ob odlovu živali, kar ne vpliva na koncentracijo KORT, saj se ta nalaga v daljšem časovnem obdobju [53].

2.4.3 Slina

Ugotavljanje KORT v slini je kot neinvazivna metoda z neinvazivnim pristopom primerna pri udomačenih, treniranih živalih ali s pomočjo materiala za žvečenje [57]. Slina je primerna za ugotavljanje trenutnega stanja KORT, ker se v slino izloča podobno kot v kri in lahko tako kot v krvi ugotavljamo dnevni ritem, zato je primerna za ugotavljanje akutnega stresa [53]. Hormoni prehajajo v slino v največji meri skozi acinarne celice, lahko pa tudi iz krvi preko odrgnin v ustih in eksudata iz periodontalnih tkiv [5]. Raven KORT v slini je desetkrat nižja kot v krvi [50], kar je verjetno povezano s prisotnostjo 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2 in 17 hidroksisteroid dehidrogenaze v slinskih žlezah [5].

V slini se kot stresni marker poleg KORT pogosto ugotavlja tudi raven alfa-amilaze [58, 59]. Kortizol v slini je ultrafiltrat kortizola v plazmi in kaže na koncentracijo biološko aktivnega, na proteine nevezanega (prostega) kortizola v serumu. Kortizol vstopa v slino z difuzijo, neodvisno od pretoka sline. Izraža cirkadiani ritem kortizola z zgodnjim jutranjim vrhom ter se hitro in zanesljivo odziva na spremembe koncentracije kortizola v plazmi, čeprav je njegova koncentracija približno desetkrat nižja kot v serumu [60, 61].

2.4.4 Urin

Prenos kortizola v krvi omogoča vezava na specifični nosilni globulin CBG (*Cortisol binding globulin*) in na albumine. Biološko aktivna prosta frakcija predstavlja le od dva do pet odstotkov skupne koncentracije kortizola. Večina kortizola se izloča v urin v obliki metabolita tetrahidrokortizola, konjugiranega z glukuronidi in sulfati, samo približno trije odstotki pa kot naravni hormon. Nevezani kortizol se v ledvicah filtrira in delno reabsorbira iz primarnega urina, zato se le zelo majhen delež (~2 %) izloči nespremenjen z urinom. Ker spremembe v presnovi jeter ne vplivajo na koncentracijo prostega kortizola v urinu, merjenje slednjega bolje izraža endogeno koncentracijo kortizola kot merjenje koncentracij metabolitov kortizola v urinu [60, 61].

2.4.5 Solze

Ugotavljanje KORT v solzah je neinvazivna metoda vzorčenja z neinvazivnim pristopom pri treniranih in udomačenih živalih. V maščobi topni prosti KORT se iz krvi izloča z difuzijo preko krvno-vodne bariere v solze [62]. Monk s sod. je ugotovila, da KORT v solzah signifikantno sledi povečanju KORT v krvi [63].

2.4.6 Alternativni načini odvzema krvi

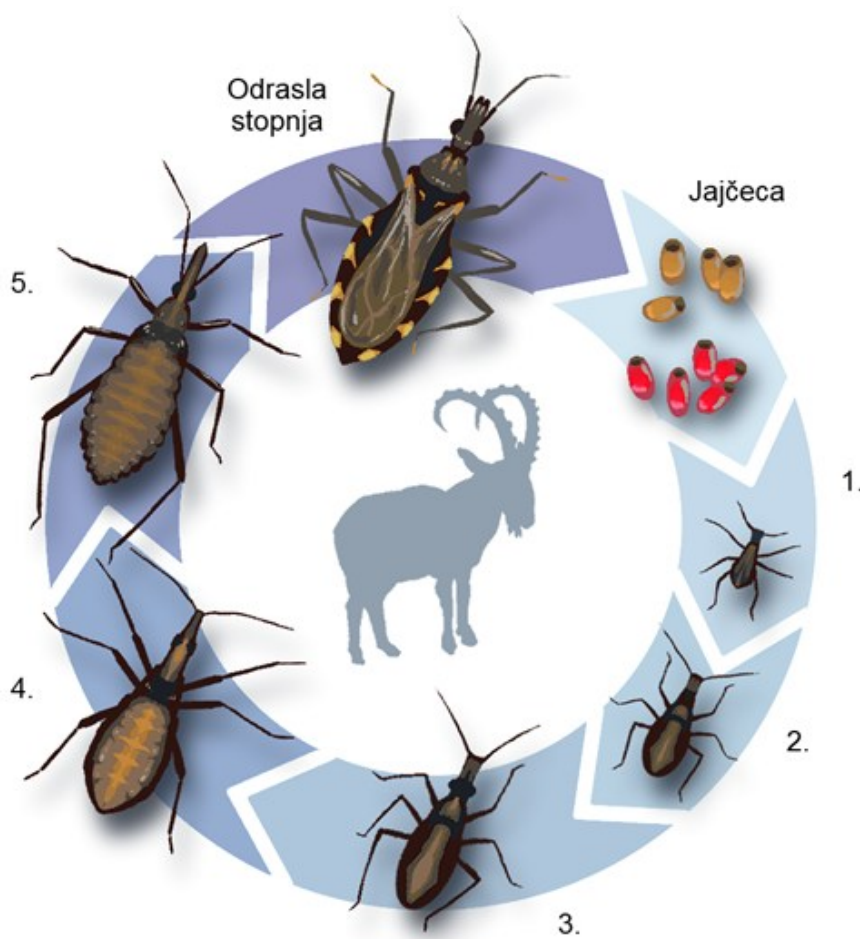
Uporaba krvosesnih stenic (*R. prolixus*) [8, 52, 64, 65] in medicinskih pijavk (*H. medicinalis*) [14, 66] predstavlja alternativno, neinvazivno metodo za odvzem krvi iz krvnih žil, ki se uporablja predvsem v živalskih vrtovih in pri prostoživečih živalih. Tako lahko odvezemo manjše količine krvi, ne da bi živali lovili ali kako drugače vznemirjali in jih izpostavljali poškodbam [8]. Izreden napredek pri neinvazivnem odvzemu krvi je opisan pri majhnih vrstah ptic v času gnezdenja. V ta namen se v gnezdo podtaknejo umetna jajca, v katerih so krvosesne stenice, ki pijejo kri pticam, medtem ko valijo [67].

2.4.6.1 Krvosesne stenice (*Rhodnius prolixus*)

Pri živalih se je metoda odvzema krvi s pomočjo krvosesnih stenic začela uporabljati po letu 1971 [8]. Prvič so ta način vzorčenja opisali pri gekonu [68]. Metoda se najpogosteje uporablja takrat, ko se želimo izogniti stresu pri živalih. Krvosesne stenice *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* in *Dipetalogaster maxima* ponujajo novo in manj invazivno metodo vzorčenja krvi. Omenjene tri vrste se razlikujejo po velikosti in konzumaciji krvi, agresivnosti in dolžini razvoja [8].

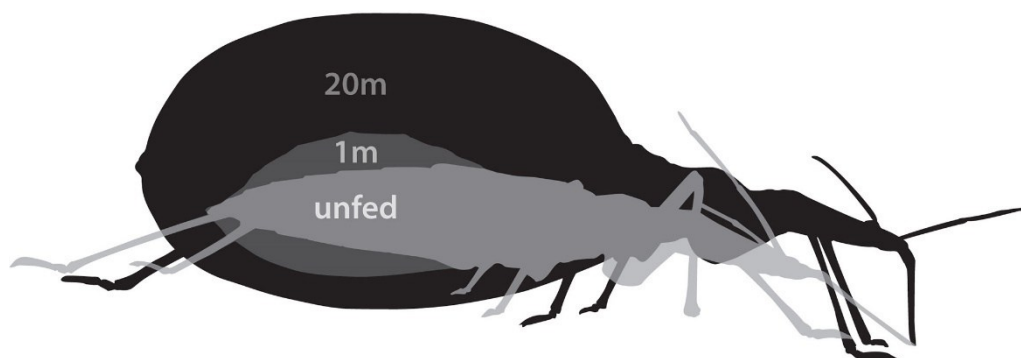
V družini *Reduviidae*, poddružini *Triatominae*, v katero spada tudi *R. prolixus*, je 140 različnih vrst [8]. Živijo predvsem v Srednji Ameriki, na severu do Velikih jezer v ZDA, najjužneje jih najdemo v Argentini. V naravi so krvosesne stenice glavni prenašalci protozoja *Trypanosoma cruzi*, ki pri ljudeh povzroča Chagasovo bolezen [65, 69, 70]. Za namene diagnostike se uporabljajo komercialno gojene stenice, ki so proste patogenov. Najpogosteje se za odvzem krvi uporablja *R. prolixus*, ki je najmanjša vrsta triatomin, odrasli samci in samice dosežejo velikost od 20 do 22 milimetrov. Samice odlagajo jajčeca na liste, papir ali na odrasle živali iste vrste, v nasprotju z drugima dvema vrstama, *T. infestans* in *D. maxima*, ki jajčeca odlagata na zemljo [71]. V obdobju razvoja imajo pet larvalnih faz. Vse razvojne faze se hranijo s sesanjem krvi, običajno teden ali dva po levitvi. V praksi se najpogosteje uporabljajo nimfe pete larvalne stopnje [8].

Razvoj *R. prolixus*, ki poteka pri temperaturi 25 °C in pri 50- do 60-odstotni relativni vlagi, je končan po 56 dneh in poteka preko petih larvalnih oblik (L1–L5): 9 dni L1, 10 dni L2, 10 dni L3, 13 dni L4 in 14 dni L5. Po levitvi, ki sledi hranjenju, stradajoči samci preživijo od 30 do 60 dni in samice od 30 do 40 dni [72]. Pri gojenju se priporoča svetlo/temni dnevni ritem, ki je boljši od popolne teme [8]. Življenjska doba odraslih samcev je od 156 do 167 dni, samic pa od 127 do 207 dni. Za iskanje gostitelja uporabljajo različna čutila. Odrasle živali in larve pritegnejo NH₃ v izločkih nahranjenih stenic, izdihani CO₂ in znoj gostitelja. Na blizu se odzovejo tudi na spremembe v temperaturi [8]. Na sliki 2 prikazujemo razvojni krog krvosesne stenice vrste *R. prolixus* s petimi razvojnimi fazami [73]. Na sliki 3 pa prikazujemo naraščanje velikosti krvosesne stenice pri hranjenju.



Slika 2: Razvojni krog *Rhodnius prolixus* (vir: Kastelic Gal, 2025).

Figure 2: Developmental cycle of *Rhodnius prolixus* (Kastelic Gal, 2025).



Slika 3: Prikaz velikosti *R. prolixus* pred sesanjem, po eni minuti in 20 minutah sesanja krvi (vir: Orchard in sod.) [74].

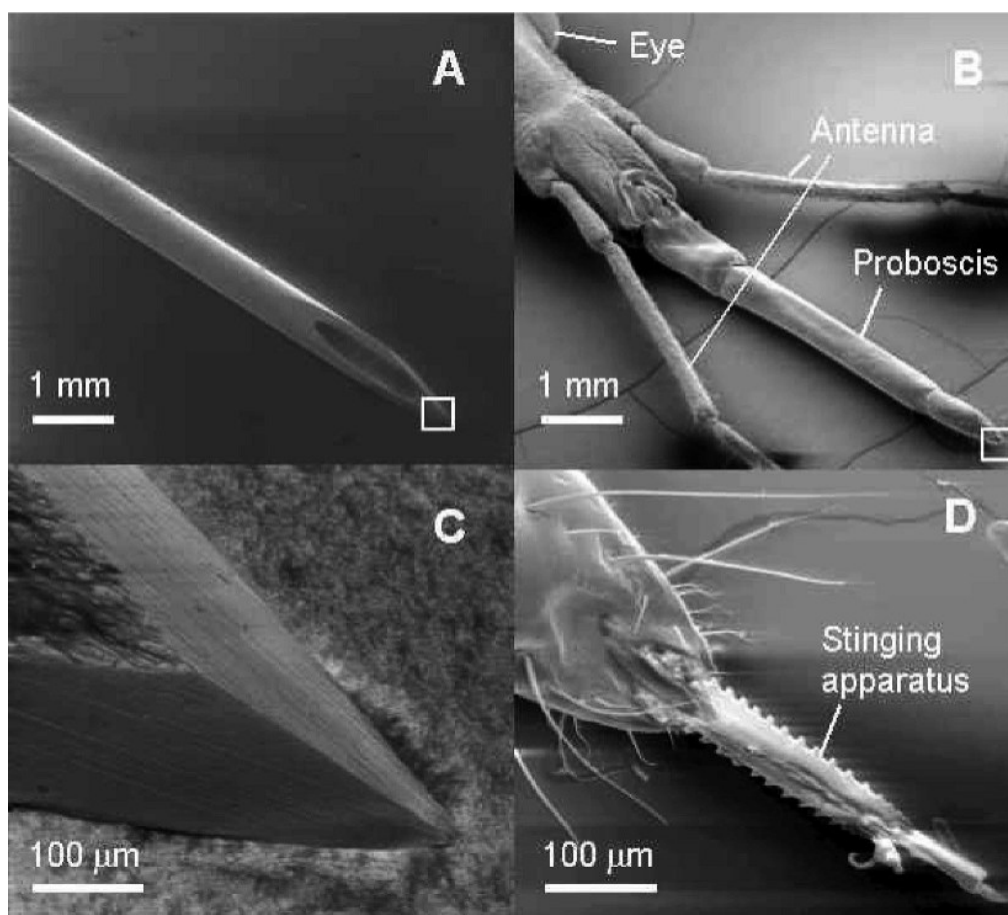
Figure 3: Presentation of *Rhodnius prolixus* size before sucking and after 1 and 20 minutes of sucking blood (Orchard et al., 2021) [74].

Ob sesanju se kri gostitelja zbira v prebavnem traktu stenice, kjer se iz krvi zaradi absorpcije skozi sluznico črevesa izloči vodna frakcija in se zaužita kri koncentrira. Proces se začne po približno 20 minutah, zato je za pravilno vrednotenje rezultatov analize takšne krvi pomemben hiter odvzem krvi iz prebavil stenice [52]. *R. prolixus* ob ugrizu izloča antikoagulant prolixin S, ki zavira koagulacijsko kaskado tako, da preprečuje aktivacijo faktorja VIII. Delovanje prolixina S je zelo kompleksen proces, pri katerem se izločajo tudi histamin in faktorji, ki imajo antiagregacijsko vlogo [75].

Krvosesne stenice se danes najpogosteje uporabljajo v laboratorijih in živalskih vrtovih kot alternativna metoda odvzema krvi za endokrinološke analize. Pri tem je na prvem mestu ugotavljanje koncentracij stresnih hormonov, pomembne raziskave pa so izvedene tudi na področju ugotavljanja metabolitov stresnih hormonov in protiteles proti različnim povzročiteljem bolezni [8]. Način uporabe stenic je odvisen od biologije gostitelja in od tega, ali moramo gostitelja odloviti ali je navajen rokovanja. Če stenice spustimo na žival, jih ob tem lahko izgubimo. Da se to ne zgodi, uporabljamo posodice, pokrite s kovinsko ali bombažno mrežico, ki jih položimo na žival in počakamo, da se stenice napijejo krvi skozi mrežico.

V ta namen lahko uporabljamo tudi posebna ležišča, na katerih so nameščene posodice, nad katerimi leži žival. Pri jemanju krvi pticam se stenice lahko namesti v umetna jajca, ki imajo okenca, prekrita z mrežico, skozi katero lahko stenice sesajo kri ptic med valjenjem [52].

Napiti stenici, ki ob sesanju poveča svojo velikost, se kri odvzame neposredno iz prebavil z injekcijsko iglo 16G. Največja količina krvi, ki jo lahko pridobimo naenkrat, je od 1,1 do 3,8 mililitra [52]. Nimfe posesajo od 3- do 23-kratni volumen svoje mase, odrasle živali pa 1–3-kratni volumen (slika 3) [8].

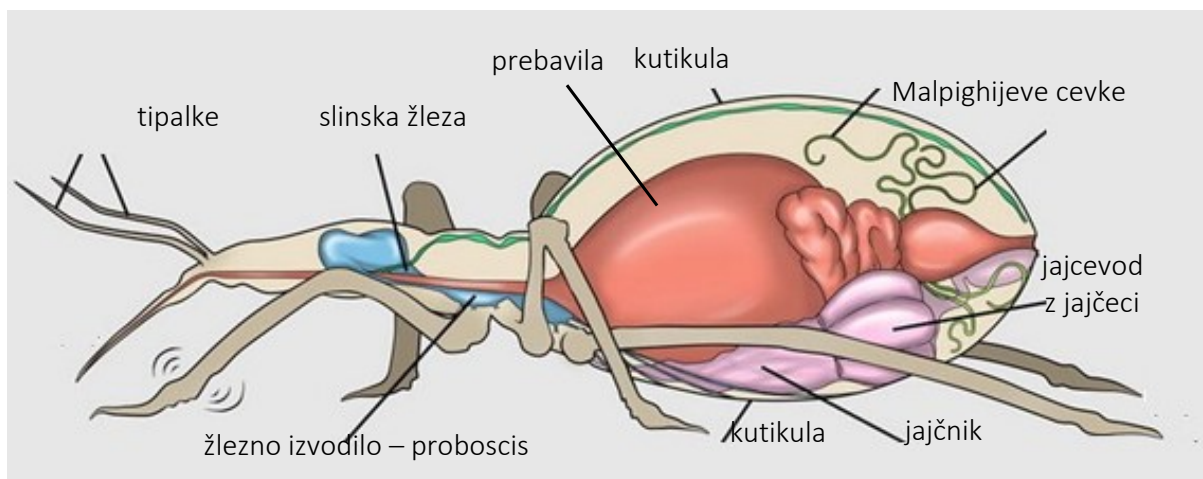


Slika 4: Cevasto iztegljivi ustni del krvosesne stenice vrste *Dipetalogaster maxima* (vir: Voigt, 2006) [76]. Razlaga slike je v besedilu.

Figure 4: *Proboscis of the bloodsucking bug Dipetalogaster maxima (Voigt, 2006) [76]. An explanation of the figure is in the text.*

Slika 4 prikazuje primerjavo med iglo in proboscisem krvosesne stenice. Na sliki so prikazani elektronsko-mikroskopski posnetki injekcijske igle 0,60/30 mm (A, C) vbodnega aparata (B) in konice proboscisa (D) krvosesne stenice vrste *Dipetalogaster maxima*. Sliki A in B sta bili posneti pod 12-kratno, C in D pa pod 200-kratno povečavo. Označeni kvadrati na slikah označuje konico igle (A) oziroma proboscisa (B), ki sta prikazana tudi pri večji povečavi spodaj. Stenica prebode kožo le z vrhom proboscisa, ki je podoben žagi (D), medtem ko je pri uporabi običajne metode vzorčenja krvi v kožo vstavljen celoten premer igle, kot je prikazano na sliki A [76].

Največji prednosti triatominov sta specifična anatomija prebavil in način prebave. Na sliki 5 prikazujemo anatomske položaje organov *R. prolixus* [70]. Sesanje krvi poteka preko proboscisa neposredno iz krvne žile in traja od 5 do 50 minut. Prebavni trakt je enostavna cev, v kateri se kri shrani v zelo raztegljivem želodcu, kjer ostane v bistvu neprebavljena in se koncentrira z izločitvijo tekočine do 45 odstotkov teže posesane krvi v prvih štirih urah [8].



Slika 5: Anatomska zgradba krvosesne stenice *R. prolixus* (vir: Alzogaray, 2022) [70].

Figure 5: Anatomical structure of the bloodsucking bug *R. prolixus* (Alzogaray, 2022) [70].

2.4.6.2 Medicinske pijavke (*Hirudo medicinalis*)

Medicinske pijavke se uporabljajo pri zdravljenju različnih bolezni že tisoče let [77], saj so ljudje verjeli, da je puščanje krvi zdravilo za različne bolezni, od glavobola do protina. V današnjem času se medicinske pijavke uporabljajo npr. pri zdravljenju osteoartritisa, venski blokadi, v plastični kirurgiji in alternativni medicini [14].

Pijavke iz rodu *Hirudo* so krvosesne kolobarnice. Najbolj poznane vrste so *H. medicinalis* (medicinska pijavka), *H. orientalis* (azijska pijavka) in *H. verbana* (madžarska pijavka). Vse tri vrste so ektoparaziti, ki živijo v sladkovodnih ribnikih in počasi tekočih vodah, kjer poiščejo svoj plen (dvoživke in druge vretenčarje) z zaznavanjem toplote, kemičnih substanc ali gibanja. Odzivajo se na nenaravno razburkanje vode in začnejo nagonsko plavati proti viru premikanja vode. Pijavke se pritrdijo na površino telesa gostitelja tako, da prerežejo kožo s stotinami poapnelih zob [78, 79].

Slina pijavke vsebuje več kot 100 različnih biološko aktivnih molekul, ki delujejo protivnetno, protibolečinsko, antikancerogeno, zavirajo razvoj metastaz in degenerativne procese, ekstracelularno pa delujejo tudi protimikrobno [80]. Da je ugriz pijavke minimalno boleč in je zato živali ne poskušajo odstraniti, poskrbi mehanizem v slini pijavke, ki blokira kaskade, vključene v različne stopnje regulacije bolečine preko citokinov [81]. Slina pijavke vsebuje tudi histaminu podobne snovi, ki delujejo kot vazodilatatorji na območju sesanja in hialuronidazo, ki pomaga pijavki prodreti skozi kožo in ji omogoči boljši dostop do krvi. Antikoagulacijsko delovanje sline pijavke je posledica prisotnosti antikoagulantna hirudina, ki zavira delovanje trombocitov in regulacijsko delovanje trombina. Hirudin ima enako antitrombinsko delovanje kot heparin, vendar v veliko manjšem odmerku [80].

Ena glavnih pomanjkljivosti, ki vpliva na uporabnost medicinskih pijavk za vzorčenje krvi, je obsežna krvavitev mesta odvzema zaradi delovanja hirudina in drugih substanc v slini po ekstrakciji pijavke. V humani medicini opisujejo čas krvavitve od 10 ur do 7 dni po odstranitvi pijavke [82]. Po sesanju krvi, ki lahko traja do ene ure, se zaužita gostiteljeva kri v prebavilih pijavke koncentrira zaradi izločanja vode in soli [83].

Preostanek visoko viskozne krvi vsebuje plazemske beljakovine in krvne celice, ki se lahko ohranijo v prebavilih dlje časa, tudi do enega leta [78]. Zato pijavke lahko preživijo do enega leta brez hrane [83].

Odrasle pijavke lahko zaužijejo količino krvi do desetkratnika svoje telesne mase v enem obroku, pri čemer je povprečna prostornina zaužite krvi od 5 do 15 mililitrov [84]. Medicinske pijavke iz družine *Hirudinidae* so potencialno obetavna alternativa invazivnemu jemanju krvi, ker so komercialno dostopne, gostitelja ne vznemirjajo, hranijo se pri širokem razponu temperatur in lahko konzumirajo večje količine krvi [14].

Uporabnost neinvazivnega odvzema krvi z medicinskimi pijavkami je dokazana za epidemiološke preiskave, kar je opisano pri ugotavljanju arbovirusov pri različnih živalskih vrstah. Odvzem krvi z uporabo medicinskih pijavk je pokazal obetavne rezultate. Verjetno je dobra alternativa drugim bolj zapletenim in invazivnim metodam ter lahko zagotovi pomemben napredek pri vzorčenju krvi za preventivno medicino in epidemiološke študije na živalih v živalskih vrtovih [13].

Medicinske pijavke imajo dva priseska, po enega na vsakem koncu. Imenujeta se sprednji in zadnji prisesek. Zadnji se uporablja predvsem za premikanje, medtem ko je sprednji sesalec, ki ga sestavljajo čeljust in zobje, vhodno mesto za hranjenje. Medicinske pijavke imajo trodelno čeljust, ki spominja na žage, na katerih je približno 100 ostrih zob, s katerimi zarežejo gostitelja. Ugriz pusti znamenje, to je obrnjen Y znotraj kroga. Po prebadanju kože pijavke izsesajo kri ob hkratnem vbizgavanju antikoagulanta hirudina [79, 85]. Sesanje krvi poteka s faringealno peristaltiko, ki polni golšo in je ob začetku sesanja 2,4 Hz, proti koncu pa pade na 1,2 Hz. Spodbuja jo serotonin. Ob hranjenju poteka peristaltika tudi na telesu pijavke, saj s tem polni divertikle na golši, ki jih je po 11 na vsaki strani. Količina popite krvi je odvisna od velikosti pijavke, pri enem gramu lastne mase zaužije 8,4 grama krvi. Dolžina hranjenja je odvisna od velikosti pijavke in pri manjših traja dlje časa, v povprečju hranjenje traja 25 minut [83].

2.5 STRES IN STRESNI HORMONI

2.5.1 STRESNI ODGOVOR ORGANIZMA

Klasična teorija stresa, ki jo je objavil Salye [86] v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, opredeljuje stres kot nespecifični odgovor organizma na neki škodljiv oziroma nevaren zunanji dejavnik. Sodobnejše teorije stres opredeljujejo kot učinke najrazličnejših, živih ali neživih dejavnikov, ki lahko povzročajo motnje v homeostazi. Te se lahko kažejo na vseh ravneh organizacije živega organizma od posameznih celic ali tkiv do kompleksnih odgovorov organizma kot celote [87]. Glede na opisano stresno kaskado sestavljajo stresni dejavnik (stresor), stresni odgovor organizma in vidni ali merljivi učinek stresa na delovanje ali vedenje organizma kot posledica stresnega odgovora. Lu in sod. 2021 nadalje opisujejo stres kot spremembo homeostaze, ki vključuje sistemski in lokalni stres. Glede na odziv organizma razlikujemo tri vrste stresa, to so neustrezni stres (*sustres*), dobri stres (*eustres*) in slabi stres (*distres*) [88].

Informacije o stresnem dražljaju, ki jih zaznavajo čutila, se po senzoričnih živčnih vlaknih in prevodnih poteh centralnega živčnega sistema prenašajo v centre skorje velikih možganov, od tam pa preko limbičnega sistema do hipotalamusa, preko katerega sledi stimulacija simpatičnega živčnega sistema in aktivacija hipotalamus-hipofizno-adrenalne osi [53, 89, 90].

Prvi odziv organizma po zaznavi stresorja je aktivacija simpatičnega živčnega sistema, ki sproži izločanje neurotransmitorja noradrenalina iz eferentnih živčnih končičev simpatikusa na sinapsah s ciljnim celicami. Kmalu zatem nastopi še endokrino izločanje adrenalina iz sredice nadledvične žleze kot modificiranega simpatičnega ganglija [53, 89, 90]. Aktivacija simpatičnega živčnega sistema sproži in tudi vzdržuje odziv »boj ali beg«, pri katerem npr. narasteta frekvenca srca in krvni tlak, poveča se pretok krvi skozi pljuča in skeletne mišice, zmanjša pa pretok krvi skozi prebavila, nastopi bronhodilatacija, pospešijo pa se tudi nekateri presnovni procesi (npr. glikoliza in glukoneogeneza).

V naslednji fazi stresnega odziva se aktivira hormonalna os hipotalamus – adenohipofiza – skorja nadledvične žleze. Dražljaji, ki aktivirajo simpatični živčni sistem, hkrati v specializiranih nevronih paraventricularnega jedra v hipotalamusu pospešijo sintezo neuropeptida kortikotropin sproščujočega hormona (*Corticotropin Releasing Hormone; CRH*). CRH se sprošča v hipotalamus-hipofizni portalni krvni sistem in se s krvjo prenese v adenohipofizo, kjer deluje na kortikotropne celice in pospeši sintezo adrenokortikotropnega hormona (ACTH). Ta se sprosti v kri in deluje na snopičasto plast (*zona fasciculata*) skorje nadledvične žleze, kjer stimulira sintezo glukokortikoidnih hormonov (glukokortikoidov) [89, 90].

2.5.2 Vloga glukokortikoidov pri stresnem odgovoru organizma

Glukokortikoidi so steroidni hormoni, ki jih (poleg mineralokortikoidov in androgenov) proizvaja in izloča skorja nadledvične žleze. Glavni glukokortikoidni hormoni so kortizol in kortizon pri večini sesalcev ter kortikosteron pri pticah, glodavcih in plazilcih [91]. Glavni vir sinteze glukokortikoidov je holesterol. Ta je v celicah snopičaste plasti skorje nadledvične žleze shranjen v lipidnih kapljicah, kjer se v velikih količinah nahaja v dostopni estrski obliki [92].

Fiziološko izločanje glukokortikoidov je zelo spremenljivo in pulzirajoče s periodo približno 90 minut pri veliko vrstah, vključno z ljudmi, govedom in ovcami, medtem ko pulzativnost ni jasno vidna pri drugih vrstah, na primer pri prašičih [93, 94]. Sintezo glukokortikoidov urejajo dnevno-nočni ritem osvetlitve in drugi dejavniki, tudi genetski. Pri dnevnih vrstah je najvišja koncentracija glukokortikoidov izmerjena zjutraj in pade zvečer in preko noči, medtem ko je vrh pri nočnih vrstah zvečer in pade zjutraj [93]. Veliko fizioloških funkcij izzove nastajanje glukokortikoidov in te so pomembne za normalno delovanje organizma, rast in obnovo. Koncentracija glukokortikoidov se prehodno poveča po hranjenju in lahko spodbudi zauživanje hrane, v kombinaciji z inzulinom pa tudi deponiranje maščob [95]. Izločanje glukokortikoidov pospešujejo tudi različne oblike stresa in fizična aktivnost [90–94].

Pomembno vlogo pri regulaciji izločanja glukokortikoidov ima negativna povratna zanka, ki poteka preko glukokortikoidnih receptorjev tipa I in II. Preko glukokortikoidnih receptorjev tipa I se regulira bazalna dejavnost HPA, receptor tipa II pa je vključen, ko so koncentracije glukokortikoidov visoke, torej ob stresu. Receptorji tipa I so locirani v hipokampusu in drugih možganskih regijah, receptorji tipa II pa so razširjeni pretežno v hipotalamusu in hipofiznih kortikotropnih celicah [90].

Glukokortikoidi uravnavajo metabolizem ogljikovih hidratov in imajo zato velik učinek na mobilizacijo zaloga energije v telesu z namenom vzpostavitve homeostaze [88]. Njihovo delovanje je usmerjeno v jetrno glukoneogenezo in glikogenolizo ter znižanje izkoriščanja glukoze v ekstrahepatičnih, od inzulina odvisnih tkivih. Stimulirajo tudi mobilizacijo prostih maščobnih kislin iz adipocitov s pretvorbo maščobnih kislin v jetrih v trigliceride in ketone. Sinteza beljakovin je znižana in ob tem poteka tudi razgradnja mišičnih beljakovin na aminokislino za jetrno glukoneogenezo. Povečana koncentracija KORT povzroči zmanjšano občutljivost mišice na inzulin (zmanjšan prehod glukoze skozi sarkolemo), mišično proteolizo in posledično zmanjšanje mišične mase in moči [90, 92]. Na splošno je učinek glukokortikoidov na presnovo ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin nasproten učinku inzulina [92].

Glukokortikoidi delujejo na mobilizacijo glukoze v kroničnih obdobjih povišanih potreb ali pri pomanjkanju vnosa v organizem (stradanje), ko se poveča razgradnja mišičnih beljakovin v aminokislino. Zagotavljajo tudi povečano glukoneogenezo in lipolizo, potrebno za stabilnost organizma prek noči in pri daljšem zmanjšanem vnosu. Pri povečanih potrebah, npr. pri aktivnostih, ko so zaloge jetrnega glikogena porabljene, lahko zmanjšana glukoneogeneza iz aminokislin vodi v pogin zaradi hipoglikemije, če je ob tem tudi zmanjšano izločanje glukokortikoidov [92].

Glukokortikoidi tudi znižujejo raven kalcija v telesu, s tem da zmanjšujejo vnos Ca^{2+} v organizem in pospešujejo njegovo izločanje v ledvicah, tako da zmanjšujejo tubularno reabsorbcijo.

Z zaviranjem sinteze proteinov v osteoblastih glukokortikoidi zavirajo formiranje kosti in s časom povzročijo osteoporozo. Zaradi učinka, nasprotnega vitaminu D, se jih lahko uporablja tudi pri zdravljenju hiperkalcemije ob zastrupitvi z vitaminom D. Povečana količina KORT zavira sintezo kolagena in aktivnost fibroblastov, kar ima za posledico tanjšanje kože. Tanjšanje sten kapilar vodi v njihovo krhkost in podkožne krvavitve, pomanjkanje veznega tkiva pa upočasni celjenje ran [92].

KORT pomaga vzdrževati normalen krvni tlak in volumen tako, da vzdržuje srčno mišico in srčno moč, pomaga vzdrževati odzivnost arteriol na kontraktilno funkcijo kateholaminov (norepinefrin) in angiotenzina II, zmanjša produkcijo vazodilatacijskih prostaglandinov iz endotelija krvnih žil in zmanjša prepustnost žilnega endotelija. Poveča tudi izločanje vode iz telesa s tem, da pomaga vzdrževati glomerulno filtracijo, zavira izločanje vazopresina (antidiuretičnega hormona) in zavira učinke njegovega delovanja v distalnih tubulih ledvic [90]. Deluje tudi glukoneogenetsko v ledvicah, s tem da pretvarja glutamin v glukozo. Poleg tega zniža tudi reabsorpcijo kalcija in fosforja v ledvičnih cevkah [92].

KORT poveča apetit, spremeni razpoloženje, občutenje in vedenje. Poleg tega glukokortikoidi povečajo izkoriščanje glukoze iz perifernih, od insulina odvisnih tkivih, in tako zagotovijo pomembno hranilo za osrednji živčni sistem [92].

Poleg tega, da KORT sodeluje pri razvoju gastrointestinalnega trakta v embrionalnem razvoju, glukokortikoidi povečujejo izločanje solne kisline v želodcu, slabijo mukozno bariero in s tem vodijo k nastajanju razjed in ran na želodcu. Ne samo v ledvicah, tudi v črevesju zavirajo resorbcijo kalcija [92].

Glukokortikoidi povečajo količino eritrocitov, trombocitov in nevtrofilcev v krvnem obtoku. Stimulirajo njihovo nastajanje in upočasnijo odstranjevanje iz obtoka. Nevtrofilci predstavljajo od 50 do 70 odstotkov levkocitov, razen pri govedu, ovci, kozi, prašiču in perutnini, pri katerih je večina limfocitov. Posledica je splošna levkocitoza (nevtrofilija).

Po drugi strani glukokortikoidi znižujejo število limfocitov, eozinofilcev in bazofilcev. Ker znižujejo mitotično aktivnost celic in v njih inducirajo apoptozo, se jih uporablja pri terapiji limfatičnih tkiv (limfom in limfocitna levkemija). Involucija limfatičnih organov vodi tudi do manjše proizvodnje protiteles in citotoksičnega odziva, kar je pomembno pri presaditvah tkiv. Pomembno vplivajo tudi na rast in diferenciacijo številnih tkiv v fazi embrionalnega razvoja. Pri povečani količini glukokortikoidov rast lahko zastane, predvsem zaradi zmanjšane rasti kosti zaradi zaviranja proliferacije osteoblastov [92].

Ker glukokortikoidi zmanjšujejo vnetne reakcije (antiinflamatorni in imunosupresivni učinek), se lahko uporabijo za zdravljenje različnih bolezni. KORT je pomemben za preživetje živali v stresu, ob poškodbah in infekcijah. Veliko obrambnih mehanizmov, ki so vključeni v odziv na te dejavnike, je zavrtih zaradi visoke koncentracije glukokortikoidov. To nasprotje lahko pojasnimo s tem, da so nižje vrednosti KORT pomembne ob začetni presnovi, vnetnem in imunskem odzivu. Ko se vnetje razširi iz lokalnega in začne uničevati okolna zdrava tkiva, povišane vrednosti glukokortikoidov omejijo premočan odziv vnetnega odgovora z inhibicijo vnetnih mediatorjev [90, 96].

Dolgotrajna uporaba glukokortikoidov v medicinske namene lahko privede do: 1.) povečane dovzetnosti za bakterijske, virusne in glivične infekcije in njihovo razširitev po telesu; 2.) upočasnjene celjenja ran; 3.) poslabšanja znakov sladkorne bolezni, osteoporoze in psihičnih motenj; 4.) resnega zaviranja delovanja sprednjega režnja hipofize in s tem manjšega izločanja ACTH in posledično KORT v nadledvični žlezi [92].

Glukokortikoidi se presnavljajo in inaktivirajo v jetrih. KORT se, tako kot ostali steroidni hormoni, metabolizira po približno 60 minutah s cepitvijo dvojne vezi in ketonske oblike, kar zmanjša biološko aktivnost molekule. Posledično se poveča vodotopnost steroidov, ki se tako lahko izločijo z žolčem ali urinom; KORT po 60 minutah in na primer aldosteron po 20 minutah [96].

Ker odziv na stres vključuje povečano sintezo glukokortikoidov, katerih glavni predstavnik pri večini sesalcev je kortizol, se pri ugotavljanju stresa poslužujemo merjenja njegovih koncentracij v različnih medijih. Sinteza glukokortikoidov se lahko poveča tudi kot odziv na zadovoljstvo, vznemirjenje in vzburljenje (*eustres*), v nasprotju z odzivom na strah, tesnobo in bolečino (*distres*). Ko se ocenjuje dobrobit živali, je pogosto premajhen poudarek na normalni, nestresni funkciji glukokortikoidov oziroma na kompleksnem mehanizmu, ki uravnava njihove učinke na organizem [86, 97].

Nekateri raziskovalci sočasno preiskujejo različne glukokortikoide v organizmu in njihov medsebojni vpliv. Ugotavljajo različno izražanje glavnih glukokortikoidov, odvisno od živalske vrste in stresnih dražljajev in prikazujejo mogoče prednosti, ki jih lahko ima merjenje vsaj dveh različnih vrst glukokortikoidov za oceno dobrobiti živali [91].

KORT v solzah pri konju zasledimo že po 60 do 120 minutah. V isti raziskavi so povišano koncentracijo skupnega in prostega KORT v serumu ugotavljali 30 do 180 minut po stimulaciji z ACTH. KORT v serumu in solzah sta se vrnila na izhodiščno koncentracijo po 360 minutah. Sprememba koncentracije KORT v solzah je vezana na spremembe skupnega in prostega kortizola v serumu, čeprav visoka koncentracija KORT v solzah kaže, da je lahko del kortizola v solzah vezan na beljakovine [63]. Produkcija solz in njihov pomen pri divjih prežvekovalcih v ujetništvu sta opisana v Živalskem vrtu Ljubljana [98].

2.5.3 Diagnostika kortizola in drugih glukokortikoidov

Najbolj pogosto se koncentracija KORT ugotavlja v krvi [99]. Tako divje kot domače živali so ob jemanju vzorcev izpostavljene stresu zaradi lovljenja in invazivnih metod vzorčenja. Razvile so se metode, s katerimi lahko ugotavljamo vrednosti tudi v iztrebkih [100], dlaki in perju [99-101], slini [60, 100, 102], urinu [60, 100] in mleku [99, 103, 104]. Novejše raziskave omenjajo tudi solze [62, 63]. Odvisno od tehnike vzorčenja so tudi te metode lahko stresne. Urin, na primer, lahko odvzamemo s kateteriziranjem ali ga zbiramo, ko žival urinira [45].

Podobno lahko vzorce dlake pobereмо iz okolja ali žival predhodno fiksiramo in dlako izpulimo ali odstrižemo [105]. Pri vzorčenju iztrebkov, ki jih praviloma vzorčimo brez vznemirjanja živali, stresna manipulacija odpade [44, 52].

Kljub številnim analitskim metodam, ki so na voljo za določanje koncentracij glukokortikoidov in njihovih metabolitov (kemiluminescenca, luminescentni pomnoževalni test (AlphaLISA), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in LC-MS [91]), se v praksi za kvalitativno in kvantitativno diagnostiko hormonov največ uporabljajo encimsko-imunski testi (EIA oziroma ELISA) in radio-imunski testi (RIA). Ti so dostopni na tržišču in se lahko uporabljajo za določanje steroidov in njihovih metabolitov v krvi, urinu in iztrebkih [106]. KORT lahko ugotavljamo tudi v dlaki, slini, mleku in solzah [41, 62, 63, 107-109].

Analitske metode določanja steroidnih hormonov temeljijo na tekoči obliki vzorca, kar omogoča neposredno analitiko hormonov v krvi (plazma oz. serum), pa tudi urinu, slini in solzah. Za merjenje koncentracij hormonov v kompaktnih (iztrebki, dlaka) ali kompleksnih medijih (mleko) pa moramo analit pred izvedbo merilnega postopka ekstrahirati iz vzorca. Merjenje koncentracije steroidov v iztrebkih je zelo uporabna diagnostična metoda v endokrinologiji, reprodukciji in za določanje ravni dobrobiti, ki zahteva predhodno ekstrakcijo. Za ohranitev in določitev steroidov (kortizol, spolni hormoni) je zelo pomemben način ekstrakcije. Najboljše je mešanje vzorca z metanolom, ki upočasni bakterijski metabolizem in fiksira metabolite, temu pa sledijo postopki ekstrakcije, sušenja in redčenja ekstrakta. Ekstrakcijo lahko izvedemo iz svežih ali posušenih vzorcev, ki so lahko predhodno tudi zamrznjeni [110].

2.6 SPOLNI HORMONI

Ugotavljanje spolnih hormonov pri divjih in prostoživečih živalih je v živalskih vrtovih pomembno pri načrtovanju njihove reprodukcije, predvsem zaradi ugotavljanja trenutnega stanja njihovega spolnega ciklusa (faze pojatvenega ciklusa, brejost), posredno pa tudi zaradi ugotavljanja zdravstvenega stanja in presojanja dobrobiti živali. Pomen sodobnih živalskih vrtov ni več samo v prikazovanju živalskih vrst, ampak vse bolj v razmnoževanju in vračanju ogroženih živalskih vrst v naravo. Ugotavljanje spolnih in stresnih hormonov je pomembno tudi za živali v naravi, s čimer se ugotavlja dobro počutje živali v njihovem naravnem okolju, predvsem v naravnih parkih in tudi zunaj njih [53, 111]. Nazadnje se tovrstna diagnostika s pridom uporablja tudi pri nevarnih in plašnih domačih živalih. Ekstrakcija metabolitov hormonov iz iztrebkov in določanje njihove vrednosti sta pomembna v endokrinologiji, pri izboljšanju reprodukcije in dobrobiti [106].

Spolni hormoni spadajo med steroidne hormone, ki delujejo na androgene in estrogene receptorje vretenčarjev [112]. Iz spolnih žlez, v katerih pri obeh spolih nastajajo v največjih količinah, ter iz placente in skorje nadledvične žleze po krvi potujejo vezani na beljakovinske prenašalce. Ker so topni v maščobah, lahko enostavno vstopajo skozi membrano ciljnih celic z difuzijo [113]. Delimo jih na androgene in estrogene, katerih glavna predstavnika sta testosteron in estradiol, ter na tretjo skupino, ki vključuje progestagene, med katerimi je najpomembnejši progesteron [114].

Testosteron je pomemben za razvoj moških spolnih tkiv, kot so testisi in prostata [115], ter za dozorevanje spermijev in razvoj sekundarnih spolnih znakov, ki se predvsem pri živalih kažejo v spolnem dimorfizmu. Je tudi pomemben anabolni hormon. Estrogeni nastajajo v foliklih na jajčnikih in so odgovorni za razvoj spolnih celic, reprodukcijskih organov in sekundarnih spolnih znakov pri samicah [116]. Progesteron je glavni steroidni hormon, ki ščiti plod v času nosečnosti, izločajo ga rumeno telo na jajčniku, posteljica in skorja nadledvične žleze [117].

2.7 HEMATOLOŠKI IN BIOKEMIČNI PARAMETRI PRI KOZOROGIH

Hematološke in biokemične preiskave omogočajo oceno splošnega zdravstvenega stanja pri živalih. Hematološke preiskave vključujejo analizo števila eritrocitov (RBC), levkocitov (WBC), diferencialno belo krvno sliko z analizo nevtrofilcev (NEU), limfocitov (LYM) in monocitov (MON), ter določanje ravni hemoglobina (HGB), hematokrita (HCT) in eritrocitnih indeksov (MCV, MCH, MCHC). Te preiskave omogočajo podrobno oceno imunskega odziva in morebitne prisotnosti vnetij, dehidracije ali slabokrvnosti pri posameznih kozorogih in natančnejše razumevanje delovanja organov, presnove in splošne homeostaze živali. Primerjalni rezultati z referenčnimi vrednostmi za domače koze so pokazali odstopanja, ki bi lahko kazala na specifične zdravstvene težave ali fiziološke prilagoditve prostoživečih živali.

Hematološke in biokemične preiskave so pomembne za zagotavljanje vpogleda v zdravje in dobrobit živali. Hematološke preiskave omogočajo spremljanje imunskega odziva in morebitnih vnetnih procesov, kar je pomembno pri oceni vpliva stresa, bolezni ali zajedavcev na posamezne živali. Biokemične preiskave pa zagotavljajo informacije o presnovnih procesih in delovanju organov, kot so jetra, ledvice in prebavni sistem. Spremljanje teh parametrov omogoča zgodnje odkrivanje morebitnih bolezni ali odstopanj od normalnega stanja, kar je ključnega pomena za pravočasno ukrepanje in izboljšanje zdravstvenega stanja ter dobrobiti živali. V literaturi ni veliko podatkov o krvnih parametrih, ki bi se nanašali prav na alpske kozorožge [46, 118] oziroma španske – iberske kozorožge (*Capra pyrenaica*) [47, 48, 119].

Za spremljanje zdravstvenega stanja posamezne živali ali črede kozorogov so zelo pomembne hematološke in biokemične vrednosti zdravih živali. Tako lahko prepoznamo morebitna odstopanja in ustrezno ukrepamo. V tabelah 1 in 2 so podani hematološki in biokemični parametri zdravih kozorogov [46-48, 118, 119].

Tabela 1: Hematološki parametri pri kozorogih (*Capra sp.*).

Table 1: Haematological parameters in ibexes (*Capra sp.*).

Krvni parametri	merske enote	vrednosti [118] ¹ <i>Capra ibex</i> N = 36	vrednosti [119] ² <i>C. pyrenaica</i> N = 7	vrednosti [47] ² <i>C. pyrenaica</i> N = 140	vrednosti [48] ² <i>C. pyrenaica</i> N = 26	referenčne vrednosti ^{3 in 4}
hematokrit	%	49,55	44,6	42,8	/	25 – 38³
hemoglobin	g/dl	17,87	16,6	15,8	14,0	8 – 12³
eritrociti (RBC)	10 ⁹ /ml	8,37	20,14	15,88	17,88	8 – 18³
MCV	fl	/	22,33	29,5	23,03	16 – 30³
MCH	pg	/	8,32	10,1	8,02	5,2 – 8³
MCHC	10 ⁶ /ml	/	37,25	34,0	34,52	30 – 36³
levkociti (WBC)	10 ⁶ /ml	7,43	12,5	15,48	14,82	4 – 13³
nevtrofilci	10 ⁶ /ml	/	4,02	/	4,20	1,2 – 8³
nevtrofilci	%	54,32	31,55	38,2	/	30 – 61³
limfociti	10 ⁶ /ml	/	8,16	/	9,69	2 – 9³
limfociti	%	34,64	69,23	55,2	/	50 – 70³
monociti	10 ⁶ /ml	/	0,14	/	0,36	0 – 0,5³
monociti	%	8,45	1,13	1,3	/	0 – 4³
eozinofilci	10 ⁶ /ml	/	0,16	/	0,57	0,05 – 0,6⁴
eozinofilci	%	1,55	1,57	1,8	/	1 – 8⁴
bazofilci	10 ⁶ /ml	/	0,01	/	0,00	0 – 0,12⁴
bazofilci	%	0,18	0,04	/	/	0 – 1⁴

1 alpski kozorogi – *Capra ibex*

2 iberski kozorogi – *Capra pyrenaica*

3 Referenčne vrednosti Zoetis Inc [120].

4 Referenčna vrednost Laboklin [121].

Tabela 2: Biokemični parametri pri kozorogih (*Capra sp.*).**Table 2:** Biochemical parameters in ibexes (*Capra sp.*).

Krvni parametri	merske enote	vrednosti [46] ¹ <i>Capra ibex</i> N = 30	vrednosti [119] ² <i>C. pyrenaica</i> N = 7	vrednosti [47] ² <i>C. pyrenaica</i> N = 140	vrednosti [48] ² <i>C.</i> <i>pyrenaica</i> N = 26	referenčne vrednosti ^{3 in 4}
glukoza	mmol/L	3,34	8,88	7,00*	9,78	2,2 – 21,1 ³
urea (BUN)	mmol/L	/	/	15,86*	3,16	2,5 – 25 ³
holesterol	mmol/L	1,39	/	1,37*	1,36	2,07 – 3,88 ⁴
trigliceridi	mmol/L	1,37	/	0,42*	0,71	0,17 – 0,51 ⁴
skupni bilirubin	μmol/L	/	/	0,01*	3,35	0 – 74 ³
kreatinin	μmol/L	/	150	94,44	175,70	71 – 327 ³
AST	U/L	/	/	235,3	62,88	< 135 ⁴
ALT	U/L	/	13,3	48,4	13,19	6 – 124 ³
ALP	U/L	/	/	588,1	192,38	11 – 1076 ³
alfa-amilaza	U/L	/	/	482,81	/	0 – 63 ³
Y-GT	U/L	/	/	51,0	/	< 63 ⁴
CK	U/L	/	/	748,0	160,69	< 268 ⁴
LDH	U/L	/	/	1509,0	627,73	< 972 ⁴
skupni proteini	g/L	68,02	/	72,0	86,44	46 – 84 ³
albumini	g/L	/	/	47,5	39,91	21 – 46 ³
globulini	g/L	/	/	/	/	18 – 50 ³
natrij	mmol/L	/	142	145,2	154,54	138 – 162 ³
kalij	mmol/L	/	5,9	7,0	/	3,0 – 8,6 ³
klorid	mmol/L	/	/	97,4	114,73	97 – 110 ⁴
kalcij	mmol/L	2,50	/	10,6	/	1,50 – 3,02 ³
fosfor	mmol/L	2,58	7,63	6,9	5,40	1,29 – 5,62 ³
magnezij	mmol/L	/	/	3,0	/	0,8 – 1,0 ⁴
kortizol	ng/ml	21,12**	/	82,5	91,12*	2 – 50 ⁴

1 alpski kozorogi – *Capra ibex*2 iberski kozorogi – *Capra pyrenaica*

3 Referenčne vrednosti Zoetis Inc [120].

4 Referenčna vrednost Laboklin [121].

* Pretvornik merskih enot [122].

** Vzeta je vrednost za maj 1991 [46].

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ŽIVALI

V raziskavo je bilo vključenih 13 samcev in 16 samic (N = 29) alpskega kozoroga (*Capra ibex*) različnih starosti iz Živalskega vrta Ljubljana (slika 7). Kozoroge smo razdelili v tri starostne skupine. V prvi je bilo deset samcev različnih starosti, od enega do 15 let, v drugi je bilo deset samic podobnih starosti kakor samci, v tretji pa je bilo devet mladičev obeh spolov v starosti do enega leta. S tem smo zajeli najširši nabor živali v čredi.

Vzorci smo jemali od leta 2019 do 2022, vsakokrat od julija do oktobra. Vzorčili smo dopoldne, preden se je temperatura okolja zvišala, saj to negativno vpliva na krvosesne stenice, ker prenehajo sesati in začnejo poginjati. Vse vzorce pri posameznem kozorogu smo odvzeli istočasno ob enem posegu. Pri 29 kozorogih smo z vsemi vzorčenji krvi v celotni študiji pridobili 56 vzorcev krvi z venepunkcijo, 29 vzorcev krvi s krvosesnimi stenicami in 23 vzorcev krvi z medicinskimi pijavkami. Odvzeli smo tudi 29 vzorcev sline, 43 vzorcev dlake, 43 vzorcev iztrebkov, šest vzorcev urina in dva vzorca solz. Termine odvzema, vrsto in število vzorcev, odvzetih pri posameznih kozorogih, prikazuje tabela 3.

Vsi kozorogi so živeli v isti obori in zato imeli enake bivalne razmere. Obora za kozoroge v Živalskem vrtu Ljubljana je velika 2000 m². Večji del obore je brežina, obložena z večjimi skalami, ki posnemajo njihov naravni habitat v gorah. V spodnjem delu je veliko pokrito krmišče z jaslami in napajalniki, senco pa jim zagotavlja gozd, ki raste ob ogradi. Preiskovani kozorogi so bili hranjeni s senom ter veliko svežimi vejami listavcev in iglavcev. Kot dodatek so dobivali brikete Grazer, proizvajalca Kasper Fauna Food®, Nizozemska.

Telesno maso samcev smo ocenili na od 30 do 60 kilogramov, samic od 20 do 40 kilogramov, mladičev pa od 10 do 15 kilogramov.

Tabela 3 (nadaljevanje); *Table 3 (continued)*

Zap. št. kozoroga	termin vzorčenja	kri VP	kri KS	kri MP	slina	solze	dlaka	iztrebki	urin
12	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
12	9/2019	1	0	0	1	1	1	1	0
12	8/2021	1	0	0	1	0	1	0	1
12	7/2022	1	0	0	0	0	0	0	0
13	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
13a	9/2019	1	1	1	1	0	1	1	0
13	7/2020	1	1	0	0	0	1	0	0
13	7/2022	1	0	0	0	0	0	0	0
14	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
14a	9/2019	1	1	1	1	0	1	1	0
14	7/2020	1	1	0	0	0	1	0	0
14c	8/2021	1	1	1	0	0	1	0	0
14d	7/2022	1	1	1	0	0	0	0	0
15a	9/2019	1	1	1	1	0	1	0	0
15	7/2020	1	1	0	0	0	1	0	0
16	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
16a	9/2019	1	1	1	0	0	1	1	0
16	7/2020	1	0	0	0	0	1	0	0
17	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
17	9/2019	1	0	0	0	0	1	1	0
17	8/2021	1	0	0	1	0	1	0	0
17	7/2022	1	1	0	0	0	0	0	0
18	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
19	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
19	9/2019	1	0	0	1	0	1	1	0
20	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
20	7/2020	1	1	0	0	0	1	0	0
21	8/2021	1	0	0	1	0	1	0	0
21d	7/2022	1	1	1	0	0	0	0	0
22	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
22	9/2019	1	0	0	1	0	1	1	0
22	8/2021	1	0	0	1	0	1	1	0
22d	7/2022	1	1	1	0	0	0	0	0
23	10/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
23	8/2021	1	0	0	1	0	1	0	0
23d	7/2022	1	1	1	0	0	0	0	0
24	8/2019	0	0	0	0	0	0	1	0
24	9/2019	1	0	0	1	0	1	0	0

Tabela 3 (nadaljevanje); *Table 3 (continued)*

Zap. št. kozoroga	termin vzorčenja	kri VP	kri KS	kri MP	slina	solze	dlaka	iztrebki	urin
25	9/2019	1	0	0	1	0	1	0	0
25	8/2021	1	0	0	1	0	1	1	1
25d	7/2022	1	1	1	0	0	0	0	0
26	9/2019	1	0	0	1	0	1	0	0
27	9/2019	1	0	0	0	0	1	0	0
28	9/2019	1	0	0	0	0	0	0	0
29a	9/2019	1	1	1	1	0	1	0	0
29	7/2020	1	1	0	0	0	1	0	0
SKUPAJ		56	29	23	29	2	43	43	6

Pri dominantnem samcu s številko 1 (letnik 2009) smo uspeli pridobiti tudi vzorce krvne plazme s krvosesnimi stenicami ob neinvazivnem pristopu vzorčenja na posebej za to pripravljenem ležišču (slika 6).



Slika 6: Dominantni samec na ležišču (vir: Kastelic, 2020).

Figure 6: Dominant male in resting place (Kastelic, 2020).

Odvzem krvnih vzorcev z neinvazivno tehniko ob neinvazivnem pristopu na ležišču smo izvedli septembra 2020. Pri tem samcu smo sledili tudi koncentracijo KORT v vseh medijih, odvzetih z invazivno in neinvazivno tehniko odvzema ob invazivnem pristopu, in koncentracijo FGCM v iztrebkih. Dobili smo tudi vzorce njegovih solz. Spolne hormone (testosteron) smo ugotavljali v treh vzorcih krvi (venepunkcija, odvzem s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami), dlaki in iztrebkih.

Zdravstveno stanje skupine smo spremljali v okviru rednih letnih pregledov in vakcinacij, katerih podlaga je podana v Direktivi Sveta 92/65/EEC (BALAI) [123] oziroma od aprila 2021 v Uredbi (EU) 2016/429 («Zakon o zdravstvenem varstvu živali») [35]. Ob pregledih smo živali odlovili, ocenili telesno kondicijo, opravili toaleta parkljev, odvzeli krvne vzorce za redni monitoring na bolezni in vzporedno odvzeli vzorce za ugotavljanje koncentracije KORT v različnih medijih, kar je prikazano v tabeli 6. V okviru monitoringa so bile opravljene parazitološke preiskave iztrebkov pred dehelmintizacijo in tri tedne po njej (slika 7).



Slika 7: Oralna aplikacija antiparazitika (vir: Kastelic, 2019).

Figure 7: Oral application of antiparasitic drug (Kastelic, 2019).

3.2 ODVZETI VZORCI IN NAČIN ODVZEMA

Kozorogom smo za namene ugotavljanja koncentracije hormonov, hematološke in parazitološke preiskave odvzeli vzorce iztrebkov, dlake, solz, sline, urina in krvi. Kri živali smo pridobili na tri različne načine: z venepunkcijo, odvzemom s krvosesi stenicami (*R. prolixus*) in odvzemom z medicinskimi pijavkami (*H. medicinalis*).

3.2.1 Vzorčenje iztrebkov, dlake, solz, sline in urina

Vzorci iztrebkov so bili odvzeti individualno pred načrtovanim letnim pregledom, da bi se izognili vplivom stresa, ki bi ga lahko povzročila odlov in zbiranje drugih vzorcev, na rezultate meritev. Iztrebke smo odvzeli takoj po iztrebljanju določene živali, da bi se izognili zamenjavi vzorcev. Individualne vzorce iztrebkov smo odvzeli v plastične lončke, ki smo jih do analiz shranili v zamrzovalniku (na temperaturi od -20 °C do -24 °C). Vzorce dlake, sline in solz smo jemali med izvedbo letnega pregleda. Vzorce dlake smo odvzeli z britjem neposredno ob koži, pri vseh živalih na istem mestu, pred desno lopatico, na površini $3 \times 3\text{ cm}$ in jih shranili v plastičnih vrečkah. Vzorce sline smo jemali z brisi ustne sluznice (Salivette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Nemčija), solze pa s Schirmerjevimi lističi (Schirmer Tear Test Strips, Eickemeyer®, Tuttlingen, Nemčija). Vse vzorce smo do analiz shranili v zamrzovalnik (od -20 °C do -24 °C). V raziskavi smo podali rezultate za vzorce iz krvi, sline, urina in solz v ng/ml, pri vzorcih dlake in iztrebkov rezultate podajamo v ng/g medija.

Vzorci urina smo ob začetku jemanja, leta 2019, med letnim pregledom poskušali odvzeti s kateterizacijo, vendar urina največkrat nismo uspeli dobiti, ker so kozorogi urinirali že ob lovljenju. Zato smo tehniko odvzema urina leta 2020 spremenili. Vsakega posameznega kozoroga smo po končanem letnem pregledu za 5 do 10 minut zaprli v kovinsko kletko. V tem času je večina kozorogov urinirala na dno kletke, ki smo jo nagnili in urin ulovili v kovinski žleb. Tako ulovljeni urin smo shranili v plastične urinske lončke s prostornino 100 ml (Golias, Kranj, Slovenija) in jih zamrznili (na temperaturo od -20 °C do -24 °C) do analiz.



Slika 8: Skupina kozorogov ob odlovu (vir: Kastelic, 2021).

Figure 8: Group of ibexes being caught (Kastelic, 2021).



Slika 9: Fiksacija živali med vzorčenjem (vir: Kastelic, 2021).

Figure 9: Fixation of animal during sampling (Kastelic, 2021).

3.2.2 Odvzem krvi

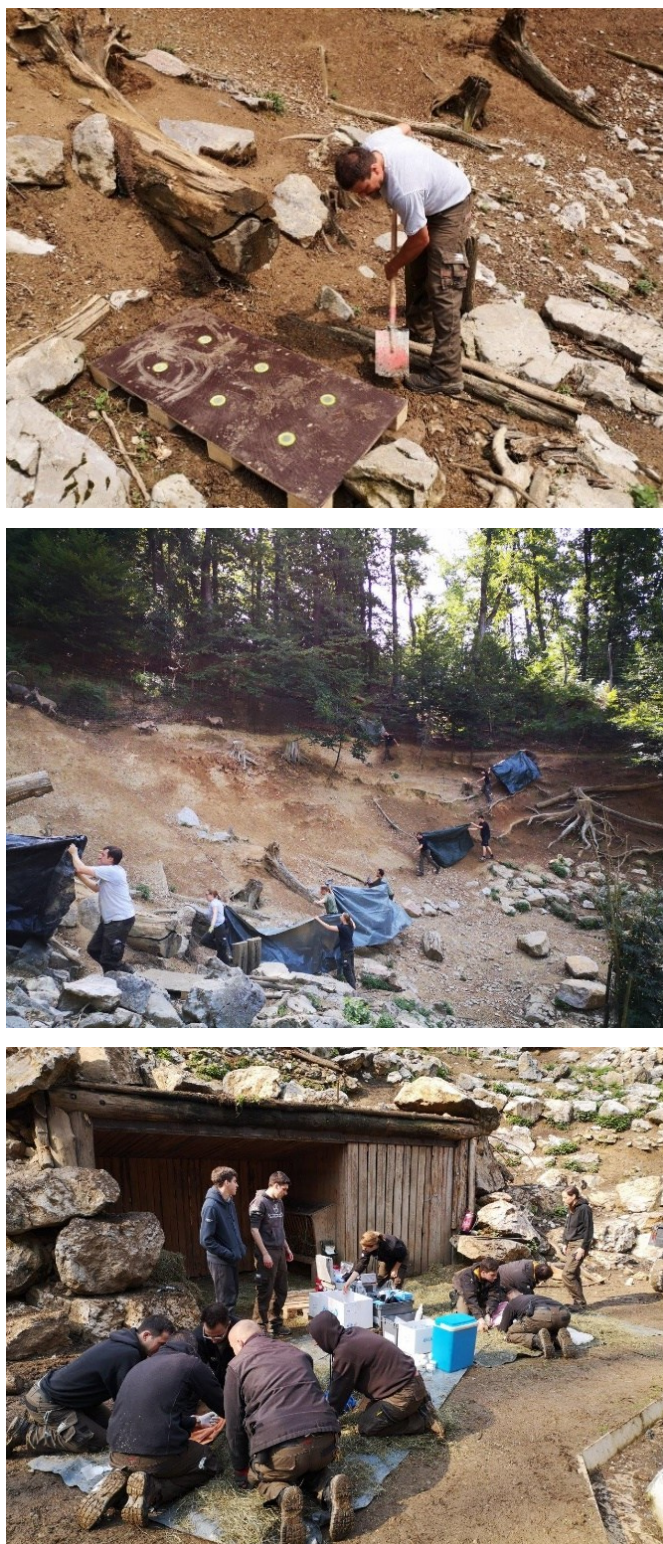
V prvi fazi raziskave smo jemali kri na tri načine: z venepunkcijo (invazivna metoda vzorčenja), s krvosesnimi stenicami (neinvazivna metoda vzorčenja) (sliki 11 levo in 12) in z medicinskimi pijavkami (neinvazivna metoda vzorčenja) (slika 11 desno). Pri posameznem kozorogu smo kri odvzeli istočasno na vse tri načine.

3.2.2.1 Odvzem krvi z venepunkcijo

Vzorci krvi smo jemali med rednimi letnimi pregledi. Hkrati z odvzemom native krvi z venepunkcijo smo odvzeli kri tudi s krvosesnimi stenicami in pijavkami. Iz vene jugularis smo odvzeli 2,0 mililitra krvi. Uporabili smo igle velikosti G18. Za pridobitev krvnega seruma za endokrinološke in biokemične preiskave smo uporabili mikroeprovete z dodanim separatorjem (Becton Dickinson, Heidelberg, Nemčija). Krvni serum smo po ločitvi odpipetirali v mikroeproveto (Ependorf tubes® 5.0 ML, PP with hinged LID, LLG, Nemčija) in ga do analiz shranili v zamrzovalniku (od -20 °C do -24 °C). Za hematološke preiskave smo uporabljali mikroeprovete z dodanim EDTA (Becton Dickinson, Heidelberg, Nemčija). Po centrifugiranju (20 min, 3000 obratov/min) smo vzorce do analiz shranili v zamrzovalniku (od -20 °C do -24 °C).

3.2.2.2 Odvzem krvi s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami

Pri odvzemu krvi s krvosesnimi stenicami smo na enem kozorogu naenkrat uporabili od tri do pet krvosesnih stenic, od katerih smo pridobili 0,5 mililitra krvi. Pri odvzemu krvi z medicinskimi pijavkami smo uporabili srednje velike nehranjene pijavke, s katerimi smo dobili večji volumen krvi kot s stenicami, od 2 do 5 mililitrov. Pri kozorogih telesne mase do 10 kilogramov smo uporabili dve pijavki in pri živalih, težjih od 10 kilogramov, tri pijavke [14]. Stenice in pijavke so bile prisesane 10 minut. Krvno plazmo, pridobljeno iz krvosesnih stenic in medicinskih pijavk smo centrifugirali, odpipetirali v mikroeproveto (Ependorf tubes® 5.0 ML, PP with hinged LID, LLG, Nemčija) in do analiz shranili v zamrzovalniku (od -20 °C do -24 °C).



Slika 10: Vzorčenje na terenu (zgoraj in na sredini – priprava terena; spodaj – fiksacija kozoroga in vzorčenje) (vir: Kastelic, 2021).

Figure 10: Field sampling (top and middle: terrain preparation; bottom: fixation of ibex and sampling) (Kastelic, 2021).

Krvosesne stenice smo pridobili iz Francije (donacija dr. sci. Claudio Lazzari, Univerza v Toursu, Tours, Francija) in jih nato sami gojili in razmnoževali. Nastanjene so bile v steklenih kozarcih, ki so bili pokriti z gazo, pričvrščeno z elastiko, da preprečimo pobeg (omenjena vrsta lahko pleza tudi po stekleni steni). V vsakem kozarcu je bila dodana pokončna valovita lepenka, ki poveča površino kozarca. Nanjo samice odlagajo jajčeca. Gojimo jih na temperaturi od 25 do 30 °C pri 50- do 70-odstotni vlagi in pri 12-urni osvetlitvi. Hranimo jih enkrat mesečno. Gostitelji so kunci. Pri opisanih pogojih se mladiči prve larvalne stopnje izlegajo po 12 do 14 dneh. Za odvzem krvi smo v nalogi uporabljali četrto in peto larvalno stopnjo vrste *R. prolixus* [8]. Postopek odvzema krvi s stenicami je bil izveden v skladu z opisi iz literature [52, 64]. Pred odvzemom vzorcev krvi smo po pet stenic skupaj iz gojitvenih steklenih posod premestili v plastične lončke s prostornino 100 mililitrov (Golias, Kranj, Slovenija) in jih v izolirni posodi iz stiropora prenesli do ograde s kozorogi. Tam smo pred namestitvijo na žival vanje pihnil, da so stenice začutile izdihani CO₂, kar jih je spodbudilo k hranjenju. Na kožo kozorogov smo jih namestili pokrite z lončkom, da niso pobegnile. Ker se stenice hranijo ponoči oz. v temi, smo lonček pokrili s krpo. Hraniti smo jih pustili 10 minut.

Medicinske pijavke smo pridobili iz Velike Britanije (Biopharm, Hendy, South Wales, Velika Britanija). Hranili smo jih v steklenem kozarcu, napolnjenem z vodo in pokritem z gazo, pričvrščeno z elastiko, v hladilniku na 10 °C, kjer so čakale na uporabo. Postopek odvzema krvi je opisan tudi v članku [14], pri čemer smo pijavke ročno aplicirali na kožo gostitelja brez predhodnega britja dlake in jih pokrili z mokro gazo. Čas sesanja je bil povprečno 20 minut, nakar smo z iglo 21G iz pijavke odvzeli krvni vzorec.

Za izvedbo nestresnega pristopa in vzorčenja s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami smo izdelali posebno ležišče. V teoriji lahko živali na ležišče privabimo s priboljškom oziroma se same odločijo, kje bodo počivale. Če izberejo ležišče, sploh ne vedo, da se izvaja odvzem s krvosesnimi stenicami ali medicinskimi pijavkami, ki so predhodno nameščene na ležišču v posebej za to pripravljenem plastičnem lončku. Stenice so zaprte v posebnih posodah, prekritih z mrežico, pri pijavkah je namesto mrežice nameščena posebna opna (Parafilm »M« Laboratory film Bemis, ZDA).



Slika 11: Neinvazivni metodi odvzema krvi: krvosesna stenica (*Rhodnius prolixus*) (levo) in medicinska pijavka (*Hirudo medicinalis*) (desno) (vir: Kastelic, 2021).

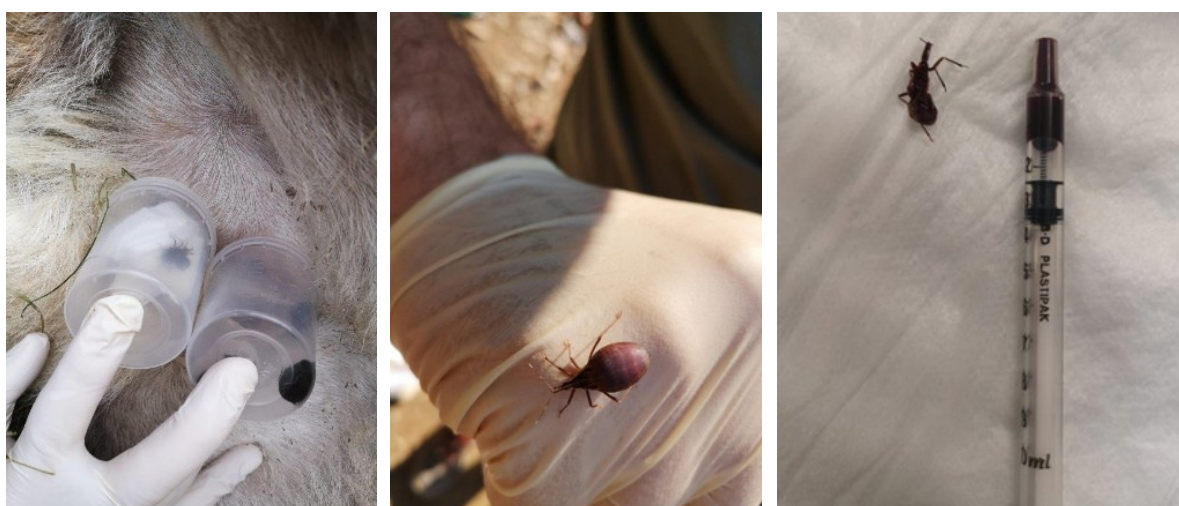
Figure 11: Non-invasive blood collection methods: the bloodsucking bug (*Rhodnius prolixus*) (left) and medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) (right) (Kastelic, 2021).

Pri raziskavi smo ležišča namestili na mesta, ki jih kozorogi najpogosteje uporabljajo za počitek. Ležišče smo namestili pred in po odlovu živali, da ni bilo prisotnih sprememb na vzorcih zaradi stresa pri odlovu. Zaradi socialne strukture v skupini kozorogov in dominantnosti alfa samca je bilo število odvzetih vzorcev s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami omejeno. Uspešen odvzem smo opravili septembra 2020.



Slika 12: Krvosesne stenice v različnih fazah hranjenja: pred sesanjem (zadaj); med sesanjem (na sredini); stenica, ki se je napila krvi (spredaj); proboscis je zapičen, zadek je poln krvi (vir: Kastelic, 2021).

Figure 12: Bloodsucking bugs at different stages of feeding: before sucking (rear); during sucking (middle); a bloodsucking bug that has drunk blood (front); the proboscis is plugged and the rump is full of blood (Kastelic, 2021).



Slika 13: Krvosesne stenice in medicinske pijavke pijejo kri na kozorogu (levo); stenica, napita s krvjo (sredina); vzorec, odvzet stenici (desno) (vir: Kastelic, 2022).

Figure 13: Bloodsucking bugs and medicinal leeches sucking blood on an ibex (left); a bug full of blood (middle); a sample taken from a bug (right) (Kastelic, 2022).

3.3 ANALIZA VZORCEV

3.3.1 Hematološke in biokemične preiskave krvi

Biokemične preiskave vzorcev krvne plazme so bile izvedene takoj po odvzemu krvi v laboratoriju Živalskega vrta Ljubljana po navodilih proizvajalca aparature (Abaxis Europe GmbH, VetScan Analyzer – HM5, Griesheim, Nemčija). Uporabili smo diagnostične kite za biokemične preiskave (Abaxis Europe GmbH, Comprehensive diagnostic profile PN500-1038, Griesheim, Nemčija). Kot referenčne vrednosti smo uporabljali vrednosti za domačo kožo, ki smo jih pridobili iz baze Zoetis Inc (Abaxis) [120].

Določili smo vrednosti za različne hematološke parametre (rdeča krvna slika (RBC) in bela krvna slika (WBC), diferencialna bela krvna slika (nevtrofilci (NEU), limfociti (LYM), monociti (MON)), raven hemoglobina (HGB), hematokrit (HCT), povprečni volumen eritrocitov (MCV), povprečna absolutna koncentracija hemoglobina (MCH), povprečna relativna koncentracija hemoglobina v eritrocitih (MCHC)) in različne biokemične parametre (glukoza, ureo, skupni bilirubin, kreatinin, alanin transaminazo (ALT), alkalno fosfatazo (ALP), amilazo (AMYL), bilirubin (TBIL), ureo (BUN), kreatinin (CREA), glukoza (GLU), proteine (TP), albumine (ALB), globuline (GLOB), natrij (NA⁺), kalij (K⁺), kalcij (CA) in fosfor (PHOS)) (glej pregledni tabeli 15 in 16). Pri izračunih in pretvorbah merskih enot smo uporabili internetno bazo Unitslab [122].

3.3.2 Endokrinološke preiskave

Vse endokrinološke preiskave so bile izvedene v Endokrinološkem laboratoriju Inštituta za predklinično vede na Veterinarski fakulteti UL. Koncentracija KORT v vzorcih krvne plazme, pridobljenih iz vzorcev krvi, odvzetih z venepunkcijo, krvosesiimi stenicami in medicinskimi pijavkami, in koncentracija FGCM ekstraktih iztrebkov sta bili izmerjeni s komercialnim encimsko-imunskim testom Cortisol ELISA (kataloška številka DEH3388, Demeditec Diagnostics, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Za pripravo kalibracijske krivulje so bili uporabljeni standardi 0, 10, 30, 90, 270 in 800 ng analita na mililiter standarda.

Koeficient variabilnosti (CV) je bil 7 odstotkov za nizke (60,9 ng/ml) in 7,2 odstotka za visoke (264,1 ng/ml) koncentracije kortizola. Koncentracija KORT v vzorcih slin, solz, urina in ekstraktov dlake je bila izmerjena s komercialnim encimsko-immunskim testom Cortisol free in Saliva ELISA (kataloška številka DES6611, Demeditec Diagnostics, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Za pripravo kalibracijske krivulje so bili uporabljeni standardi 0, 0,1, 0,4, 1,7, 7 in 30 ng analita na mililiter standarda. Koeficient variabilnosti (CV) je bil 7,1 odstotka za nizke (0,64 ng/ml) in 4,3 odstotka za visoke (4,87 ng/ml) koncentracije kortizola.

Koncentracija testosterona je bila izmerjena v krvi in ekstraktih iztrebkov in dlake, koncentracija estradiola pa le v ekstraktih iztrebkov. Za merjenje koncentracije testosterona smo uporabili komercialni encimsko-immunski test Testosterone ELISA (kataloška številka DE1559, Demeditec Diagnostics, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Za pripravo kalibracijske krivulje so bili uporabljeni standardi 0, 0,2, 0,5, 1, 2, 6 in 16 ng analita na mililiter standarda. Koeficient variabilnosti (CV) je bil 4,16 odstotka za nizke (4,16 ng/ml) in 11,26 odstotka za visoke (11,26 ng/ml) koncentracije testosterona.

Za merjenje koncentracije estradiola smo uporabili komercialni encimsko-immunski test Estradiol ELISA (kataloška številka DEH3355, Demeditec Diagnostics, Nemčija) v skladu z navodili proizvajalca. Za pripravo kalibracijske krivulje so bili uporabljeni standardi 0, 25, 75, 225, 675 in 2000 pg analita na mililiter standarda. Koeficient variabilnosti (CV) je bil 6,4 odstotka za nizke (84 pg/ml) in 3,7 odstotka za visoke (795 pg/ml) koncentracije estradiola. Pri vseh encimsko-immunskih testih smo absorbanco izmerili s fotometrom za mikrotitrsko ploščo Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA) pri 450 nm.

Pred merjenjem koncentracije FGCM z encimsko-immunskim postopkom je potrebna ekstrakcija analita iz dlake oziroma iztrebkov. Za določanje FGCM v dlaki smo odtehtali po 0,2 grama vzorca, ga prenesli v terilnico in prelili s tekočim dušikom, da je zamrznil. Nato smo dlako z ohlajenim pestilom previdno zmleli. Zmleti vzorec smo prenesli v čašo s prostornino 10 ml in sušili dve uri na 40 °C, nato pa ohladili v eksikatorju. FGM je bil ekstrahiran iz 50 mg zmletega vzorca z dodatkom 1,1 ml 55-odstotnega metanola.

Mešanico smo 24 ur stresali pri 400 obratih na minuto (pri 23–25 °C) in nato 20 minut centrifugirali pri 2500 obratih na 22 °C. Ekstrakt smo previdno odpipetirali v novo kriovialo in prepihavali z N₂ na 40 °C. Pred meritvijo smo vzorce rekonstruirali z 0,5 ml PBS pufra. Pri encimsko-immunskih testih smo izmerili koncentracijo FGCM v ng/ml ekstrakta. Za pretvorbo v ng/g dlake smo izmerjene koncentracije pomnožili s faktorjem 10.

Za ekstrakcijo FGCM iz iztrebkov smo odtehtali 0,5 mg vzorca, dodali 0,5 ml destilirane vode in 4 ml absolutnega metanola in stresali na vodoravnem stresalniku 30 minut pri 300 obratih na minuto, nato pa 15 minut centrifugirali na 3000 obratih pri 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo 1 ml metanolne faze prenesli v novo epruveto, dodali 5 ml etra in 0,25 ml 5-odstotne raztopine NaHCO₃, nato pa znova centrifugirali (15 min, 3000 obratov, 4 °C). Organsko fazo ekstrakta smo previdno odpipetirali v novo kriovialo in prepihavali z N₂ na 40 °C do izsušitve. Pred meritvijo smo vzorce rekonstruirali z 0,5 ml PBS pufra. Pri encimsko-immunskih testih smo izmerili koncentracijo FGCM v ng/ml ekstrakta. Za pretvorbo v ng/g iztrebkov smo izmerjene koncentracije pomnožili s faktorjem 10.

3.3.3 Parazitološke preiskave

Preiskave so bile opravljene na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani, kjer so vzorce iztrebkov preiskali z metodo flotacije in sedimentacije ter po metodi Vajda in McMaster. Z metodo sedimentacije smo ugotavljali težka jajčeca digenih sesačev, nematodov in trakulj ter večje oociste kokcidij, ki v navadni vodi posedejo na dno, z metodo sedimentacije pa v nasičeni raztopini NaCl iščemo lahka jajčeca nematodov, trakulj in oociste eimerij, ki priplavajo na površino raztopine. Po metodi McMaster smo ugotavljali količino jajčec glist, trakulj in oocist eimerij, s čimer dobimo vpogled v stopnjo invazije in obremenjenost okolja z zajedavci, po metodi Vajda pa prisotnost pljučnih črvov, pri čemer izkoriščamo termotropizem ličink. Za dehelmentizacijo smo uporabljali oralni antiparazitik Levafas (Norbrook) v odmerku 7,5 mg levamizolijevega klorida in 15 mg oksiklozamida na kilogram telesne mase.

Proti kokcidiozi smo istočasno oralno aplicirali Baycox (Bayer) v odmerku 15 mg na kilogram telesne teže. Intramuskularno smo aplicirali še Ivermectin v odmerku 200 mg na kilogram telesne teže ter 1 ml vitaminov AD3E in 1 ml selena. Postopek je koordiniral usposobljen veterinar živalskega vrta (slike 6 do 8).

3.3.4 Statistična analiza rezultatov

Rezultate smo primerjali individualno in po posameznih skupinah živali (samci, samice, mlade, spolno aktivne, stare živali) in glede na vrsto odvzetega medija (kri, slina, dlaka, urin, solze in iztrebek).

Pri analizi podatkov smo uporabili osnovno opisno statistiko, za testiranje hipotez pa inferenčno statistiko. V rezultatih so od srednjih vrednosti predstavljeni aritmetične sredine in standardni odkloni. Na ta način smo izračunali koncentracijo KORT v različnih kategorijah: po spolu, starosti in času odvzema vzorcev. Zaradi majhnega vzorca in nenormalne porazdelitve podatkov v nekaterih podskupinah smo uporabili neparametrične statistične teste, bodisi Mann-Whitneyjev test, $p < 0,05$ ali Kruskal-Wallisov test, $p < 0,05$, da bi ugotovili statistično značilne razlike med neodvisnimi skupinami (spol, starost, sezonsko vzorčenje). Potem, ko smo z uporabo Kruskal-Wallisovega testa ugotovili pomembne razlike, smo uporabili Mann-Whitneyjevo parno primerjavo z Bonferronijevimi popravljenimi vrednostmi. Poleg tega so bile izračunane velikosti učinkov. V primerih, ko so bili vzorci odvzeti isti živali, je bil uporabljen parni neparametrični test (Wilcoxonov test, $p < 0,05$).

Poleg vrednosti p so podani tudi izračuni velikosti učinka (r). Vrednosti od 0,15 do 0,30 pomenijo nizko velikost učinka, vrednosti od 0,3 do 0,5 pomenijo srednjo velikost učinka, vrednosti nad 0,5 pa pomenijo visoko velikost učinka.

Za vse analize je bil uporabljen Statistični paket za družbene vede (SPSS), različica 26.

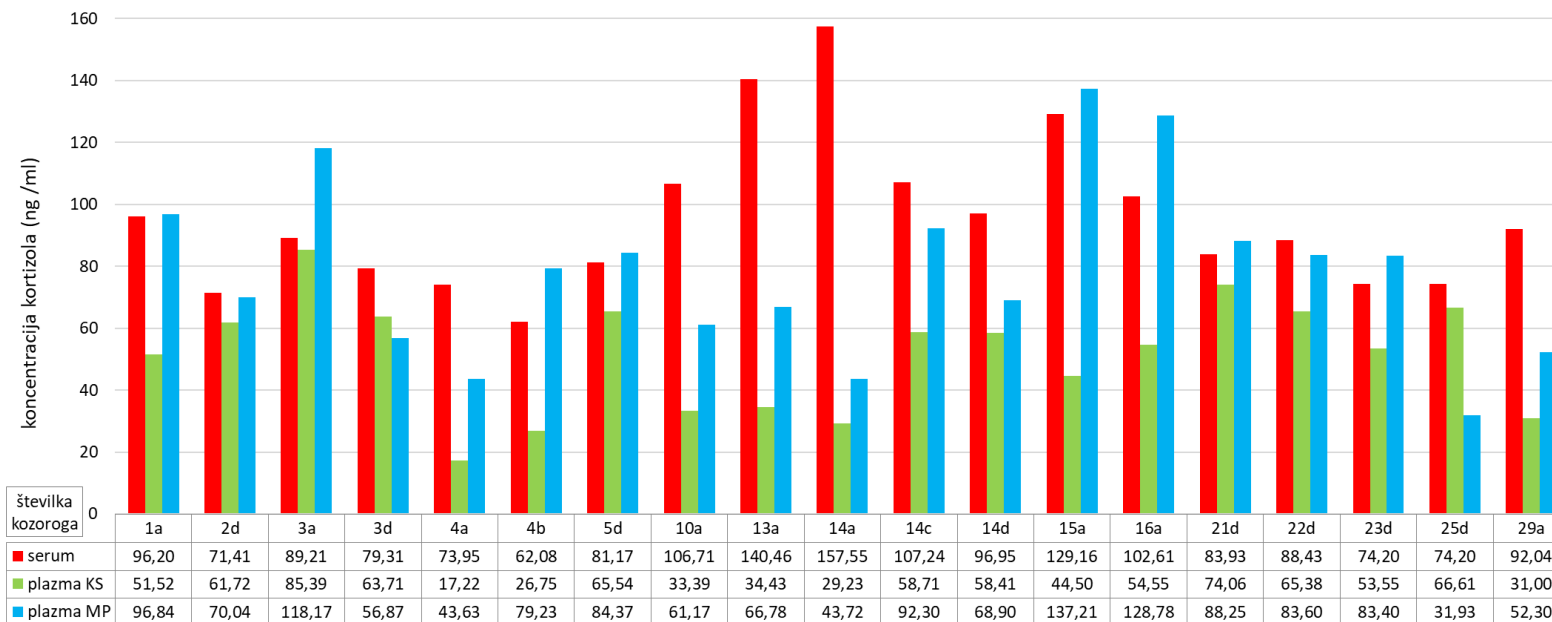
4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA KORTIZOLA V RAZLIČNIH VZORCIH

Koncentracijo kortizola (KORT) smo izmerili v krvnem serumu, pridobljenem iz krvi, odvzete z venepunkcijo, in v krvni plazmi, pridobljeni iz krvi, odvzete s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami. Koncentracijo KORT smo izmerili tudi v slini, dlaki, solzah in urinu, v iztrebkih pa smo izmerili koncentracijo presnovkov kortizola (FGCM).

Pri 15 kozorogih smo odvzeli kri z venepunkcijo, krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami istočasno, ob istem odlovu živali. Med njimi smo pri treh živalih (z zaporednimi številkami 3, 4 in 14) kri na vse tri lahko načine odvzeli večkrat (slika 14). Zato je skupno število rezultatov koncentracij KORT v grafikonu 1 prikazano za 19 vzorcev. Povprečne vrednosti koncentracij kortizola za 19 vzorcev krvi pri 15 kozorogih, ki smo jim kri odvzeli na vse tri načine, so prikazane v tabeli 4.

Prav tako smo v 19 primerih (pri 15 kozorogih) odvzeli slino, dlako in iztrebke istočasno, od tega pri štirih kozorogih (z zaporednimi številkami 2, 3, 5 in 22) večkrat v času raziskave. Koncentracije KORT (vzorci sline in dlake) in FGCM (vzorci iztrebkov) so prikazane na sliki 15.

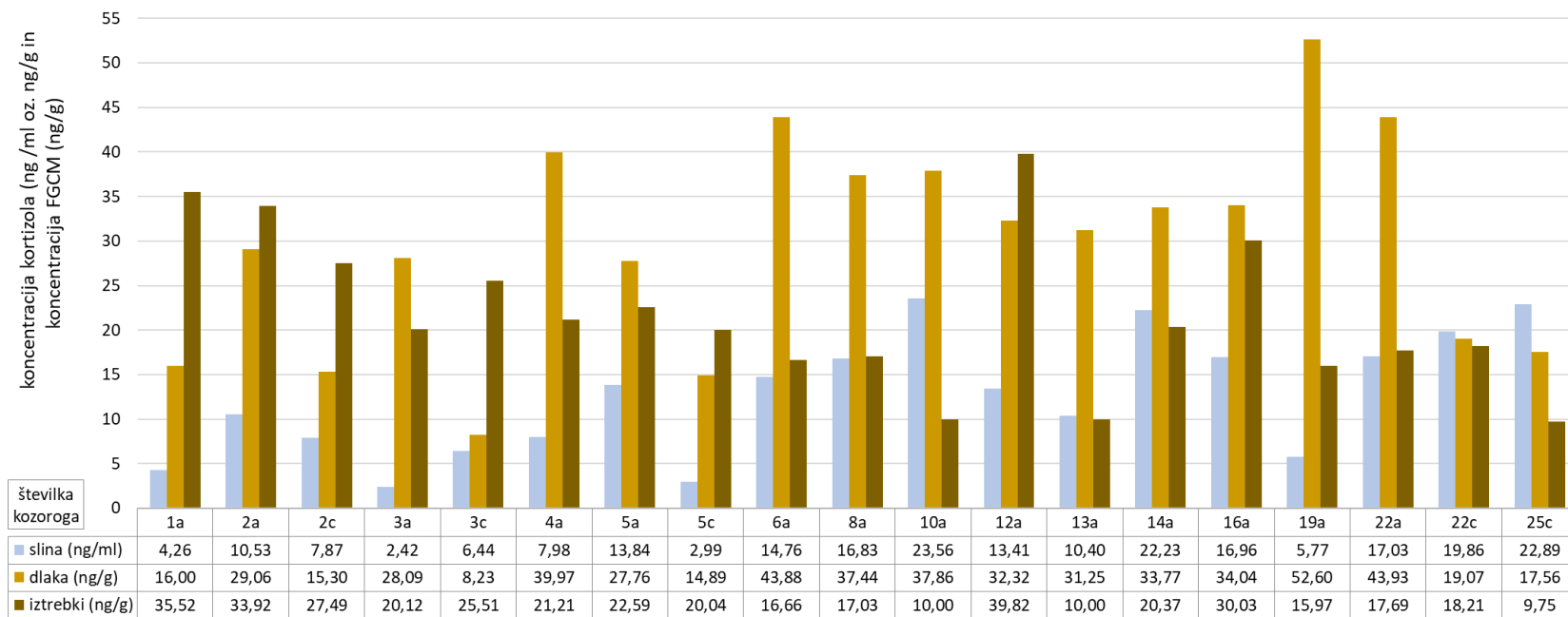


LEGENDA: a = vzorčenje 2019; b = vzorčenje 2020; c = vzorčenje 2021; d = vzorčenje 2022

LEGEND: a = 2019 sampling; b = 2020 sampling; c = 2021 sampling; d = 2022 sampling

Slika 14: Individualne vrednosti koncentracije KORT v vzorcih krvnega seruma oz. plazme, pridobljenih z različnimi načini odvzema krvi (venepunkcija, krvosesne stenice in medicinske pijavke (MP)). Na abscisi so prikazane zaporedne številke vzorcev. Vzorec z oznako 1 pripada dominantnemu samcu.

Figure 14: Individual cortisol concentrations in blood serum or plasma obtained with different blood sampling methods: venipuncture, bloodsucking bugs (KS), and medicinal leeches (MP). The abscissa shows the serial numbers of samples. Sample number 1 belongs to the dominant male.



LEGENDA: a = vzorčenje 2019; c = vzorčenje 2021

LEGEND: a = 2019 sampling; c = 2021 sampling

Slika 15: Individualne vrednosti koncentracije KORT v slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih kozorogov. Na abscisi so prikazane zaporedne številke vzorcev. Vzorec z oznako 1 pripada dominantnemu samcu.

Figure 15: Individual cortisol concentrations in saliva and hair, and FGCM concentrations in faeces of ibexes. The abscissa shows sample serial numbers. Ibex number 1 is a dominant male.

V tabeli 4 so prikazane povprečne vrednosti koncentracij kortizola KORT v vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo, krvosesi stenicami in medicinskimi pijavkami, za vse odvzete vzorce pri vseh preiskovanih kozorogih v primerjavi z vzorci, odvzetimi pri individualnem sledenju, pri katerem smo lahko odvzeli vzorce krvi na vse tri različne načine ob istem vzorčenju (slika 14).

Tabela 4: Povprečna koncentracija KORT v krvnem serumu oz. krvni plazmi, pridobljenima z različnimi načini odvzema krvi (venepunkcija, krvosese stenice in medicinske pijavke), pri vzorčenju celotne skupine (N = 29) in pri individualnem sledenju (N = 19).

Table 4: Mean cortisol concentration in the blood serum or plasma obtained with different methods of blood sampling (venipuncture, bloodsucking bugs, and medicinal leeches) in samples taken from all ibexes (N = 29) and samples of ibexes (n = 19) followed individually.

	vzorčenje celotne skupine			individualno sledenje živali		
	serum ¹ (ng/ml)	plazma KS ² (ng/ml)	plazma MP ³ (ng/ml)	serum ¹ (ng/ml)	plazma KS ² (ng/ml)	plazma MP ³ (ng/ml)
\bar{X}	93,49	52,86	77,04	95,10*	51,35*#	78,29#
SE	3,42	4,21	5,38	5,54	4,08	6,36
min	47,13	15,96	31,93	62,08	17,22	31,93
max	169,48	109,05	137,21	157,55	85,39	137,21
N	56	29	23	19	19	19

Legenda: vzorec, pridobljen z: ¹venepunkcijo; ²krvosesnimi stenicami; ³medicinskimi pijavkami; * $p < 0,001$; # $p < 0,01$

Legend: sample obtained with: ¹venipuncture; ²bloodsucking bugs; ³medicinal leeches; * $p < 0.001$; # $p < 0.01$

Koncentracija KORT v krvnem serumu iz krvi, odvzete z venepunkcijo, je bila od 47,13 do 169,48 ng/ml, v krvni plazmi iz krvi, odvzete s krvosesi stenicami, je bila od 15,96 do 109,05 ng/ml in v krvni plazmi iz krvi, odvzete z medicinskimi pijavkami, od 31,93 do 137,21 ng/ml (slika 14).

Iz tabele 4 je razvidno, da je bila koncentracija KORT v vseh odvzetih vzorcih (za celotno skupino kozorogov) najvišja v vzorcih krvnega seruma, pridobljenih po venepunkciji, sledili so vzorci krvne plazme, pridobljeni z medicinskimi pijavkami, najnižje pa so bile vrednosti v plazmi, pridobljeni s krvosesnimi stenicami. Tudi koncentracija KORT pri individualnem sledenju živali je bila najvišja v vzorcih krvnega seruma, pridobljenih z venepunkcijo, sledili so vzorci krvne plazme, pridobljeni z medicinskimi pijavkami, najnižje pa so bile vrednosti v plazmi, pridobljeni s krvosesnimi stenicami.

Ob primerjavi koncentracij kortizola v krvnem serumu, pridobljenem po venepunkciji, oz. v plazmi po odvzemu z medicinskimi pijavkami in krvosesnimi stenicami med vrednostmi, ugotovljenimi pri vzorčenju celotne skupine in pri individualnem sledenju živali, nismo ugotovili statistično značilnih razlik (tabela 4).

Pri vzporednem odvzemu krvi ob individualnem sledenju živali smo najvišjo povprečno koncentracijo KORT izmerili v vzorcih krvnega seruma iz krvi, pridobljene z venepunkcijo (95,10 ng/ml) in najnižjo koncentracijo (51,35 ng/ml) v vzorcih krvne plazme, pridobljene iz krvi, odvzete s krvosesnimi stenicami, ki sta se statistično značilno razlikovali ($p < 0,001$; Wilcoxon: $Z = -3,823$) (slika 14 in tabela 4). Povprečna koncentracija KORT v vzorcih krvne plazme iz krvi, pridobljene z medicinskimi pijavkami, je bila 78,29 ng/ml. V primerjavi s koncentracijo v krvnem serumu nismo ugotovili statistično značilne razlike ($p > 0,05$, Wilcoxon: $Z = -1,650$). Po drugi strani je bila ugotovljena statistično značilna razlika v koncentraciji KORT med plazmo iz krvi, pridobljene s krvosesnimi stenicami, in z medicinskimi pijavkami ($p < 0,01$, Wilcoxon: $Z = -3,179$) (slika 14 in tabela 4).

Največji razpon individualnih koncentracij KORT med najmanjšo in največjo izmerjeno vrednostjo (*min/max*) smo ugotovili v krvni plazmi iz krvi, pridobljene z medicinskimi pijavkami (od najmanj 31,93 ng/ml do največ 137,21 ng/ml), najmanjši pa je bil razpon vrednosti v krvni plazmi iz krvi, pridobljene s krvosesnimi stenicami (od najmanj 17,22 ng/ml do največ 85,39 ng/ml) (slika 14 in tabela 4).

V tabeli 5 so prikazane koncentracije KORT v slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih v vseh odvzetih vzorcih celotne skupine in vzorcih, kjer smo živali lahko sledili individualno, saj smo lahko odvzeli vzorce krvi na vse tri različne načine ob istem vzorčenju (slika 15).

Tabela 5: Povprečna koncentracija KORT v slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih v vseh vzorcih, odvzetih pri preiskovanih kozorogih (N = 29), in v vzorcih kozorogov (N = 19), ki smo jih sledili individualno.

Table 5: Mean cortisol concentration in saliva and hair, and FGCM in faeces in all samples taken from ibexes investigated (n = 29) and samples of ibexes (n = 19) followed individually.

	vzorčenje celotne skupine			individualno sledenje živali		
	slina (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)	slina (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)
\bar{X}	12,63	27,40	22,59	12,63	29,63	21,68
SE	1,10	1,90	1,51	1,52	2,66	1,91
min	2,40	7,77	9,75	2,42	8,23	9,75
max	23,56	68,19	48,67	23,56	52,60	39,82
N#	29*	43*	43*	19	19	19

Legenda: #število vzorcev; *isto žival smo vzorčili večkrat

Legend: #number of samples; *the same animal was sampled several times

Iz tabele 5 je razviden razpon izmerjenih koncentracij (največja in najmanjša izmerjena vrednost). Največji razpon vrednosti smo ugotovili za KORT v dlaki (od 8,23 ng/g do 52,60 ng/g). Iz tabele 5 lahko razberemo tudi, da so razlike med koncentracijami pri vzorčenju celotne skupine (N = 29) in ob individualnem sledenju živali (N = 19) minimalne in statistično neznačilne. Koncentracija KORT v slini (tabela 5) je bila v vseh analiziranih vzorcih nižja kot v vzorcih, pridobljenih iz krvi (tabela 4).

Povprečna koncentracija KORT v urinu je znašala 126,12 ng/ml (šest vzorcev) in v solzah 13,28 ng/ml (dva vzorca). Vzorcev urina in solz nismo primerjali z ostalimi vzorci, ker je bilo število odvzemov premajhno.

V tabeli 6 prikazujemo koncentracijo KORT pri dominantnem samcu v krvnem serumu, pridobljenem po venepunkciji, in krvni plazmi iz krvi, odvzete s krvosesnimi stenicami in medicinskimi pijavkami, v slini in dlaki. Vzorce smo pridobili z invazivno tehniko. Z neinvazivno tehniko pa smo pridobili le vzorce krvi s krvosesnimi stenicami (na ležišču) in vzorce iztrebkov.

Tabela 6: Primerjava koncentracije KORT (oz. FGCM v iztrebkih) v vzorcih, pridobljenih z invazivno tehniko, z vzorci, pridobljenimi z neinvazivno tehniko (na ležišču), pri dominantnem samcu.

Table 6: Comparison of cortisol (or FGCM levels in faeces) in samples obtained by invasive technique with samples obtained by non-invasive technique (on a bed) from a dominant male.

	venepunkcija ¹ (ng/ml)	stenice ² (ng/ml)	pijavke ³ (ng/ml)	slina (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)
invazivni pristop	96,20	51,52	96,84	4,26	16,00	NN
neinvazivni pristop	NN	1,05	NN	NN	NN	35,52

Legenda: vzorec, pridobljen z ¹venepunkcijo; ² krvosesnimi stenicami; ³ medicinskimi pijavkami; NN: vzorčenje ni izvedljivo, ker je pristop k odvzemu invaziven

Legend: sample obtained with ¹ venipuncture; ² bloodsucking bugs; ³ medicinal leeches; NN: sampling is not feasible because the sampling technique is always invasive

Pri dominantnem samcu je bila koncentracija KORT v plazmi, pridobljeni s krvosesnimi stenicami, pri neinvazivnem pristopu na ležišču veliko nižja kot pri enakem odvzemu krvi ob invazivnem pristopu z lovljenjem. V krvnem serumu, pridobljenem iz krvi po venepunkciji, in krvni plazmi, pridobljeni iz krvi, odvzete z medicinskimi pijavkami, pa smo izmerili primerljivi vrednosti koncentracije kortizola (tabela 6).

4.2 KONCENTRACIJA KORTIZOLA IN FGCM V RAZLIČNIH VZORCIH GLEDE NA SPOL IN STAROST KOZOROGOV IN LETNI ČAS ODVZEMA

Koncentracijo kortizola v vzorcih glede na spol kozorogov (samci, samice), starost (manj kot 10 mesecev, od 11 mesecev do 10 let, nad 10 let) in letni čas odvzema (poletje, jesen) prikazujemo v tabelah 5 do 7.

Tabela 7: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na spol kozorogov.

Table 7: Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM by sex of ibexes.

Statistični parameter	spol	krvni serum ¹ (ng/ml)	slina (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)
\bar{X}	samci	89,71	10,12	25,98	23,66
SE		4,81	1,63	2,47	2,11
N		25	15	20	22
\bar{X}	samice	96,53	15,32	28,64	21,47
SE		4,89	1,30	2,90	2,26
N		31	14	23	21
Z^2		-1,39	-2,27	-0,44	-0,91
<i>p</i>		0,164	0,023	0,661	0,362
velikost učinka (<i>r</i>)		0,19	0,42	0,07	0,14

Legenda: ¹vzorec, pridobljen z venepunkcijo; ²Z – standardizirana U vrednost Mann-Whitneyevega testa

Legend: ¹sample obtained with venipuncture; ²Z = standardized U value of the Mann-Whitney test

Koncentracija KORT je bila v krvnem serumu, slini in dlaki večja pri samicah kot pri samcih, koncentracija FGCM v iztrebkih pa je bila pri samcih večja kot pri samicah (tabela 7). Vendar je bila statistično značilna razlika v koncentraciji KORT med samci in samicami ugotovljena le v slini ($p < 0,05$). Čeprav med spoloma v krvnem serumu, pridobljenem z venepunkcijo, nismo odkrili statistično pomembnih razlik ($p > 0,05$), pa izračunana, sicer nizka velikost učinka nakazuje na mogoče razlike med spoloma pri tovrstnem načinu vzorčenja (tabela 7).

Tabela 8: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na starost kozorogov.

Table 8: Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM, by age of ibexes.

Statistični parameter	starost	krvni serum ¹ (ng/ml)	slina (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)
\bar{X}	< 10 mes	78,08	15,14	31,05	17,56*
SE		4,81	1,90	4,20	2,40
N		16	10	13	11
\bar{X}	11 mes– 10 let	94,26	11,71	25,64	23,09
SE		24,32	5,17	11,95	9,30
N		27	14	19	20
\bar{X}	> 10 let	110,85	10,20	26,14	26,38
SE		7,19	3,76	3,12	3,38
N		13	5	11	12
H_i^2		12,94	2,96	1,21	4,88*
df		2	2	2	2
p		0,002	0,228	0,546	0,087

Legenda: ¹vzorec, pridobljen z venepunkcijo; H_i^2 – statistika Kruskal-Wallisovega testa, df – stopinje prostosti

Legend: ¹sample obtained with venipuncture; H_i^2 = Kruskal–Wallis test statistic, df = degrees of freedom

V serumu, pridobljenem z venepunkcijo, so bile izmerjene statistično značilne razlike ($p < 0,01$) v koncentracijah KORT med tremi starostnimi skupinami kozorogov. Pri slini, dlaki in iztrebkih med skupinami nismo ugotovili statistično pomembnih razlik. Čeprav pri vrednostih za iztrebke Kruskal-Wallisov test ni pokazal statistično pomembnih razlik, pa smo z uporabo parnih Mann-Whitneyjevih primerjav z Bonferronijevimi popravljenimi vrednostmi p ugotovili statistično značilno razliko v vrednostih med kozorogi, mlajšimi od desetih mesecev in starejšimi od desetih let ($Z = 21,89$, $p = 0,001$). Izmerjene vrednosti pri starejših živalih so bile višje od tistih, ki smo jih pridobili pri mladih živalih (tabela 8).

Tabela 9: Koncentracija KORT v krvnem serumu, slini in dlaki oziroma FGCM v iztrebkih glede na letni čas odvzema (poletje in jesen).

Table 9: Cortisol concentration in blood serum, saliva, and hair, and faecal FGCM, by season (summer and autumn).

Statistični parameter	letni čas	krvni serum ¹ ng/ml	slina ng/ml	dlaka ng/ml	iztrebki ng/g
\bar{X}	poletje	88,43	12,61	19,24	23,18
<i>SE</i>		3,35	2,05	1,68	1,88
N		34	11	22	24
\bar{X}	jesen	101,30	12,64	35,95	21,86
<i>SE</i>		6,87	1,40	2,36	2,50
N		22	18	21	19
Z		-1,80	0,02	-4,52	-0,43
p		0,073	0,982	< 0,001	0,668
r		0,24	< 0,01	0,69	0,07

Legenda: ¹vzorec, pridobljen z venepunkcijo; ²Z – standardizirana U vrednost Mann-Whitneyevega testa

Legend: ¹sample obtained with venipuncture; ²Z = standardized U value of the Mann-Whitney test

Koncentracija kortizola v krvnem serumu in slini je bila jeseni višja kot poleti, koncentracija FGCM v iztrebkih pa je bila jeseni nižja kot poleti (tabela 9). Statistično značilna je bila razlika med koncentracijo KORT v dlaki poleti in jeseni ($p < 0,001$). Med koncentracijo KORT v vzorcih, odvzetih poleti in jeseni, in vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo, slino in iztrebki (FGCM), nismo ugotovili statistično pomembnih razlik. Čeprav razlika v vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo, ni bila statistično značilna ($p = 0,073$), izračun velikosti učinka ($r = 0,24$) nakazuje na mogoče razlike med preiskovanimi kozorogi glede na letni čas (tabela 9).

4.3 VPLIV INVADIRANOSTI Z NOTRANJIMI ZAJEDAVCI NA STRES ŽIVALI

V tabelah 10 in 11 prikazujemo rezultate parazitoloških preiskav (sedimentacija, flotacija ter metodi Vajda in McMaster) pred dehelmintizacijo in tri tedne po njej.

Tabela 10: Rezultati parazitoloških preiskav pred dehelmintizacijo (N = 22).

Table 10: Results of parasitological examinations before deworming (n = 22).

Vrste zajedavcev	št. pozitivnih vzorcev	EPG ¹ (min / max)	OPG ² (min / max)
Strongylidae	20	50 / 1050	/
<i>Eimeria sp.</i>	22	/	100 / 627200
<i>Capillaria sp.</i>	1	50	/

Legenda: ¹število jajčec na gram; ²število oocist na gram

Legend: ¹Eggs per gram; ²Oocysts per gram

Tabela 11: Rezultati parazitoloških preiskav po dehelmintizaciji (N = 28).

Table 11: Results of parasitological examinations after deworming (n = 28).

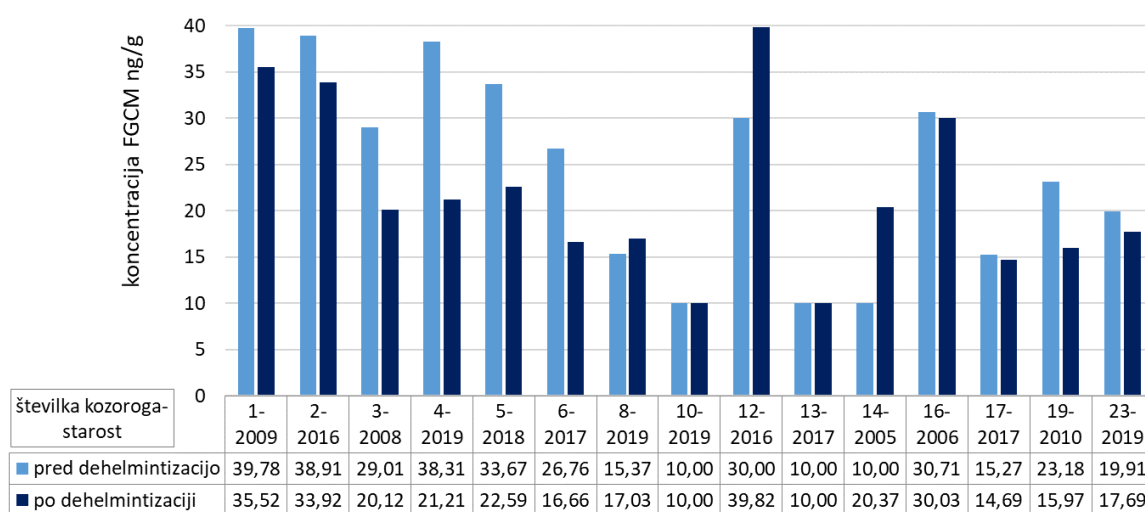
Vrste zajedavcev	št. pozitivnih vzorcev	EPG ¹ (min / max)	OPG ² (min / max)
Strongylidae	8	50 / 150	/
<i>Eimeria sp.</i>	28	/	50 / 1300
<i>Capillaria sp.</i>	0	/	/

Legenda: ¹število jajčec na gram; ²število oocist na gram

Legend: ¹Eggs per gram; ²Oocysts per gram

Dehelmintizacija je bila uspešno izvedena, kar kažejo rezultati parazitoloških preiskav po opravljeni dehelmintizaciji (tabela 11) v primerjavi z rezultati pred njo (tabela 10). Pred zdravljenjem so bili vsi pregledani kozorogi pozitivni na *Eimeria sp.* Po zdravljenju smo pregledali šest kozorogov več, ker so se skotili novi mladiči. Tudi takrat so bili vsi kozorogi pozitivni, vendar je bilo število oocist na gram (OPG) veliko nižje kot pred zdravljenjem.

Na sliki 16 in v tabeli 12 prikazujemo individualne koncentracije FGCM v korelaciji s stopnjo invadiranosti z endoparaziti. Iztrebke smo odvzeli pred dehelmintizacijo (slika 16) in tri tedne po njej pri 15 izbranih kozorogih, ki smo jih sledili individualno. Dehelmintizacijo smo izvedli ob rednem letnem pregledu pri vseh živalih kot redni protokol letne preventive z enakimi antiparazitiki.



Slika 16: Individualna koncentracija FGCM (ng/g) v iztrebkih pred dehelmintizacijo (avgust) in po njej (september).

Figure 16: Individual concentration of FGCM (ng/g) in faeces before deworming (August) and after (September).

Pri osmih samcih (št. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 in 10) so bile koncentracije FGCM pred dehelmintizacijo višje kot po njej, razen pri samcu številka 8, pri katerem je bila vrednost minimalno povečana. Pri dveh brejih samcih so bile koncentracije FGCM pred dehelmintizacijo nižje kot po njej, pri ostalih pa so bile vrednosti po dehelmintizaciji minimalno znižane. Pet kozorogov (št. 4, 5, 8, 10 in 23) so mlajše živali (letnika 2018 in 2019). Kozorog z zaporedno številko 1 je dominantni kozorog.

Tabela 12: Koncentracija FGCM (ng/g) v iztrebkih pred dehelmintizacijo in po njej.

Table 12: Concentration of FGCM (ng/g) in faeces before and after deworming.

Statistični parameter	obdobje	mladi ¹ (N = 5)	stari (N = 10)	vsi (N = 15)
\bar{X}	pred dehelmintizacijo (avgust)	23,45	25,36	24,73
SE		5,40	3,39	2,79
\bar{X}	po dehelmintizaciji (september)	17,70	23,71	21,71
SE		2,19	3,24	2,35
Z^2		1,461	0,770	1,572
p		0,144	0,441	0,116
r		0,65	0,24	0,41

Legenda: ¹letnika 2018 in 2019; Z^2 – standardizirana U vrednost Mann-Whitneyevega testa

Legend: 1 = year of birth 2018 and 2019; Z^2 = standardized U value of the Mann-Whitney test

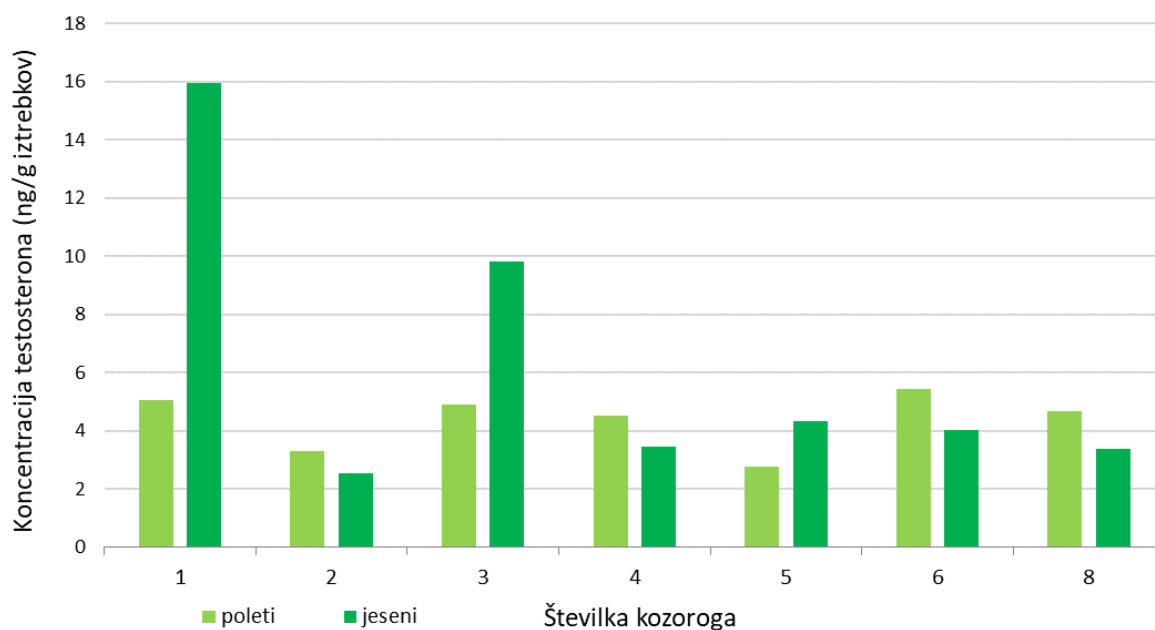
Ob primerjavi koncentracije FGCM pred dehelmintizacijo in po njej nismo ugotovili statistično pomembnih razlik v celotni skupini ($p > 0,05$). Ugotovili smo različne vrednosti med mladimi (letnika 2019 in 2018; N = 5) in starimi živalmi. Pri mladih živalih je bila vrednost $p = 0,144$, pri starih pa $p = 0,441$. Vrednosti r nakazujejo na razlike. Pri mladih živalih smo dobili visoko velikost učinka ($r = 0,65$), pri starih nizko velikost učinka ($r = 0,24$), pri celotni skupini pa srednjo velikost učinka ($r = 0,41$) (tabela 12).

4.4 KONCENTRACIJA KORTIZOLA IN FGCM V KORELACIJI S SPOLNIMI HORMONI

V raziskavi smo ugotavljali koncentracijo spolnih hormonov (testosterona in estradiola) poleti in jeseni ter njuno korelacijo s KORT oziroma FGCM. Rezultate prikazujemo na slikah 17 in 18 in v tabelah 13 in 14.

4.4.1 Koncentracija kortizola in FGCM v korelaciji s koncentracijo testosterona

Na sliki 17 prikazujemo individualno koncentracijo testosterona v iztrebkih, vzorčenih poleti in jeseni, pri sedmih samcih kozoroga.



OPOMBA: Kozorog z zaporedno številko 7 ni bil vključen v preiskavo.

Slika 17: Individualna koncentracija testosterona v iztrebkih sedmih samcev poleti in jeseni (1 – dominantni kozorog).

Figure 17: Individual faecal testosterone concentrations in seven males in summer and autumn (1 = dominant male).

S slike 17 je razvidno, da je bila koncentracija FGCM pri kozorogu št. 1 (dominantnem kozorogu) najvišja jeseni. Koncentracija kortizola je bila tudi pri kozorogu št. 3 (drugorangirani samec) jeseni višja kot poleti. Pri ostalih kozorogih so bile tako jeseni kot poleti koncentracije FGCM nizke, razlike med poletnimi in jesenskimi koncentracijami pa majhne.

Tabela 13 prikazuje povprečne, najnižje in najvišje koncentracije FGCM in testosterona pri sedmih samcih.

Tabela 13: Povprečna koncentracija FGCM v iztrebkih in testosterona v serumu pri sedmih samcih poleti in jeseni.

Table 13: Mean FGCM in feces and serum testosterone concentrations in seven males in summer and autumn.

Statistični parameter	FGCM (ng/g)		testosteron (ng/ml)	
	poleti	jeseni	poleti	jeseni
\bar{X}	31,69	23,86	4,37	6,21
SE	3,32	2,92	0,37	1,86
min	15,37	16,66	2,75	2,53
max	39,78	35,52	5,53	15,95

Povprečna koncentracija FGCM v iztrebkih pri sedmih samcih je bila poleti 31,69 ng/g in jeseni 23,86 ng/g; razlika ni bila statistično značilna. Povprečna koncentracija serumskega testosterona pri sedmih samcih je bila 4,37 ng/ml poleti in 6,21 ng/ml jeseni; razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$). Korelacija med koncentracijo FGCM v iztrebkih in koncentracijo testosterona v serumu ni bila statistično dokazana ($p > 0,05$) (slika 17 in tabela 13).

Jeseni smo pri sedmih samcih poleg koncentracije testosterona v iztrebkih ugotavljali tudi koncentracijo testosterona v serumu (venepunkcija) in dlaki. Rezultati so prikazani v tabeli 14. Vzorci iztrebkov, krvi in dlake so bili pri vsakem kozorogu odvzeti med istim vzorčenjem.

Tabela 14: Individualna in povprečna koncentracija FGCM, KORT in testosterona v iztrebkih, serumu in dlaki pri sedmih samcih kozoroga jeseni (N = 7). Testosteron v dlaki je bil merjen pri petih živalih (N = 5).

Table 14: Individual and average concentration of FGCM, cortisol, and testosterone in faeces, serum, and hair of male ibexes in autumn (n = 7). Testosterone in hair was measured for five animals (n = 5).

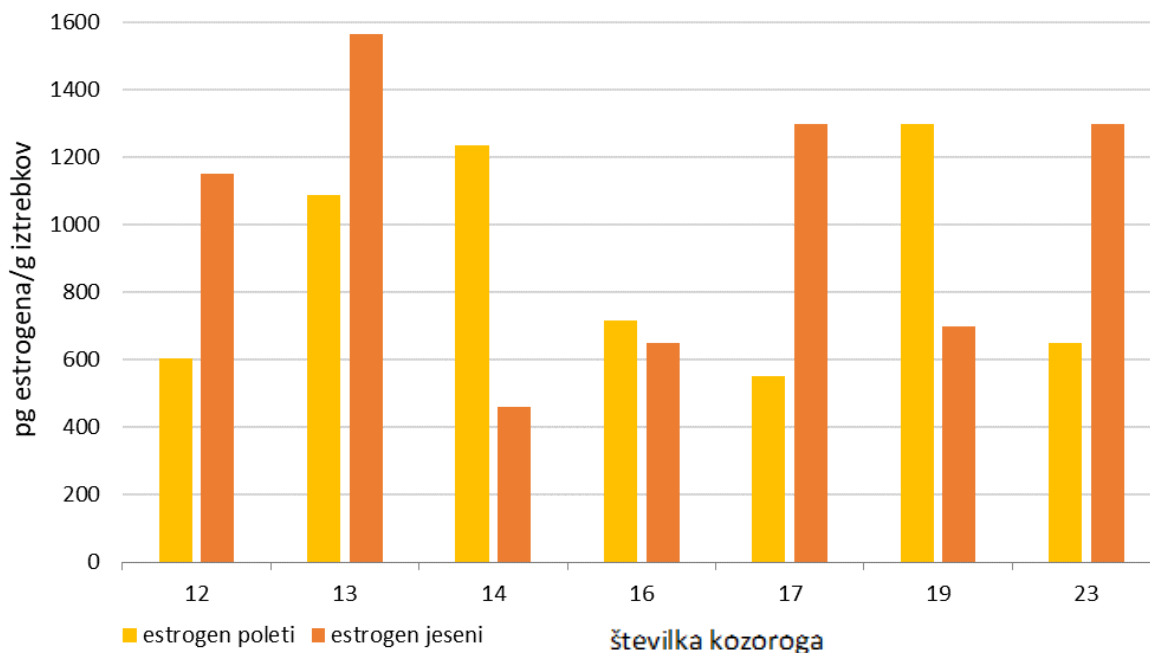
	kortizol (oz. FGCM)			testosteron		
	iztrebki (ng/g)	venepunkcija ¹ (ng/ml)	dlaka (ng/g)	iztrebki (ng/g)	venepunkcija ¹ (ng/ml)	dlaka (ng/g)
kozorog št. 1a	35,52	96,20	16,00	15,95	2,97	0,54
kozorog št. 2a	33,92	124,68	29,06	2,53	1,42	0,30
kozorog št. 3a	20,12	89,21	28,09	9,82	1,74	0,90
kozorog št. 4a	21,21	73,95	39,97	3,45	0,59	/
kozorog št. 5a	22,59	122,60	27,76	4,34	1,59	0,59
kozorog št. 6a	16,67	169,48	43,88	4,03	1,03	/
kozorog št. 8a	17,03	112,76	37,44	3,38	0,27	0,42
\bar{x}	23,86	112,69	31,74	6,21	1,37	0,55
SE	2,92	11,74	3,55	1,86	0,33	0,10
min	16,67	73,95	16,00	2,53	0,27	0,30
max	35,52	169,48	43,88	15,95	2,97	0,90
N	7	7	7	7	7	5

¹vzorec, pridobljen z venepunkcijo/sample obtained with venipuncture

Kozorog št. 1a je dominantni samec, ki je imel povišan testosteron v iztrebkih v primerjavi z drugimi samci, za njim je samec s številko 3, ki je v čredi drugorangiran. Korelacije med koncentracijo testosterona v serumu in dlaki ter vrednostmi FGCM nismo izračunali, ker je bilo število kozorogov premajhno za statistični izračun. Le pri petih smo uspeli izmeriti testosteron v treh različnih medijih (iztrebki, serum in dlaka). Največje vrednosti KORT smo ugotovili v krvnem serumu, največje vrednosti testosterona pa v iztrebkih (tabela 14).

4.4.2 Koncentracija FGCM v korelaciji s koncentracijo estradiola

Na sliki 18 prikazujemo koncentracijo estradiola v iztrebkih sedmih samic kozoroga.



Slika 18: Individualna koncentracija estradiola v iztrebkih sedmih samic poleti in jeseni.

Figure 18: *Individual faecal estradiol concentration in faeces of seven females in summer and autumn.*

Koncentracija fekalnega estradiola je bila pri štirih samicah (št. 12, 13, 17 in 23) jeseni višja kot poleti, pri ostalih treh (št. 14, 16 in 19) pa nižja.

Čeprav sta bili povprečni koncentraciji FGCM in estradiola v iztrebkih samic kozoroga jeseni višji kot poleti, razlika v koncentracijah ni pokazala statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) (tabela 15). Korelacija med koncentracijo FGCM in koncentracijo estradiola v iztrebkih ni bila statistično dokazana ($p > 0,05$).

Tabela 15: Povprečna koncentracija FGCM in estradiola v iztrebkih pri sedmih samicah poleti in jeseni .

Table 15: Mean FGCM and faecal estradiol concentrations in seven females during summer and autumn (N = 7).

vrednosti	FGCM (ng/g)		estradiol (pg/g)	
	poleti	jeseni	poleti	jeseni
\bar{x}	19,87	21,22	877,91	1017,89
SE	3,26	3,88	120,53	156,22
SD	8,63	10,27	318,89	413,31
min	10,00	10,00	550,00	459,26
max	30,71	39,82	1300,00	1565,35
N	7	7	7	7

V tabeli 15 prikazujemo nekatere dodatne statistične izračune za oba grafa. Pri samicah so bile jeseni povišane koncentracije FGCM in estradiola v iztrebkih, kar kaže na korelacijo med vrednostmi.

4.5 HEMATOLOŠKE IN BIOKEMIČNE PREISKAVE KRVI

Hematološke in biokemične preiskave so bile pri preiskovanih kozorogih narejene v okviru rednega monitoringa. V tabelah 16 in 17 ter na slikah 19 in 20 podajamo hematološke in biokemične vrednosti za vsakega kozoroga posebej. Vzorčenih je bilo šest samcev in šest samic (N = 12). V tabeli 17 smo vzporedno prikazali tudi koncentracijo KORT, ki smo jo izmerili pri istih živalih.

Pri hematoloških preiskavah smo merili število eritrocitov (RBC), levkocitov (WBC), diferencialno belo krvno sliko z analizo nevtrofilcev (NEU), limfocitov (LYM) in monocitov (MON), ter določali raven hemoglobina (HGB), hematokrita (HCT) in eritrocitnih indeksov (MCV, MCH, MCHC). Biokemične preiskave so obsegale analizo ravni glukoze (GLU), skupnega bilirubina (TBIL), kreatinina (CREA), uree (BUN), alanin transaminaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), amilaze (AMYL), skupnih proteinov (TP), albuminov (ALB), globulinov (GLOB), natrija (Na), kalija (K⁺), kalcija (Ca) in fosforja (PHOS).

4.5.1 Hematološke preiskave

V tabeli 16 so prikazani različni hematološki parametri šestih samcev in šestih samic ter njihove referenčne vrednosti (Zoetis Inc in Laboklin). Absolutne vrednosti nevtrofilcev so v primerjavi z referenčnimi povečane pri samcih in samicah (10 živali), pri čemer so referenčne vrednosti za koze $1,2\text{--}8 \times 10^9/l$, pri kozorogih pa so bile povprečne vrednosti pri samcih 10 in pri samicah $9,9 \times 10^9/l$, zato so vidne razlike tudi v deležih posameznih belih krvničk. Razlik med samci in samicami nismo ugotovili. Na račun povečanega števila nevtrofilcev je zmanjšan odstotek limfocitov, saj so referenčne vrednosti od 50 do 70 odstotkov, v našem primeru pa so bile povprečne vrednosti 25,1 odstotka pri samcih in 21 odstotkov pri samicah. Pri štirih živalih (treh samcih in eni samici) je povečano število nevtrofilcev vplivalo tudi na povišane vrednosti skupne bele krvne slike. Rdeča krvna slika kaže povišane vrednosti hemoglobina pri 11 preiskovanih kozorogih (povprečna vrednost za samce 13,3 g/dl in za samice 12,7 g/dl) glede na referenčne vrednosti pri kozah, ki so od 8 do 12 g/dl.

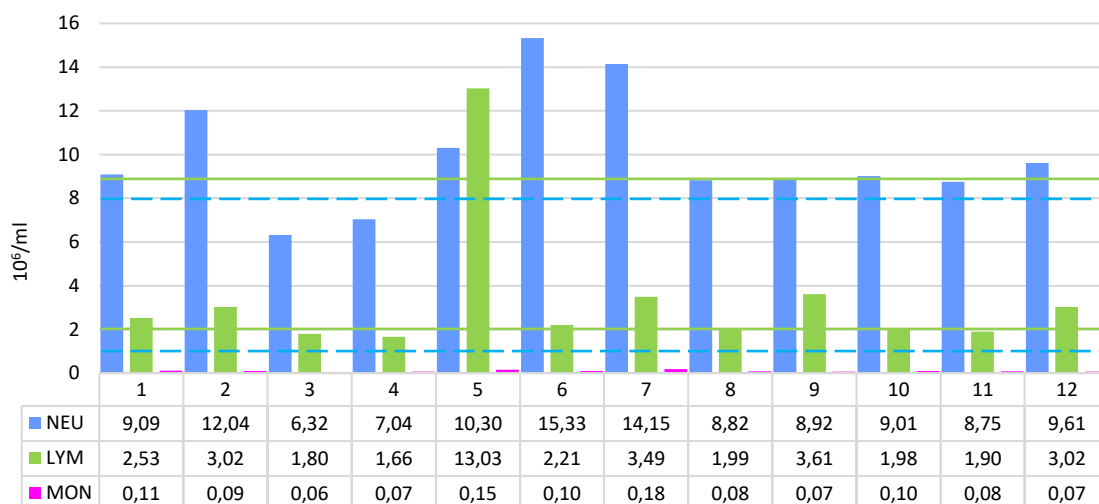
Tabela 16: Vrednosti hematoloških parametrov pri šestih samcih (N = 6) in šestih samicah (N = 6).

Table 16: Values of haematological parameters for six males (n = 6) and six females (n = 6).

Parametri	WBC	LYM	MON	NEU	LYM	MON	NEU	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	
ref. vrednosti*	4–13	2–9	0–0,5	1,2–8	50–70	0–4	30–61	8–18	8–12	25–38	16–30	5,2–8	30–36	
enote	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	10 ⁹ /l	%	%	%	10 ¹² /l	g/dl	%	fl	pg	g/dl	
zaporedna številka samca	1	11,74	2,53	0,11	9,09	21,60	0,90	77,50	15,05	14,40	38,36	25	9,60	37,60
	2	15,15	3,02	0,09	12,04	19,90	0,60	79,50	15,05	13,60	34,18	23	9,10	39,90
	3	8,18	1,80	0,06	6,32	22,00	0,80	77,30	16,51	14,30	36,44	22	8,60	39,20
	4	8,77	1,66	0,07	7,04	18,90	0,80	80,30	15,72	12,70	35,75	23	8,10	35,70
	5	23,49	13,03	0,15	10,30	55,50	0,60	43,90	15,72	13,80	33,73	21	8,80	40,80
	6	17,64	2,21	0,10	15,33	12,50	0,60	86,90	13,24	10,70	28,82	22	8,10	37,00
\bar{X} (samci)	14,2	4,0	0,1	10,0	25,1	0,7	74,2	15,2	13,3	34,5	22,7	8,7	38,4	
SE samci)	2,18	1,65	0,01	1,24	5,70	0,05	5,69	0,41	0,52	1,22	0,51	0,22	0,72	
min	8,18	1,66	0,06	6,32	12,50	0,60	43,90	13,24	10,70	28,28	21	8,10	35,70	
max	23,49	13,03	0,15	12,04	55,50	0,90	86,90	16,51	14,40	38,36	25	9,60	40,80	
zaporedna številka samice	7	17,82	3,49	0,18	14,15	19,60	1,00	79,40	14,21	12,30	32,21	23	8,70	38,30
	8	10,89	1,99	0,08	8,82	18,30	0,80	80,90	15,81	12,80	34,42	22	8,10	37,10
	9	12,60	3,61	0,07	8,92	28,60	0,60	70,80	17,16	14,00	37,88	22	8,20	37,10
	10	11,09	1,98	0,10	9,01	17,90	0,90	81,20	14,06	11,80	31,26	22	8,40	37,60
	11	10,73	1,90	0,08	8,75	17,70	0,70	81,50	14,21	12,70	34,87	25	8,90	36,30
	12	12,70	3,02	0,07	9,61	23,80	0,50	75,70	16,39	12,80	33,78	21	7,80	37,80
\bar{X} (samice)	12,6	2,7	0,1	9,9	21,0	0,8	78,3	15,3	12,7	34,1	22,5	8,4	37,4	
SE (samice)	1,00	0,30	0,02	0,79	1,63	0,07	1,58	0,49	0,27	0,86	0,51	0,15	0,26	
min	10,73	1,90	0,07	8,75	17,70	0,50	70,80	14,06	11,80	31,26	21	7,80	36,30	
max	17,82	3,61	0,18	14,15	28,60	1,00	81,50	17,16	14,00	37,88	25	8,90	38,30	
\bar{X} (skupaj)	13,4	3,4	0,1	9,9	23,0	0,7	76,2	15,3	13,0	34,3	22,6	8,5	37,9	
SE (skupaj)	1,22	0,86	0,01	0,74	3,03	0,04	3,01	0,32	0,30	0,75	0,36	0,14	0,41	
min	8,18	1,66	0,06	6,32	12,50	0,50	43,90	13,24	10,70	28,28	21	7,80	35,70	
max	23,49	13,03	0,18	14,15	55,50	1,00	86,90	17,16	14,40	38,36	25	9,60	40,80	

*Referenčne vrednosti Zoetis Inc [120]. Modro označene vrednosti so pod in rdeče označene vrednosti nad referenčnimi vrednostmi.

Na sliki 19 so prikazane absolutne individualne vrednosti ($\times 10^9/L$) števila nevtrofilcev, limfocitov in monocitov), na sliki 20 pa so individualne relativne (%) vrednosti diferencialne bele krvne slike pri 12 kozorogih.



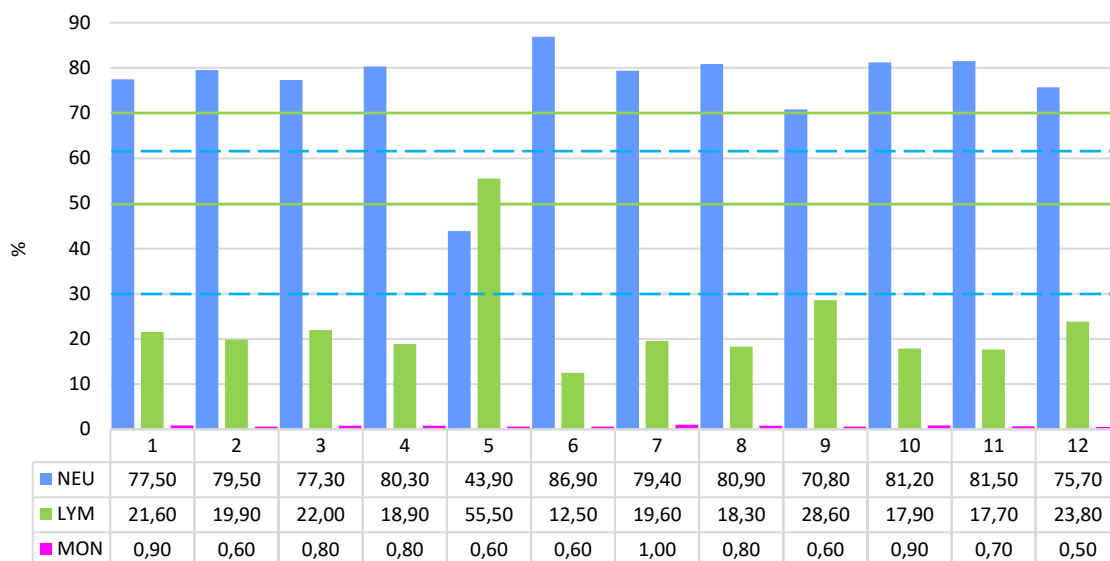
Legenda: zgornja in spodnja meja referenčnih vrednosti: za nevtrofilce od 1,2 do 8,0 $\times 10^6$ ml (modra prekinjena črta); za limfocite od 2,0 do 9,0 $\times 10^6$ ml (zelena črta)

Legend: upper and lower reference limits: for neutrophils: 1.2 to 8.0 $\times 10^6$ ml (blue dashed line); for lymphocytes 2.0 to 9.0 $\times 10^6$ ml (green line)

Slika 19: Absolutno individualno število nevtrofilcev, limfocitov in monocitov pri posameznih kozorogih ($\times 10^6/ml$).

Figure 19: Absolute individual neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts in ibex ($\times 10^6/ml$).

S slike 19 lahko razberemo, da je dejansko število nevtrofilcev nad referenčnimi vrednostmi pri desetih kozorogih. Samo pri dveh kozorogih (št. 3 in 4) so rezultati znotraj referenčnih vrednosti. Pod referenčnimi vrednostmi so limfociti pri kozorogih s številkami 3, 4, 8, 10 in 11 ter znotraj referenčnih vrednosti pri kozorogih s številkami 1, 2, 6, 7, 9 in 12. Pri kozorogu št. 5 so bile vrednosti limfocitov nad referenčnimi vrednostmi (13,03 $\times 10^6/ml$) (v % so bile vrednosti pri tem kozorogu edine znotraj referenčnih vrednosti). Vrednosti za monocite (od 0 do 0,5 $\times 10^6/ml$) so se pri vseh testiranih kozorogih gibale znotraj referenčnih vrednosti.



Legenda: zgornja in spodnja meja referenčnih vrednosti: za nevtrofilce od 30 do 63 odstotkov (modra prekinjena črta); za limfocite od 50 do 70 odstotkov (zelena črta)

Legend: upper and lower reference limits: for neutrophils 30% to 63% (blue dashed line); for lymphocytes: 50% to 70% (green line)

Slika 20: Individualne relativne vrednosti (%) diferencialne bele krvne slike pri 12 kozorogih.

Figure 20: Individual relative values (%) of differential white blood counts in 12 ibexes.

S slike 20 lahko razberemo, da je delež nevtrofilcev večji od referenčnih vrednosti pri vseh kozorogih. Izjema je le kozorog št. 5, pri katerem so rezultati znotraj referenčnih vrednosti. Delež limfocitov je pod referenčnimi vrednostmi pri vseh kozorogih. Izjema je kozorog št. 5, pri katerem so rezultati znotraj referenčnih vrednosti (slika 20). Vrednosti za monocite (od 0 do 4 odstotke) so se pri vseh testiranih kozorogih gibale v mejah normale.

4.5.2 Biokemične preiskave krvi

V tabeli 17 so prikazani različni biokemični parametri šestih samcev in šestih samic ter referenčne vrednosti (Zoetis Inc in Laboklin). Vse vrednosti se gibljejo znotraj referenčnega območja za domače koze, razen vrednosti kreatinina, ki je bila pri samcu št. 6 67 mmol/L, kar je pod referenčnimi vrednostmi, ki so za koze od 71 do 327 mmol/L, ter vrednosti amilaze pri petih samcih in šestih samicah (izjema je samo samec št. 5), ki so bile pri samcih povprečno 105,7 IU/L in pri samicah povprečno 106,7 IU/L in so nad referenčnimi vrednostmi za domače koze, ki so od 0 do 63 IU/L.

Najnižjo koncentracijo KORT smo izmerili pri kozorogu št. 8 (70,42 ng/ml) in najvišjo vrednost KORT pri kozorogu št. 7 (107,24 ng/ml). Pri kozorogu št. 5 nismo ugotovili odstopanj (80,99 ng/ml), čeprav je hematološka slika močno odstopala od referenčnih vrednosti.

Tabela 17: Vrednosti biokemičnih parametrov pri šestih samcih (N = 6) in šestih samicah (N = 6).

Table 17: Values of biochemical parameters for six males (n = 6) and six females (n = 6).

Parametri	BUN	CREA	GLU	TBIL	TP	ALB	GLOB	KORT	ALT	ALP	AMYL	Na+	Ca	K+	PHOS	
ref. Vred.* merske	2,5–25 mmol/L	71–327 mmol/L	2,2–21,1 umol/L	0–74 umol/L	46–84 g/L	21–46 g/L	18–50 g/L	2–50** ng/ml	6–124 IU/L	11–1076 IU/L	0–63 IU/L	138–162 mmol/L	1,50–3,02 mmol/L	3,0–8,6 mmol/L	1,29–5,62 mmol/L	
zap. št. Samca	1	6,10	107,00	8,50	5,00	65	38,00	27	85,05	18,00	209,00	86,00	145,00	2,28	4,80	2,40
	2	4,90	161,00	8,70	4,00	66	33,00	33	96,08	17,00	126,00	109,00	145,00	1,96	4,60	/
	3	4,60	111,00	10,80	6,00	70	42,00	28	94,10	15,00	243,00	156,00	144,00	2,46	4,20	2,22
	4	4,80	123,00	10,70	4,00	60	36,00	24	80,51	16,00	317,00	110,00	148,00	2,14	4,40	2,49
	5	5,60	86,00	11,70	5,00	60	36,00	24	80,99	16,00	267,00	55,00	145,00	2,12	5,60	1,97
	6	4,30	67,00	10,30	5,00	73	27,00	46	93,24	8,00	87,00	118,00	143,00	1,97	5,30	3,09
\bar{X} (samci)	10,1	5,1	109,2	4,8	65,7	35,3	30,3	88,3	15,0	208,2	105,7	145,0	2,2	4,8	2,4	
SE (samci)	0,47	0,25	12,02	0,28	1,95	1,88	3,11	2,60	1,33	32,46	12,55	0,62	0,07	0,20	0,15	
min	8,50	4,30	67,00	4	60	27,00	24	80,51	8,00	87,00	55,00	143,00	1,96	4,20	1,97	
max	11,70	6,10	161,00	6	73	42,00	46	96,08	18,00	317,00	156,00	148,00	2,46	5,60	3,09	
zap. št. Samice	7	3,80	89,00	9,20	5,00	67	36,00	31	107,24	11,00	148,00	108,00	150,00	2,16	5,10	2,57
	8	4,20	80,00	13,00	5,00	64	36,00	27	70,42	13,00	138,00	117,00	144,00	2,43	4,40	1,61
	9	3,70	107,00	13,40	5,00	63	38,00	25	96,91	14,00	190,00	92,00	150,00	2,31	4,40	2,42
	10	5,20	88,00	11,30	5,00	65	35,00	30	81,68	19,00	141,00	122,00	147,00	2,24	5,00	1,97
	11	4,60	91,00	10,10	5,00	62	37,00	25	72,96	14,00	143,00	105,00	149,00	2,16	4,90	2,77
	12	4,50	88,00	14,00	4,00	71	36,00	35	87,52	17,00	181,00	96,00	152,00	2,35	6,40	2,18
\bar{X} (samice)	11,8	4,3	90,5	4,8	65,3	36,3	28,8	86,1	14,7	156,8	106,7	148,7	2,3	5,0	2,3	
SE (samice)	0,72	0,21	3,32	0,15	1,22	0,38	1,46	5,28	1,07	8,43	4,33	1,04	0,04	0,27	0,16	
min	9,20	3,70	80,00	4,00	62	35,00	25	70,42	11,00	138,00	92,00	144,00	2,16	4,40	1,61	
max	14,00	5,20	107,00	5,00	71	38,00	35	107,24	19,00	190,00	122,00	152,00	2,43	6,40	2,77	
\bar{X} (skupaj)	11,0	4,7	99,8	4,8	65,5	35,8	29,6	87,2	14,8	182,5	106,2	146,8	2,2	4,9	2,1	
SE (skupaj)	0,50	0,19	6,80	0,16	1,15	0,97	1,74	2,96	0,86	18,36	6,65	0,81	0,04	0,17	0,11	
min	8,50	3,70	67,00	4	60	27,00	24	70,42	8,00	87,00	55,00	143,00	1,96	4,20	1,61	
max	14,00	6,10	161,00	6	73	42,00	46	107,24	19,00	317,00	156,00	152,00	2,46	6,40	3,09	

* Referenčne vrednosti Zoetis [120]. ** Referenčna vrednost Laboklin [121]. Modro označene vrednosti so pod in rdeče označene vrednosti nad referenčnimi vrednostmi.

5 RAZPRAVA

Specifična narava kozorogov zahteva dobro poznavanje socialnih odnosov in hkrati odzive vsake posamezne živali. Kozorogi so živali, ki ljubijo svobodo in prostor, da se lahko umaknejo, zato je vsako poseganje v skupino zanje zelo stresno. Ob nujnih posegih ali vzorčenju materiala za presojo zdravstvenega, reprodukcijskega ali fiziološkega stanja preiskovane živali se moramo vsakokrat pravilno odločiti, katero metodo vzorčenja naj izberemo; invazivno ali neinvazivno. Hkrati tudi neinvazivne metode vzorčenja krvi, kot sta na primer odvzema krvi s krvosnimi stenicami ali medicinskimi pijavkami, zahtevajo določene pogoje, ki morajo biti izpolnjeni, da lahko govorimo o neinvazivnem pristopu k vzorčenju brez vznemirjanja živali in s tem na vplivanje na preiskovane vrednosti v krvi.

Celoten postopek pridobivanja določenega vzorca, ne glede na to, ali je vzorčenje invazivno (odvzem krvi z venepunkcijo) ali neinvazivno (odvzem krvi s krvosnimi stenicami, medicinskimi pijavkami, odvzem sline, dlake, solz), je stresen za živali, če vključuje tudi odlov in fiksacijo. Velikokrat je lovljenje veliko bolj stresno kot sam vbod z iglo. Odlov z zalezovanjem je poznan kot močan stresni dejavnik tudi za divjad v naravi, kar ima za posledico povišane vrednosti kortikosteroidov. Obdobje intenzivnega lova ima lahko še posebej negativen vpliv. Po lovu s pogonom je bila pri jelenih in košutah ugotovljena povečana vrednost ne le kortizola, ampak tudi nekaterih biokemičnih parametrov. Pri košutah so bile v krvi povečane vrednosti HDL, CHOL, LDH, ALT, pri jelenih pa ALP, bilirubina in AST [124].

Zato smo v prvi hipotezi predvidevali, da bodo za ugotavljanje ravni kortizola poleg krvi uporabni mediji tudi iztrebki, dlaka in slina, medtem ko bo postopek vzorčenja urina in solz morda težje izvedljiv.

V raziskavi smo koncentracijo KORT pri kozorogih merili v osmih različnih medijih: vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo, krvosnimi stenicami in medicinskimi pijavkami, ter vzorcih sline, iztrebkov, dlake, urina in solz. Literatura omenja tudi ugotavljanje koncentracije KORT v mleku [99, 103, 104], vendar se za ta način nismo odločili, ker bi bil preveč stresen in praktično neizvedljiv pri kozorogih. Veliko tehničnih težav smo imeli tudi pri zbiranju vzorcev urina in solz.

V nalogi smo zgoraj omenjene vzorce odvzeli ob rednih letnih pregledih živali, ko smo vse kozoroške odločili, izjema je bilo zbiranje vzorcev iztrebkov, kar smo izvajali z neinvazivnim pristopom, ko smo pobrali iztrebke po iztrebljanju živali v ogradi.

V vseh odvzetih vzorcih smo uspeli ugotoviti KORT in izmeriti njegovo koncentracijo ter primerjati rezultate z drugimi avtorji.

Rezultate, pridobljene iz krvi, predstavljamo v drugi hipotezi, na tem mestu pa predstavljamo rezultate, dobljene z neinvazivnimi vzorčenji ob invazivnem pristopu, razen za iztrebke.

Pri interpretaciji rezultatov koncentracije KORT oziroma FGCM v različnih medijih je treba upoštevati nekaj pomembnih pravil. Upoštevati moramo, da v večini medijev merimo koncentracijo kortizola, v iztrebkih pa FGCM. Koncentracija KORT je pri večini medijev odvisna tudi od letnega časa in dnevnega ritma [93]. Vse živali v naši raziskavi so bile vzorčene dopoldne, da bi izključili vpliv cirkadianega ritma. Sline lahko uporabimo za merjenje KORT pri akutnem stresu, medtem ko KORT v dlaki izraža izločanje v daljšem časovnem obdobju in je lahko povezan s kroničnim stresom [44, 125].

Poleg razlik v koncentraciji KORT pri posameznih vrstah so pomembne tudi razlike v vzorčenju, kot so vrsta medija (npr. dlaka, iztrebki), kakovost vzorca (npr. dlaka/poddlaka, suhi/sveži iztrebki), na rezultate pa vpliva tudi izbira encimsko-immunskega testa [126]. Ob primerjavi izmerjene koncentracije KORT v dlaki in iztrebkih pri isti živali ob istem vzorčenju (sočasno) moramo rezultate obravnavati ločeno, saj koncentracija KORT v dlaki kaže na kronični stres, v iztrebkih pa se pokaže povišana koncentracija FGCM kot odgovor na stres v enem ali dveh dneh, le redko pozneje. Pri interpretaciji rezultatov moramo tudi upoštevati, da v iztrebkih merimo koncentracijo FGCM, v ostalih medijih pa KORT.

Touma in Palme [101] sta razvila neinvazivno tehniko za ugotavljanje FGCM v vzorcih iztrebkov. Ista ekipa raziskovalcev [110] je ugotovila, da se vzorčenje iztrebkov in analize FGCM morda zdijo preprosti in enostavni, vendar jih morajo raziskovalci pravilno izbrati in uporabiti.

Zavedati se morajo tudi številnih pasti in morebitnih motečih dejavnikov ter nenazadnje skrbno interpretirati rezultate. Še posebej se je treba izogibati kvantitativnemu primerjanju rezultatov, saj se pri komercialnih testih navadno merijo različne imuno-reaktivne snovi (na primer KORT in FGCM).

Pri ugotavljanju razlik med spoloma so Dulude-de Broin in sod. [127] ugotovili, da spol ne vpliva na koncentracijo FGCM, v tej raziskavi pa smo v iztrebkih pri kozorogih ugotovili višjo koncentracijo pri samcih (23,66 ng/g) kot pri samicah (21,47 ng/g), kar je verjetno povezano z rangiranjem med samci za prevlado v čredi. Prav tako so Dulude-de Broin in sodelavci [127] nadalje ugotovili, da tudi starost ne vpliva na koncentracijo FGCM, mi pa smo ugotovili statistično značilno razliko med kozorogi, mlajšimi od 11 mesecev (17,56 ng/g) in starejšimi od 10 let (26,38 ng/g) (Mann-Whitney: $Z = 21,89$, $p = 0,001$). Naši rezultati nakazujejo na kronični stres pri starejših kozorogih. Primerjava vrednosti FGCM v iztrebkih, vzorčenem poleti (23,18 ng/g) in jeseni (21,86 ng/g), kaže, da je bila jeseni vrednost nižja, vendar nismo ugotovili statistično pomembnih razlik.

Ugotavljanje KORT v dlaki velja za eno od bolj pogostih neinvazivnih metod odvzema vzorcev. Dlako lahko pobereмо z bodečih žičnih ograj ali drugih mest pri prostoživečih živalih, lahko pa jo tudi odstrižemo ali izpulimo. V preiskavi smo dlako odstrigli pred plečnico, kjer je najmanjša možnost za kontaminacijo s slino, iztrebki ali urinom. KORT se v dlako vgradi s pasivno difuzijo iz krvi v dlačnih mešičkih, preko znojnic in lojnic [105], zato je dlaka primerna za ugotavljanje kroničnega stresa. Vzorčenje dlake lahko izvedemo hkrati z drugimi rutinskimi preiskavami. Pomembno je tudi, da se povišana koncentracija KORT zaradi odlova in rokovanja v dlaki ne zazna takoj. Ugotavljanje KORT v dlaki omogoča presojo dolgotrajne izpostavljenosti stresu, ki lahko traja več mesecev. Če dlako narežemo na posamezne dele, lahko bolj natančno določimo časovno obdobje, ko je bila žival izpostavljena stresu, vendar moramo vedeti, kdaj je dlaka izraščala [102]. V raziskavi tega nismo mogli izvesti, ker smo z živalmi rokovali samo ob rednih letnih pregledih.

Prandi in sod. [44] poročajo, da so izmerili povprečno koncentracijo KORT v dlaki alpskih kozorogov 22,40 ng/g. Ugotovili so pomembno razliko med spoloma, saj je bila koncentracija KORT višja pri mlajših samicah kot pri starejših. Tudi v naši raziskavi je bila izmerjena statistično značilna razlika v dlaki, vendar se ta ni nanašala na spol, ampak na razliko med vzorci, zbranimi poleti in jeseni. Statistično pomembno višjo koncentracijo KORT smo opazili jeseni ($p < 0,001$; $N = 21$). Povprečna koncentracija KORT v dlaki, izmerjena poleti, je znašala 19,24 mg/g, jeseni pa 35,95 ng/g. Rezultat, pridobljen jeseni, bi lahko nakazoval na menjavo dlake in višje koncentracije KORT v mladi dlaki, ki je začela izraščati jeseni, saj so Wester in sod. ugotovili, da sončna radiacija poleti zniža koncentracijo kortizola v laseh [128].

Ugotavljanje KORT v slini je enostavno pri treniranih živalih ali s pomočjo posebnih igral, v našem primeru pa je šlo za divje živali in smo neinvazivno metodo odvzema vzorcev slin lahko opravili samo z invazivnim pristopom ob odlovu. Vrednosti v slini so zaradi delovanja encimov približno desetkrat nižje od tistih v krvi in v raziskavi smo ugotovili pomembno razliko ($p < 0,05$) v nižji koncentraciji KORT pri samcih (10,12 ng/ml) kot pri samicah (15,32 ng/ml). Statistično značilnih razlik v koncentraciji KORT v slini med vzorci, odvzetimi pri različno starih živalih in v različnem obdobju (poleti in jeseni), nismo ugotovili. Statistično značilna razlika je bila ugotovljena le v serumu med živalmi, mlajšimi od 11 mesecev, ki so imele veliko večje koncentracije kot starejše od 10 let.

Pri vzorčenju urina smo naleteli na težavo, saj so živali zaradi stresa urinirale ob začetku odlova in tako ni bilo mogoče pridobiti urina s kateteriziranjem. Zato smo živali po odlovu in odvzemu ostalih vzorcev zaprli v transportne kletke, kjer so v obdobju pol ure urinirale na kovinski pod, s pomočjo katerega smo urin lahko ulovili in ga analizirali. Povprečna koncentracija KORT v urinu je znašala 126,12 ng/ml, vendar vzorcev zaradi premajhnega števila nismo primerjali z ostalimi, so bile pa vrednosti v primerjavi z vrednostmi v krvnem serumu višje, kar je verjetno povezano s tem, da so bili vzorci pridobljeni nazadnje in so bile živali najdlje pod stresom.

Pri vzorčenju solz je pri divjih živalih potreben invazivni pristop in v raziskavi smo uspeli pridobiti samo dva vzorca, pri katerih je bila izmerjena povprečna koncentracija KORT 13,28 ng/ml, smo pa tudi v tem mediju uspeli ugotoviti in izmeriti KORT.

Prvo hipotezo smo potrdili, saj smo KORT potrdili v vseh medijih. Raven KORT v iztrebkih, dlaki in slini je merljiva in najvišja ugotovljena koncentracija KORT je v urinu in serumu/plazmi, sledijo dlaka, iztrebki, solze in slina. Naša predvidevanja, da bo koncentracija FGCM v iztrebkih višja od koncentracije KORT v dlaki, se za malenkost razlikuje, saj smo nekoliko višjo koncentracijo KORT ugotovili v dlaki in ne v iztrebkih. Odvzem urina in solz je težko izvedljiv in za prakso neuporaben.

V drugi hipotezi smo si zadali, da bomo poleg odvzema krvi z venepunkcijo izpostavili in proučili tudi uporabnost alternativnega odvzema krvi s krvosnimi stenicami (*R. prolixus*) in medicinskimi pijavkami (*H. medicinalis*). Predvidevali smo, da sta ti dve metodi za kozorože manj stresni zaradi drugačnega pristopa do živali, ker odlov in fiksacija nista potrebna.

Literatura navaja, da se za odvzem krvnih vzorcev poleg venepunkcije lahko uporabijo tudi druge tehnike, kot je odvzem krvi s krvosnimi stenicami [8, 52, 64, 65] in medicinskimi pijavkami [14]. Pri domačih vrstah živali lahko alternativne odvzeme uporabimo v primerih, pri katerih s klasičnim odvzemom tvegamo in povzročamo prevelik stres [45].

V svoji raziskavi smo pri kozorogih primerjali vzporedne rezultate treh načinov odvzema krvi, ki smo jih izvedli ob predhodnem odlovu in fiksaciji (invazivni pristop). S tem smo ugotavljali povezavo koncentracij KORT v krvni plazmi, pridobljeni s tremi različnimi načini odvzema. Ugotovili smo statistično značilne razlike med koncentracijo KORT v krvni plazmi, pridobljeni z venepunkcijo (invazivna tehnika), in krvni plazmi, pridobljeni s krvosnimi stenicami, ter med krvno plazmo, pridobljeno z medicinskimi pijavkami (neinvazivne tehnike odvzema).

Povprečna koncentracija KORT v krvnem serumu oz. plazmi je bila višja v vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo in medicinskimi pijavkami, in precej nižja v vzorcih, odvzetih s krvosesnimi stenicami (52,86 ng/ml), kar je najverjetneje posledica prebave krvi v stenicah in izločanja vodne faze krvi ter s tem izgube dela KORT v vzorcu. Ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik v koncentraciji KORT v krvni plazmi, pridobljeni z medicinskimi pijavkami (77,04 ng/ml), in v krvni plazmi, pridobljeni z venepunkcijo (93,49 ng/ml).

Obstaja veliko raziskav o koncentraciji KORT v serumu in plazmi pri domačih živalih [129, 130], vendar so bile pri kozorogih opravljene raziskave KORT v dlaki [44] in FGCM v iztrebkih [131, 132].

Sartorelli in sod. [46] so edini, po nam znanih podatkih, ki so izmerili koncentracijo KORT v krvnem serumu alpskih kozorogov. KORT so merili dve zaporedni leti od januarja do maja. Najnižjo povprečno vrednost so izmerili maja leta 1990 (27,89 nmol/l oziroma 10,11 ng/ml) in najvišjo marca leta 1991 (248,41 nmol/l oziroma 90,05 ng/ml). Povprečna vrednost desetih vzorčenj v dveh zaporednih letih od januarja do maja je znašala 74,84 nmol/l (27,13 ng/ml). Uporabljen je bil test RIA, medtem ko smo mi uporabili komercialni encimsko-immunski test Cortisol ELISA. V naši raziskavi je bilo povprečje 93,49 ng/ml. Vrednosti so se gibale od 47,13 do 169,48 ng/ml, kar je višje, kot so jih podali Sartorelli in sodelavci. Razlike v rezultatih pripisujemo uporabi dveh različnih testov in načinu vzorčenja, saj so Sartorelli in sod. vzorce krvi, pri živalih odvzete po smrti z odstrelom, analizirali z metodo RIA, v svoji raziskavi pa so vzorce krvi živih živali analizirali z metodo ELISA.

Sartorelli in sod. [40] so vzorce krvi jemali iz src ustreljenih kozorogov, kar posledično pomeni manjši stres. V tej raziskavi smo kozorožice pred odvzemom vzorcev odlovili. Ugotovili smo pomembno razliko ($p < 0,01$) v koncentraciji KORT v serumu (z venepunkcijo) med mlajšimi (do 11 mesecev), odraslimi (do 10 let) in starejšimi kozorogi (nad 10 let); v skupini, starejši od desetih let, smo v serumu krvi, pridobljene z venepunkcijo, ugotovili tudi statistično značilno višjo koncentracijo KORT (Mann-Whitney: $Z = -2,27$, $p = 0,023$), kar kaže, da je bila koncentracija kortizola v serumu preiskovanih kozorogov odvisna od starosti živali.

Povprečne vrednosti so se s starostjo povečevale, kar kaže, da so bile starejše živali najbolj izpostavljene stresu in najdlje zaprte ob lovljenju, ker smo zaradi nevarnosti poškodb v skupini najprej izločili mlajše živali in samice, ki bi jih odrasli samci lahko poškodovali, na višje rezultate pa bi lahko vplivale tudi večja spolna aktivnost skupine in predhodne negativne izkušnje z odlovom ali socialnim rangiranjem živali.

Odvzem krvi z medicinskimi pijavkami je dobra alternativa odvzemu krvi, pri katerem je potreben odlov živali s fiksacijo ali uspavanjem ali pa gre pri njem za težaven dostop do krvnih žil (debelost, dehidracija, velikost krvnih žil), in predstavlja pomemben napredek pri odvzemu krvi za preventivno medicino in epidemiološke študije na živalih v živalskih vrtovih. Medicinske pijavke se lahko uporabljajo kot zanesljivo orodje za odvzem krvi za hematološko in biokemično oceno zdravstvenega stanja živali [14] in določitev titra specifičnih protiteles [13].

V preiskavi smo največji razpon individualnih koncentracij KORT med najmanjšo in največjo izmerjeno vrednostjo (*min/max*) med vsemi tremi metodami odvzema krvnih vzorcev ugotovili v krvni plazmi iz krvi, pridobljene z medicinskimi pijavkami (od najmanj 31,93 ng/ml do največ 137,21 ng/ml), kar je lahko povezano tudi s časom zaprtja kozoroga med odlovom in odvzemom vzorcev z medicinskimi pijavkami. Krvosesne stenice se v živalskih vrtovih uporabljajo za odvzem krvi pri nekaterih vrstah živali, kot so na primer velike zveri, žirafe in sloni [8, 52], pri čemer lahko za to neinvazivno metodo uporabimo tudi neinvazivni pristop, podobno kot pri medicinskih pijavkah. Nižjo koncentracijo KORT v vzorcih, pridobljenih iz krvosesnih stenic, je mogoče pojasniti z vplivom različnih dejavnikov.

Odvzem krvi iz napitih stenic se obvezno izvaja z iglo. Običajno se uporabljajo nimfe četrte ali pete levitve (L4–L5) [52]. Če se ta postopek ne izvaja previdno, lahko vsebina prebavi zaide v epruveto, kar pomembno vpliva na koncentracijo KORT in zniža dejanske vrednosti [64]. Odvzeta je bila skupna prostornina krvi do 0,5 mililitra, kar je dovolj za omejeno število raziskav, če testirani vzorec ni hemolitičen ali žival ni dehidrirana, saj je takrat seruma oziroma plazme še manj. Poleg tega so bile krvosesne stenice pri nižjih temperaturah okolja manj odzivne, kar je bil razlog, da v nekaterih primerih, predvsem jeseni, nismo pridobili dovolj krvi.

Stenice prenehajo piti ali celo poginejo tudi pri visokih temperaturah okolja. Zaradi večje težavnosti gojenja krvosesnih stenic in večje občutljivosti pri hranjenju smo ugotovili, da je uporaba medicinskih pijavk veliko bolj primerna in uporabna metoda za alternativni odvzem vzorcev krvne plazme pri divjih ali nesocializiranih živalih v primerjavi s krvosesnimi stenicami.

Drugo hipotezo smo delno potrdili, saj je individualno vzorčenje z neinvazivnim pristopom na ležišču v skupini težko izvedljivo, predvsem v krajšem časovnem obdobju. V raziskavi smo uspeli vzorčiti le dominantnega samca.

V tretji hipotezi smo menili, da bo primerjava rezultatov biokemičnih in hematoloških analiz, ki bodo narejene vzporedno s tremi različnimi načini odvzema krvi (odvzem krvi z venepunkcijo, odvzem s krvosesnimi stenicami in odvzem z medicinskimi pijavkami – vsi trije odvzemi bodo izvedeni ob predhodni fiksaciji kozorogov), med seboj statistično zanemarljiva. Prav tako smo predvidevali, da bo razlika v ravni kortizola pri načinu vzorčenja ob predhodnem lovljenju in fiksaciji ter vzporednem odvzemu vzorcev pri posamezni živali statistično zanemarljiva.

V nalogi smo zaradi premajhnih volumnov odvzetih vzorcev krvi z medicinskimi pijavkami in krvosesnimi stenicami hematološke in biokemične preiskave krvi lahko opravili le v krvnih vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo, in jih primerjali z drugimi avtorji. Kvapil in sod. opisujejo uporabo medicinskih pijavk kot primerno metodo za neinvazivni odvzem krvnih vzorcev za hematološke in biokemične preiskave [14].

Peinado in sod. (1993) so primerjali nekatere hematološke in biokemične vrednosti med samci iberskega kozoroga (N = 7). Ugotovili so statistično pomembno razliko med kozorogi, ki so mlajši, in tistimi, ki so starejši od dveh let [119]. Prav tako so Perez in sod. (2003) pri iberskih kozorogih (N = 529) ugotavljali statistično pomembne razlike glede na spol in starost [47].

Cook in sod. (1986) so podali pregledne hematološke in biokemične vrednosti za alpskega kozoroga (N = 36), ločeno po starosti in po spolu [118].

Sartorelli in sod. (1997) so pri samicah alpskega kozoroga (N = 30) primerjali nekatere biokemične parametre (glukoza, holesterol, trigliceridi, nenasičene maščobne kisline, skupni proteini, kalcij in fosfor). Glede na čas odvzema niso potrdili statistično pomembne razlike, razen pri trigliceridih in KORT, saj so leta 1991 ugotovili višjo koncentracijo obeh substanc v serumu. Ugotovili so tudi, da so bile v tem letu podnebne razmere neugodne in da je bila večina vrednosti serumskih parametrov v območju vrednosti domačih koz [46], kar je pomemben podatek pri vrednotenju posameznih parametrov pri alpskih kozorogih.

Referenčne vrednosti za koze smo uporabili tudi v naši raziskavi. Hematološki rezultati rdeče krvne slike 12 kozorogov (šestih samcev in šestih samic) v naši raziskavi niso pokazali večjih odstopanj, izjema je bila blaga anemija. Verjetno je bila razlog okužba z eimerijami. Kontrola in zdravljenje se izvajata redno. Dodatnega vzroka v okviru te raziskave nismo posebej proučevali. Glede na primerjavo vrednosti pri iberskih kozorogih so bile vrednosti primerljive, le da so imeli alpski kozorogi v naši raziskavi nižje vrednosti HCT v primerjavi z iberskimi kozorogi [47].

Vrednosti bele krvne slike pri preiskovanih kozorogih so pokazale, da je bil delež nevtrofilcev nad referenčnimi vrednostmi pri vseh kozorogih, razen pri enem (št. 5), pri katerem je bil znotraj referenčnih vrednosti (od 30 do 61 odstotkov). Tudi delež limfocitov je bil pri vseh kozorogih pod referenčnimi vrednostmi, razen pri enem (št. 5), pri katerem je bil znova znotraj referenčnih vrednosti (od 50 do 70 odstotkov). Kozorog z zaporedno številko 5 (glej tabelo 15) je imel naslednje hematološke vrednosti krvi: LEU (23,49 %x 10^6 /ml), NEU 43,90 % ($10,30 \times 10^6$ /ml), LYM 55,50 % ($13,03 \times 10^6$ /ml), MON 0,60 % ($0,60 \times 10^6$ /ml). Ob pregledu kartotečnega lista nismo ugotovili posebnosti.

Hematološki rezultati so nadalje pokazali, da je število nevtrofilcev pri desetih kozorogih nad referenčnimi vrednostmi in pri dveh znotraj referenčnih vrednosti ($1,2$ do 8×10^6 /ml). Število limfocitov pod referenčnimi vrednostmi smo ugotovili pri petih kozorogih, znotraj referenčnih vrednosti (2 do 9×10^6 /ml) pri šestih kozorogih in nad referenčnimi vrednostmi pri enem kozorogu (št. 5).

Kozorogi so bili videti klinično zdravi, pred tem nismo izvajali preventivnih posegov, izveden je bil le odlov cele skupine (glej slike 10 do 12).

Mogočo in najverjetnejšo razlago za nevtrofilijo in limfocitozo smo našli v članku Casas in sod. [48], ki opisujejo hematološke in biokemične parametre pri iberskih kozorogih. Znano je, da izločanje kateholaminov med drugim povzroča levkocitozo z nevtrofilijo ali limfocitozo in blago eozinofilijo. Hkrati kortikosteroidi inducirajo levkocitozo z nevtrofilijo, limfopenijo in eozinopenijo. Najvišje koncentracije so dosežene štiri do šest ur po izpostavljenosti stresorju, kar ustreza naši raziskavi, saj so bili kozorogi polovljeni in zaprti v ogrado, preden smo jim odvzeli vzorce. Avtorji pojasnjujejo, da pri španskih kozorogih, ujetih s pastjo, višje vrednosti nevtrofilcev in nižje vrednosti eozinofilcev kažejo na bolj pogosto odziven in dolgotrajen stresni odziv, ki ga povzročajo kortikosteroidi. Vrednosti so odvisne od časa, ki so ga kozorogi preživeli v pasti [48].

Kozorog z zaporedno številko 5 je močno odstopal od rezultatov ostalih kozorogov (vrednosti so bile znotraj referenčnih vrednosti). Najverjetnejša razlaga je, da se bela krvna slika (nevtrofilija in limfopenija) še ni spremenila, saj smo ga vzorčili prvega, torej v prve pol ure. To ustreza tudi rezultatom, ki so jih pridobili Casas in sodelavci. Ugotavljamo tudi, da je odziv nevtrofilcev (nevtrofilija) hitrejši od odziva limfocitov (limfopenija). Vrednosti za monocite so se gibale znotraj referenčnih vrednosti. Vrednosti za eozinofilce in bazofilce nismo izmerili, zato primerjav nismo mogli narediti.

Newcomer in sod. (2021) poudarjajo, da je limfopenija pomemben del odziva na stres. Prav tako lahko kaže na stres ali kronično vnetje tudi število monocitov. Limfopenija in nevtrofilija lahko poleg odziva na stres predstavljata tudi vnetna stanja. Stresni odziv namreč spodbujajo tudi številne bolezni. Visoka raven fibrinogena in visoko število nezrelih nevtrofilcev kažeta na vnetje. V ta namen je treba izvesti morfologijo nevtrofilcev in koncentracijo fibrinogena v plazmi [133].

Drugi mogoči razlog za nevtrofilijo in limfocitozo bi lahko bila tudi garjavost s *Sarcoptes sp.* [28], vendar so bili, kot smo že omenili, naši kozorogi klinično zdravi in negativni na zunanje zajedavce.

Biokemični rezultati 12 kozorogov (šestih samcev in šestih samic) v naši raziskavi so pokazali, da so vrednosti znotraj referenčnih vrednosti, razen pri alfa-amilazi. Kot referenčne vrednosti smo uporabili vrednosti, ki veljajo za domačo kozo. Referenčna vrednost za alfa-amilazo znaša od 0 do 63 IU/L (Abaxis). V raziskavi smo v serumu pri vseh kozorogih zaznali povišane vrednosti ($M = 115,94$ IU/L), ki sicer ustrezajo referenčnim vrednostim za koze ($< 120,00$ IU/L) po podatkih, ki nam jih ponuja Laboklin [121]. Hkrati so visoke vrednosti ugotavljali tudi drugi avtorji, ki so izmerili tudi veliko višje vrednosti pri iberskih kozorogih ($N = 92$; povprečje 482,8; $min 2,9$; $max 3,280$ IU/L) [47].

Povišane vrednosti alfa-amilaze so lahko tudi pri pankreatitisu, vendar je malo verjetno, da bi vseh 12 kozorogov imelo isto zdravstveno težavo. Pankreatitis je omenjen na primer pri domačih malih prežvekovalcih [134] kot posledica okuženosti z metljaji iz rodu *Eurytrema*. Dovzetni so tudi kozorogi, zato bi se lahko prenesel tudi nanje, posebno v živalskih vrtovih, kjer je kontakt z domačimi prežvekovalci ožji in koncentracija živali večja. V svoji raziskavi te vrste helmintov nismo potrdili. Kozorogi so bili videti klinično zdravi.

Po našem mnenju je razlog za povišane vrednosti alfa-amilaze pri preiskovanih kozorogih lahko v odlovu in fiksaciji živali, ki doživljajo veliko večji stres kot domače koze. Čeprav Nater in sod. [59] navajajo, da se alfa-amilaza v krvi poveča po farmakološki aktivaciji adrenergične poti, za katero so odgovorni simpatični receptorji, ne potrjujejo hkrati tudi dejstva, da stres vpliva na povišano raven alfa-amilaze v krvi. Raziskave so bile narejene na ljudeh, kar pomeni, da bi bilo treba v tej smeri opraviti dodatne raziskave posebno pri živalih, kot so kozorogi, ki niso navajeni stika z ljudmi tako kot domače živali in odlov doživljajo še bolj stresno (slika 9).

Tretje hipoteze nismo potrdili, saj se je v nalogi izkazalo, da je za vzorčenje uporaba neinvazivnih metod manj primerna zaradi premajhne količine vzorca. Hematološke in biokemične preiskave smo uspeli opraviti le pri vzorcih, odvzetih z venepunkcijo.

V četrti hipotezi smo menili, da bo raven kortizola v vzorcih, odvzetih s tremi različnimi načini odvzema krvi (odvzem krvi z venepunkcijo in predhodno fiksacijo, odvzem s krvosesnimi stenicami na ležišču in medicinskimi pijavkami v globoki posodi), statistično značilno različna.

Za dokaz četrte hipoteze, pri kateri bi lahko odvzeli vzorce krvi z neinvazivnim pristopom, smo pripravili posebna ležišča, na katera smo v posodice, pokrite s kovinsko mrežico, namestili krvosesne stenice, v posodice, pokrite s posebno opno, pa medicinske pijavke. Krvosesne stenice in medicinske pijavke naj bi pile kri, ko bi živali počivale na teh ležiščih, po hranjenju pa bi se krvosesnim stenicam in medicinskim pijavkam odvzela kri iz prebavil.

Vzorčenje na ležišču se je v skupini živali pokazalo za manj uporabno, ker je dominantni samec ves čas zasedal najljubše ležišče, ostali dve ponujeni ležišči na drugih lokacijah pa sta ostajali nezasedeni. Ko so nižje rangirani samci zasedli najljubše ležišče, jih je dominantni samec vedno hitro pregnal in nismo mogli pridobiti zadostne količine vzorcev za analizo, ker so krvosesne stenice in medicinske pijavke sesale kri premalo časa. Pri dominantnem samcu, ki je vedno zasedal najljubše ležišče, smo z invazivno tehniko pridobili vzorce iz vseh medijev. Prav tako smo pri tem samcu določali testosteron v iztrebkih, dlaki in krvnih vzorcih (vse tri metode vzorčenja krvi). Zanimivo je, da smo pri dominantnem samcu ugotavljali najvišjo koncentracijo testosterona med vsemi samci ($N = 7$), vzporedno testiranimi na KORT in testosteron. Hkrati je bila pri dominantnem samcu vrednost koncentracije KORT najnižja v dlaki (16,00 ng/g), kar kaže, da je bil najmanj izpostavljen kroničnemu stresu. Istočasno je bila koncentracija KORT v iztrebkih najvišja (35,52 ng/g), kar kaže na akutni stres, ki sovпада s približevanjem paritvenega obdobja.

Pomemben rezultat, ki smo ga dobili z vzorčenjem s krvosnimi stenicami pri neinvazivnem pristopu na ležišču, je koncentracija KORT, ki je bila 1,05 ng/ml, v primerjavi s koncentracijo KORT v krvni plazmi, odvzeti s krvosnimi stenicami ob invazivnem pristopu z odlovom, ki je bila 51,52 ng/ml, kar kaže na povišano vrednost KORT zaradi stresa, ki ga povzroča odlov.

S to postavljeno hipotezo smo dokazali, da je neinvazivni način ob neinvazivnem pristopu odvzema krvnih vzorcev s krvosnimi stenicami in medicinskimi pijavkami na posebnem ležišču mogoč, vendar je primeren za živali, ki so nastanjene individualno in na manjših prostorih z enim ponujenim prostorom za počivanje (ležiščem).

Četrto hipotezo smo delno potrdili, saj smo uspeli odvzeti vzorec s krvosnimi stenicami in medicinskimi pijavkami z neinvazivnim pristopom na posebnem ležišču samo pri eni živali z uporabo krvosnih stenic. Koncentracija KORT je bila pri invazivnem pristopu v primerjavi z neinvazivnim veliko višja in statistično značilno različna.

V peti hipotezi smo predvideli, da bomo pred dehelmintizacijo (prisotnost notranjih zajedavcev) ugotavljali višjo raven kortizola kot tri tedne pozneje po opravljeni dehelmintizaciji in izvedenem zdravljenju.

Kratkotrajno zvišanje ravni glukokortikoidov je eden glavnih fizioloških mehanizmov, s katerimi se vretenčarji spopadajo z zahtevnimi okoljskimi ali socialnimi dejavniki. Če se izpostavljenost stresorjem pojavlja večkrat zapored ali kontinuirano v daljšem časovnem obdobju, lahko živali doživijo kronično zvišanje glukokortikoidov, kar zmanjša učinkovitost imunskega odziva in lahko povzroči večjo dovzetnost za okužbe, vključno s povečano intenzivnostjo parazitarnih okužb. Na splošno je znano dejstvo, da endoparaziti znižujejo odpornost živali in so posledično lahko eden od pomembnih stresnih dejavnikov [135].

Na primeru sivih veveric (*Sciurus carolinensis*) so raziskovalci uporabili strongilide in eimerije kot model za raziskovanje odnosov med invadiranostjo z zajedavci in koncentracijo FGCM. Rezultati so potrdili korelacijo med FGCM in invadiranostjo s strongilidi, ne pa tudi eimerijami.

Ugotovili so, da sta invadiranost in posledični stres lahko odvisna ne le od specifičnega odnosa gostitelj-zajedavec, temveč tudi od različnih drugih dejavnikov [135].

Defolie in sod., ki so raziskovali korelacijo med invadiranostjo z zajedavci in ravni KORT, pa so ugotovili, da ni povezav med parazitozo in povišano vrednostjo KORT, saj tretjina raziskav poroča o pozitivni, tretjina o negativni korelaciji med parazitozo in vrednostmi glukokortikoidov, tretjina pa ne zazna odnosa med KORT in glukokortikoidi [136].

V Živalskem vrtu Ljubljana je bilo pred sedmimi leti v skupini kozorogov potrjenih šest različnih vrst zajedavcev [36, 37]. V svoji raziskavi smo pri isti skupini kozorogov potrdili tri vrste zajedavcev. Rezultati so pokazali invadiranost s strongilidi (*max* 1050 EPG) in eimerijami (*max* 62000 OPG). V enem primeru smo potrdili invadiranost s kapilarijami (50 EPG). Testiranje je bilo znova izvedeno tri tedne po zdravljenju. Zdravljenje je bilo uspešno, kljub temu smo še vedno ugotavljali nizko invadiranost z eimerijami in strongilidi. Eimerije smo potrdili pri vseh 28 testiranih kozorogih (*max* 1300 OPG). Invadiranost s strongilidi je padla z 90,9 odstotka (22 testiranih in 20 pozitivnih) na 28,6 odstotka (28 testiranih in 8 pozitivnih).

Tudi v naši raziskavi smo vzporedno merili raven FGCM v iztrebkih. Ob primerjavi koncentracije FGCM pred dehelmintizacijo in po njej nismo ugotovili statistično pomembnih razlik med 15 kozorogi. Če smo izpostavili samo mlade kozoroge (letnika 2018 in 2019), ki so bolj občutljivi na parazitoze, smo ugotavljali razlike v koncentraciji FGCM pred dehelmintizacijo in po njej. Pri mladih živalih, starih manj kot 11 mesecev, je bila povprečna koncentracija FGCM pred dehelmintizacijo 23,45 ng/g iztrebkov, po dehelmintizaciji pa 17,70 ng/g. Pri živalih, starejših od 10 let, je bila povprečna koncentracija FGCM pred dehelmintizacijo povprečno 25,36 ng/g, po dehelmintizaciji pa 23,71 ng/g. Izračunana velikost učinka je bila pri mladih živalih $r = 0,65$ in pri starih $r = 0,24$, kar kaže, da je verjetnost vpliva dehelmintizacije na padec FGCM večja pri mladih živalih kot pri starih.

Pete hipoteze nismo potrdili, saj kljub uspešno izvedeni dehelmintizaciji vzorčenje in preiskave koncentracije KORT pred in po njej niso pokazale statistično pomembnih razlik.

V šesti hipotezi smo predvideli, da bomo jeseni (parjenje) ugotavljali višjo raven kortizola kot spomladi in poleti. Menili smo, da bomo ugotovili tudi statistično značilne korelacije med ravni kortizola in spolnimi hormoni.

Splošno znano dejstvo je, da agresivnost in dominantni položaj samca lahko povzročita stres pri določenih posameznikih v skupini, predvsem pri mladih in starih kozorogih ter samicah v času parjenja. Sica (2014) meni, da na socialni status alpskega kozoroga neposredno vpliva tako starost kot tudi telesna masa živali. Hkrati je ugotovil, da je ta neodvisen od koncentracije testosterona v iztrebkih [132]. V ogradah se v času aktivne reprodukcijske sezone vzpostavi hierarhija pri samcih in pri samicah, ki pa ne vodi do zvišanja ravni KORT pri dominantnih osebkih, ampak pri nižje rangiranih. Moreno s sodelavci (2007) je ugotovil, da se raven kortizola ob samem parjenju zviša zaradi spolne aktivnosti, ne pa zaradi dominantnosti [137].

V raziskavi smo pri samcih poleti in jeseni ugotavljali korelacijo med koncentracijo spolnih hormonov (testosteron) in koncentracijo FGCM v iztrebkih, jeseni pa smo ugotavljali tudi korelacijo med koncentracijo testosterona in KORT v krvi in dlaki. Pri samicah smo poleti in jeseni ugotavljali korelacijo med koncentracijo spolnih hormonov (estradiol) in koncentracijo FGCM v iztrebkih. Z raziskavo nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) med koncentracijo testosterona in koncentracijo FGCM v iztrebkih samcev. Do enakih rezultatov smo prišli pri samicah, pri katerih smo ugotavljali koncentracijo estradiola. Statistično značilnih korelacij ($p > 0,05$) med koncentracijo estradiola in FGCM v iztrebkih nismo ugotovili.

Naši rezultati kažejo podobno kot rezultati Sica (2014), da socialni status alpskega kozoroga in koncentracija FGCM v iztrebkih nista odvisna od koncentracije testosterona pri samcih oziroma estradiola pri samicah, čeprav smo pri dominantnem samcu tako poleti kot jeseni ugotavljali najvišjo koncentracijo FGCM (poleti 39,78 ng/g in jeseni 35,52 ng/g) in testosterona (poleti 5,05 ng/g in jeseni 15,95 ng/g) med vsemi testiranimi samci, kar je povezano z njegovo dominantnostjo na hierarhični lestvici.

Povišane vrednosti koncentracije FGCM in testosterona smo ugotovili tudi pri samcu št. 3, ki je bil drugorangirani v skupini in se je stalno boril za prevlado.

Šeste hipoteze nismo potrdili, saj med koncentracijo KORT v vzorcih, odvzetih poleti in jeseni, ter pridobljenih z venepunkcijo, slino in iztrebki (FGCM), nismo ugotovili statistično pomembnih razlik, je bila pa statistično značilna razlika med koncentracijo KORT v dlaki poleti in jeseni ($p < 0,001$).

6 SKLEPI

- Prisotnost KORT (oz. FGCM) smo potrdili v osmih različnih medijih (kri, pridobljena z venepunkcijo, krvosesi stenicami in medicinskimi pijavkami, dlaka, slina, solze, urin in iztrebki).
- Postopka vzorčenja urina in solz sta težko izvedljiva in v praksi manj uporabna.
- Ugotovljena koncentracija KORT (oz. FGCM) je najvišja v urinu in krvi, sledijo dlaka, iztrebki, solze in slina.
- Pri invazivnem pristopu (odlov in fiksacija) k odvzemu krvi se je odzem z medicinskimi pijavkami (*H. medicinalis*) pokazal kot primerna metoda. Rezultati so statistično primerljivi z rezultati odvzema z venepunkcijo.
- Odzem krvnih vzorcev pri posamezni živali s krvosesi stenicami in medicinskimi pijavkami na ležišču je pri živalih, ki živijo v skupini, težko izvedljiv. Metoda je izvedljiva, vendar je bolj uporabna pri izoliranih živalih.
- Koncentracija kortizola v vzorcu krvne plazme, odvzete s krvosesi stenicami ob neinvazivnem pristopu na ležišču, je bila nižja kot pri odvzemu krvne plazme s krvosesi stenicami ob invazivnem pristopu z odlovom in fiksacijo.
- Zbrane hematološke in biokemične preiskave krvi pri alpskih kozorogih so lahko pripomoček k hitrejši in ustrežnejši diagnostiki zdravstvenega stanja pri tej vrsti.
- Ob primerjavi koncentracije FGCM pred dehelmintizacijo in po njej nismo ugotovili statistično pomembnih razlik.
- Korelacija med KORT in spolnimi hormoni (testosteron, estrogen) ni bila potrjena.

7 POVZETEK

Pristop k vzorčenju pri divjih in netreniranih živalih predstavlja stres in nevarnost poškodb ob odlovu in fiksaciji za živali in osebe, ki izvaja odlov in vzorčenje, zato je bil namen doktorske naloge ugotoviti koncentracije KORT in FGCM v različnih medijih (kri, slina, solze, urin, dlaka in iztrebki) in korelacije med njimi ter primerjati vrednosti pri invazivnem in neinvazivnem pristopu k vzorčenju. Ob tem smo opravili hematološke, biokemične in parazitološke preiskave ter ugotavljali koncentracije spolnih hormonov in korelacije med KORT in FGCM z rezultati omenjenih preiskav. V raziskavo smo vključili 29 kozorogov treh starostnih skupin in obeh spolov v Živalskem vrtu Ljubljana.

Najvišjo povprečno koncentracijo KORT preiskovanih kozorogov smo izmerili v krvnih vzorcih, pridobljenih z venepunkcijo (95,10 ng/ml), in najnižjo koncentracijo v vzorcih, pridobljenih s krvosesnimi stenicami (51,35 ng/ml), pri odvzemu vzorcev z invazivnim pristopom. Ugotovljena je bila statistično pomembna razlika v koncentraciji KORT med venepunkcijo in krvosesnimi stenicami (Wilcoxon: $Z = -3,823$, $p < 0,001$). Povprečna koncentracija KORT v vzorcih, pridobljenih z medicinskimi pijavkami, je bila 78,29 ng/ml. V primerjavi z venepunkcijo nismo ugotovili statistično pomembne razlike (Wilcoxon: $Z = -1,650$, $p > 0,05$). Hkrati je bila ugotovljena statistično značilna razlika v koncentraciji KORT v vzorcih, pridobljenih s krvosesnimi stenicami, in v vzorcih, pridobljenih z medicinskimi pijavkami (Wilcoxon: $Z = -3,179$, $p < 0,01$), oboje je bilo izvedeno ob invazivnem pristopu. Pri vzorcu krvne plazme, pridobljene s pomočjo krvosesne stenice na ležišču ob neinvazivnem pristopu, smo ugotovili signifikantno nižjo vrednost (1,05 ng/ml) v primerjavi s krvno plazmo, odvzeto s krvosesnimi stenicami ob invazivnem pristopu (51,52 ng/ml) pri enem samcu.

Povprečna koncentracija KORT v dlaki preiskovanih kozorogov je bila 29,63 ng/g, v slini 12,63 ng/ml, v urinu 126,12 ng/ml in v solzah 13,28 ng/ml. Povprečna koncentracija FGCM v iztrebkih je bila 21,68 ng/g.

V slini smo ugotovili statistično značilno razliko v koncentraciji KORT med samci in samicami ($p < 0,05$). V serumu, pridobljenem z venepunkcijo, so bile izmerjene značilne statistične razlike ($p < 0,01$) v koncentraciji KORT med tremi starostnimi skupinami kozorogov. Rezultati iztrebkov so pokazali statistično pomembno razliko med kozorogi, mlajšimi od 10 mesecev, in kozorogi, starejšimi od 10 let (Mann-Whitney: $Z = 21,89$, $p < 0,001$). V dlaki je bila ugotovljena statistično pomembna razlika med koncentracijo KORT, vzorčeno poleti in jeseni ($p < 0,001$). Višjo koncentracijo KORT smo ugotavljali jeseni (35,95 ng/g).

Pred dehelmintizacijo smo potrdili invadiranost s strongilidi (90,9 %), eimerijami (100,0 %) in kapilarijami (4,5 %). Tri tedne po zdravljenju je invadiranost padla tako po številu invadiranih živali kot tudi po stopnji invadiranosti. Ugotavljali smo 28,6-odstotno invadiranost s strongilidi, 100,0-odstotno z eimerijami in 0,0-odstotno s kapilarijami. Število oocist eimerij je padlo s 627.200 na največ 1300 OPG/g iztrebka. Med koncentracijo FGCM pred dehelmintizacijo in tri tedne po njej nismo ugotovili statistično pomembnih razlik ($p > 0,1$). Ob izračunu vrednosti r te nakazujejo na razlike pri mladih kozorogih, pri katerih je bila vrednost $r = 0,65$.

Med koncentracijo KORT oziroma FGCM in spolnimi hormoni (testosteron, estradiol) nismo potrdili statistično značilne korelacije ($p > 0,05$).

Delež nevtrofilcev je bil v povprečju nad referenčnimi vrednostmi za koze, delež limfocitov pa pod njimi. Vrednosti alfa-amilaze (115,94 U/L) so se pri vseh kozorogih gibale nad referenčnimi vrednostmi (referenčne vrednosti od 0 do 63 U/L).

V nalogi smo ugotovili, da lahko KORT ugotavljamo v različnih medijih (kri, iztrebki, slina, dlaka, urin in solze). Za zmanjševanje stresa in nevarnosti pri odlovu tako za živali kot za osebe, ki sodeluje pri odlovu, je najbolj pomemben neinvazivni pristop k vzorčenju, kar smo potrdili z uporabo krvosernih stenic in medicinskih pijavk na posebnem ležišču, kar pa je lažje izvedljivo pri posameznih in izoliranih živalih kot pri večjih skupinah v velikih ogradah.

8 SUMMARY

Sampling wild, untrained animals by capturing and restraining them causes stress and risk of injury to both the animal and the staff capturing the animal and performing the sampling. Therefore, the aim of this doctoral dissertation was to determine cortisol and FGCM concentrations in various media (blood, saliva, tears, urine, hair, and faeces) as well as correlations between them, and to compare values obtained using an invasive and non-invasive sampling approach. Haematological, biochemical, and parasitological tests were performed, and sex hormone concentrations and correlations between cortisol and FGCM were established based on the results of these tests. The study included 29 Alpine ibex from the Ljubljana Zoo, representing three age groups and both sexes.

Using an invasive sampling approach, the highest average cortisol concentration in the ibex investigated was measured in samples collected through venipuncture (95.10 ng/ml), and the lowest concentration was established in samples obtained using bloodsucking bugs (51.35 ng/ml). There was a statistically significant difference in cortisol concentration between the samples collected through venipuncture and those obtained with bloodsucking bugs (Wilcoxon: $Z = -3.823$, $p < 0.001$). The average cortisol concentration in samples collected with medicinal leeches was 78.29 ng/ml. No statistically significant difference compared to venipuncture was established (Wilcoxon: $Z = -1.650$, $p > 0.05$). At the same time, a statistically significant difference in cortisol concentration was established between samples collected with bloodsucking bugs and those collected with medicinal leeches (Wilcoxon: $Z = -3.179$, $p < 0.01$); an invasive approach was used for both. In a blood plasma sample collected with bloodsucking bugs on a bed using a non-invasive approach, a significantly lower value (1.05 ng/ml) compared to blood plasma collected using an invasive approach with bloodsucking bugs (51.52 ng/ml) was established in one dominant male.

The average cortisol concentration established for the ibex investigated was 29.63 ng/g in hair, 12.63 ng/ml in saliva, 126.12 ng/ml in urine, and 13.28 ng/ml in tears. The average FGCM concentration in faeces was 21.68 ng/g.

A statistically significant difference in cortisol concentration in saliva was established between males and females ($p < 0.05$). In the serum obtained through venipuncture, statistically significant differences ($p < 0.01$) in cortisol concentration were measured between the three ibex age groups. The faecal test results showed a statistically significant difference between ibex younger than 10 months and those older than 10 years (Mann–Whitney: $Z = 21.89$, $< 0,001$). A statistically significant difference in cortisol concentration in hair was found between the samples collected in summer and those collected in autumn ($p < 0.001$). A higher cortisol concentration was established in autumn (35.95 ng/g).

Infestation with Strongylida (90.9%), *Eimeria* (100.0%), and *Capillaria* (4.5%) was confirmed before deworming. The number of animals infested and the degree of infestation decreased 3 weeks after treatment. Infestation with Strongylida was 28.6%, with *Eimeria* 100.0%, and with *Capillaria* 0.0%. The number of *Eimeria* oocysts decreased from 627,200 to a maximum of 1,300 per gram of faeces. No statistically significant differences were established in FGCM concentration before and 3 weeks after deworming ($p > 0.1$). The r values calculated indicate differences in young ibex ($r = 0.65$).

No statistically significant correlation between cortisol or FGCM concentrations and sex hormones (testosterone, estradiol) was confirmed ($p > 0.05$).

The average share of neutrophils was above the reference values for goats, and the share of lymphocytes was below them. The alpha-amylase values (115.94 U/l) were above the reference values (0–63 U/l) in all ibex.

The dissertation established that cortisol can be measured in various media (blood, faces, saliva, hair, urine, and tears). In catching the animals for sampling purposes, a non-invasive sampling approach is the most suitable to reduce stress and risk of injury to both the animals and the participating staff. This was also confirmed by using bloodsucking bugs and medicinal leeches on a special bed. However, this is easier to perform on individual and isolated animals than on larger groups in large enclosures.

9 ZAHVALA

Največjo zahvalo moram nameniti moji mentorici prof. dr. Alenki Dovč, ki do zadnjega ni obupala nad menoj, saj mi stoji ob strani že od začetkov mojega strokovnega napredovanja in bo zame vedno vzor pravega učitelja. Neizmerna hvala za vse ure, dneve in leta, ko si morala potrpeti z menoj.

Iskrena hvala tudi somentorici prof. dr. Gordani Gregurić Gračner, ki naju je vedno bodrila in znala usmerjati, ko bi lahko zašla.

Iskrena hvala članoma komisije prof. dr. Martinu Dobeicu in prof. dr. Marku Samardžiji, ki sta s skrbnim pregledom in konstruktivnimi pripombami pomagala oblikovati ta doktorat. Največjo težo med njimi je na svoja pleča vzela predsednica komisije prof. dr. Nina Čebulj Kadunc, ki je s svojimi nasveti pomagala nalogo obtesati, obrusiti, spolirati in na koncu še polakirati.

Velika zahvala gre tudi kolegom iz Inštituta za perutnino, ptice, male sesalce in plazilce pri pripravi vzorcev in ob tem moram nameniti zahvalo prof. dr. Ivanu Mrzelu, ki mi je prvi pokazal skrivnosti znanstveno raziskovalnega dela. Hvala tudi Boštjanu Drolcu iz Endokrinološkega laboratorija Inštituta za predklinične vede na Veterinarski fakulteti UL, za veliko dela opravljenega z vzorci.

Za širjenje obzorja pri strokovnih člankih je pomembno delo opravil prof. dr. Robert Frangež, za kar sem mu še posebej hvaležen.

Da smo se vedno držali rokov in je bilo vse pravilno oddano, gre iskrena zahvala Biljani Grubišič, za pravilno oblikovanje naloge in vse preglede pa knjižničarkam Veterinarske fakultete, Stanislavi Ujc, Slavici Sekulič in dr. Metki Šimundič.

Nikakor pa doktorat ne bi mogel nastati brez izjemne pomoči mojih sodelavcev v Živalskem vrtu Ljubljana, kjer ekipi veterinarske ambulante nikoli ni bilo škoda časa in truda ob vzorčenju, pripravi vzorcev in spodbujanju. Posebej bi rad omenil kolega dr. Pavla Kvapila, ki je bil vlečni konj pri strokovni in znanstveni rasti veterine in posameznikov v Živalskem vrtu Ljubljana in direktorici Barbari Mihelič, ki je dovolila in podprla opravljanje naloge na živalih v Živalskem vrtu Ljubljana. Neizmerna zahvala gre tudi oskrbnikom, saj brez njihove pomoči odlov in vzorčenje ne bi bila mogoča, ter vsem ostalim sodelavcem, ki so me bodrili in ob tem tudi opominjali, da bo počasi treba končati z nalogo. Največji doprinos so imeli meni dragi kozorogi, ki so sodelovali v nalogi in dali vse vzorce, z pomočjo katerih smo lahko izpeljali doktorat.

Na koncu bi se rad zahvali še moji družini. Staršem, ki so me sprejeli kot veterinarja, sestri Damjani, ki je prva odprla vrata doktoratom v naši družini, tašči Ljubi, ki mi je vedno stala ob strani in tastu Andreju.

Predvsem gre zahvala moji dragi ženi Petri in otrokom Evi, Galu in Tei, ki so morali velikokrat prilagoditi svoje življenje mojemu poklicu in niso obupali nad menoj tudi takrat, ko sem razmišljal, da bi se mogoče že raje prepisal na univerzo za tretje življenjsko obdobje.

10 LITERATURA

1. WAZA. Animal welfare. Barcelona: World association of zoos and aquariums. <https://www.waza.org/priorities/animal-welfare/> (12. 4. 2024).
2. Schilling AK, Mazzamuto MV, Romeo C. A review of non-Invasive sampling in wildlife disease and health research: What's new? *Animals (Basel)* 2022; 12. doi: 10.3390/ani12131719
3. Kagan R, Carter S, Allard S. A universal animal welfare framework for zoos. *J Appl Anim Welf Sci* 2015; (18 suppl 1.): S1–10. doi: 10.1080/10888705.2015.1075830
4. Jones N, Sherwen SL, Robbins R, McLelland DJ, Whittaker AL. Welfare assessment tools in zoos: from theory to practice. *Vet Sci* 2022; 9: 170. doi: 10.3390/vetsci9040170
5. Bayazit V. Evaluation of Cortisol and Stress in Captive Animals. *Aust j basic appl sci* 2009; 3: 1022-31.
6. Van Herck H, Baumans V, Brandt CJ, et al. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Lab Anim* 2001; 35: 131-9. doi: 10.1258/0023677011911499
7. Meyer N, Kröger M, Thümmeler J, Tietze L, Palme R, Touma C. Impact of three commonly used blood sampling techniques on the welfare of laboratory mice: Taking the animal's perspective. *PLoS One* 2020; 15: e0238895. doi: 10.1371/journal.pone.0238895
8. Stadler A, Meiser CK, Schaub GA. "Living syringes": use of Hematophagous bugs as blood samplers from small and wild animals. In: Mehlhorn H, ed. *Nature helps: how plants and other organisms contribute to solve health problems*. Berlin: Springer, 2011: 243–71. doi: 10.1007/978-3-642-19382-8_11
9. Parrini F, Cain JW, Krausman PR. *Capra ibex* (Artiodactyla: Bovidae). *Mamm Species* 2009; 830: 1–12. doi: 10.1644/830.1
10. Stüwe M, Nievergelt B. Recovery of alpine ibex from near extinction: the result of effective protection, captive breeding, and reintroductions. *Appl Anim Behav Sci* 1991; 29: 379–87. doi: 10.1016/0168-1591(91)90262-V
11. Grossen C, Biebach I, Angelone-Alasaad S, Keller LF, Croll D. Population genomics analyses of European ibex species show lower diversity and higher inbreeding in reintroduced populations. *Evol Appl* 2018; 11: 123–39. doi: 10.1111/eva.12490
12. Espinosa J, López-Olvera JR, Cano-Manuel FJ, et al. Guidelines for managing captive Iberian ibex herds for conservation purposes. *J Nat Conserv* 2017; 40: 24–32. doi: 10.1016/j.jnc.2017.09.002
13. Kvapil P, Kastelic M, Jež N, et al. Detection of antibodies against Tick-Borne Encephalitis Virus in zoo animals using non-invasive blood sampling with Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*). *Pathogens* 2021; 10: 952. doi: 10.3390/pathogens10080952
14. Kvapil P, Tomašek O, Bartova E, et al. Validation of Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) as a non-invasive blood sampling tool for hematology and biochemistry profiling in mammals. *Front Vet Sci* 2022; 9: 831–6. doi: 10.3389/fvets.2022.831836

15. Parrini F, Grignolio S, Luccarini S, Bassano B, Apollonio M. Spatial behaviour of adult male Alpine ibex *Capra ibex ibex* in the Gran Paradiso National Park, Italy. *Acta Theriol* 2003; 48: 411–23. doi: 10.1007/BF03194179
16. Francisci F, Focardi S, Boitani L. Male and female Alpine ibex: phenology of space use and herd size. In: Lovari S, ed. *The biology and management of mountain ungulates*. London: Croom Helm, 1985: 124–33.
17. Villaret JC, Bon R. Social and spatial segregation in Alpine ibex (*Capra ibex*) in Bargy, French Alps. *Ethology* 1995; 101: 291–300. doi: 10.1111/j.1439-0310.1995.tb00366.x
18. Zingg A. Seasonal variability in the diet composition of Alpine ibex (*Capra ibex ibex* L.) in the k Swiss National Park. Zurich: University of Zurich, Institute of Zoology, 2009. Master thesis.
19. Stüwe M, Grodinsky C. Reproductive biology of captive alpine ibex (*Capra i. ibex*). *Zoo Biol* 1987; 6: 331–9. doi: 10.1002/zoo.1430060407
20. Turchetto S, Obber F, Rossi L, et al. Sarcoptic mange in wild caprinae of the Alps: could pathology help in filling the gaps in knowledge? *Front Vet Sci* 2020; 7: 193. doi: 10.3389/fvets.2020.00193
21. Danieli C, Sarasa M. Population estimates, density–dependence and the risk of disease outbreaks in the Alpine ibex *Capra ibex*. *Anim Biodivers Conserv* 2015; 38: 101–19. doi: 10.32800/abc.2015.38.0101
22. Kim J, Pham L, Jang Y, et al. Isolation and characterization of *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* in Korean black goat (*Capra hircus aegagrus*). *Arch Med Vet* 2015; 47: 387–90.
23. Belloy L, Giacometti M, Boujon P, Waldvogel A. Detection of *Dichelobacter nodosus* in wild ungulates (*Capra ibex ibex* and *Ovis aries musimon*) and domestic sheep suffering from foot rot using a two-step polymerase chain reaction. *J Wildl Dis* 2007; 43: 82–8. doi: 10.7589/0090-3558-43.1.82
24. Marreros N, Hüsey D, Albini S, et al. Epizootiologic investigations of selected abortive agents in free-ranging Alpine ibex (*Capra ibex ibex*) in Switzerland. *J Wildl Dis* 2011; 47: 530–43. doi: 10.7589/0090-3558-47.3.530
25. Garin-Bastuji B, Hars J, Drapeau A, et al. Reemergence of *Brucella melitensis* in wildlife, France. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1570–1. doi: 10.3201/eid2009.131517
26. Lambert S, Thébault A, Rossi S, et al. Targeted strategies for the management of wildlife diseases: the case of brucellosis in Alpine ibex. *Vet Res* 2021; 52: 1–16. doi: 10.1186/s13567-021-00984-0
27. Unterköfler MS, Schausberger M, Deutz A, et al. Sarcoptic mange in wild ungulates in the European Alps – a systematic review. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2023; 22: 121–5. doi: org/10.1016/j.ijppaw.2023.10.003
28. Bravo AR. Pathophysiology of sarcoptic mange in Iberian ibex. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, 2019. Doctoral thesis.
29. Zanet S, Ferroglio E, Orlandini F, Bassano B, Battisti E, Brambilla A. Bronchopulmonary nematodes in Alpine ibex: shedding of first stage larvae analyzed at the individual host level. *Front Vet Sci* 2021; 8: 663268. doi: 10.3389/fvets.2021.663268
30. Cassini R, Párraga MA, Signorini M, et al. Lungworms in Alpine ibex (*Capra ibex*) in the eastern Alps, Italy: an ecological approach. *Vet Parasitol* 2015; 214: 132–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.026

31. Marreros N, Frey CF, Willisich CS, Signer C, Ryser-Degiorgis M-P. Coprological analyses on apparently healthy Alpine ibex (*Capra ibex ibex*) from two Swiss colonies. *Vet Parasitol* 2012; 186: 382–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.009
32. Giacometti M, Janovsky M, Belloy L, Frey J. Infectious keratoconjunctivitis of ibex, chamois and other Caprinae. *Rev Sci Tech* 2002; 21: 335–45. doi: 10.20506/rst.21.2.1338
33. Valldeperes M, Yerro PP, López-Olvera JR, et al. Diseases of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Eur J Wildl Res* 2023; 69: 63. doi: 10.1007/s10344-023-01684-0
34. Zooinstitutes. Alpine ibex / *Capra ibex* at zoos worldwide on zooinstitutes. <https://zooinstitutes.com/animals/alpine-ibex-334/> (5. 4. 2024).
35. Uredba (EU) 2016/429 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 9. marca 2016 o prenosljivih boleznih živali in o spremembi ter razveljavitvi določenih aktov na področju zdravja živali („Pravila o zdravju živali“). *Ur List EU* 2016; L 84/1. <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/429/oj> (8. 5. 2024)
36. Kvapil P, Kastelic M, Dovč A, et al. An eight-year survey of the intestinal parasites of carnivores, hoofed mammals, primates, ratites and reptiles in the Ljubljana zoo in Slovenia. *Folia Parasitol (Praha)* 2017; 64: 013. doi: 10.14411/fp.2017.013
37. Kvapil P, Kastelic M, Dovč A, Štrus Š, Bartova E. Five-year survey of the intestinal parasites in reptiles, ratites, hoofed mammals, carnivores and primates in ZOO Ljubljana. In: *Proceedings of the International conference on diseases of zoo and wild animals, 13th - 16th May 2015, Barcelona, Spain*. Berlin: Institute for zoo and wildlife research, 2015: 146–9.
38. European association of zoos and aquaria. EAZA standards for the accommodation and care of animals in zoos and aquaria. <https://www.eaza.net/assets/Uploads/EAZA-Documents-2022/2022-04-EAZA-Standards-for-Accommodation-and-Care.pdf> (4. 4. 2024).
39. Dehnhard M, Jewgenow K. Measurement of faecal prostaglandins in felids and three ursid species. *Wien Tierärztl Monatsschr* 2013; 100: 227–37.
40. Schwarzenberger F, Francke R, Goltenboth R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). *J Reprod Fertil* 1993; 98: 285–91. doi: 10.1530/jrf.0.0980285
41. Schwarzenberger F, Brown J. Hormone monitoring: an important tool for the breeding management of wildlife species. *Wien Tierärztl Monatsschr* 2013; 100: 209–25.
42. Ellis T, Sanders M, Scott A. Non-invasive monitoring of steroids in fishes. *Wien Tierärztl Monatsschr* 2013; 100: 255–69.
43. Wolfensohn S, Shotton J, Bowley H, Davies S, Thompson S, Justice WSM. Assessment of welfare in zoo animals: Towards optimum quality of life. *Animals (Basel)* 2018; 8: 110. doi: 10.3390/ani8070110
44. Prandi A, Peric T, Corazzin M, Comin A, Colitti M. A first survey on hair cortisol of an Alpine ibex (*Capra ibex ibex*) population. *Anim Sci Pap Rep* 2018; 36: 57–74.
45. Kastelic M, Gregurić Gračner G, Tomažič I, Kvapil P, Harej M, Dovč A. Comparison of cortisol concentrations in different matrices in Alpine ibex (*Capra ibex*) at the zoo. *Animals (Basel)* 2023; 13: 2491. doi: 10.3390/ani13152491

46. Sartorelli P, Agnes F, Lanfranchi P. Pathophysiological significance of hematochemical parameters of *Capra ibex*. *Hystrix Ital J Mamm* 1997; 9: 39–44. doi: 10.4404/hystrix-9.1-2-4107
47. Perez JM, Gonzalez FJ, Granados JE, et al. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. *J Wildl Dis* 2003; 39: 209–15. doi: 10.7589/0090-3558-39.1.209
48. Casas - Díaz E, López - Olvera JR, Marco I, Mentaberre G, Lavín S. Hematologic and biochemical values for spanish ibex (*Capra Pyrenaica*) captured via drive-net and box-trap. *J Wildl Dis* 2008; 44: 965–72. doi: 10.7589/0090-3558-44.4.965
49. Russell WMS, Burch RL, Hume CW. *The principles of humane experimental technique*: Methuen London; 1959.
50. Romano MC, Rodas AZ, Valdez RA, et al. Stress in wildlife species: noninvasive monitoring of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17: 209-12.
51. Pérez JM, González FJ, Serrano E, et al. Is blood collected from shot Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) useful for monitoring their physiological status? *European Journal of Wildlife Research* 2006; 52: 125-31.
52. Kruszewicz A, Grothmann P, Czujkowska A, Stadler A, Lawrenz A, Schaub G. Wykorzystanie krwiopijnych pluskwiaków do pobierania próbek krwi od zwierząt egzotycznych - Use of kissing bugs for blood sampling of exotic animals. *Życie Wet* 2009; 84: 405–7.
53. Karaer MC, Čebulj-Kadunc N, Snoj T. Stress in wildlife: comparison of the stress response among domestic, captive, and free-ranging animals. *Front Vet Sci* 2023; 10: 1167016. doi: 10.3389/fvets.2023.1167016
54. Suba-Bokodi É, Nagy I, Molnár M. The impact of transportation on the cortisol level of dwarf rabbits bred to animal-assisted interventions. *Animals (Basel)* 2024; 14: 664. doi: 10.3390/ani14050664
55. Wright KD, Hickman R, Laudenslager ML. Hair cortisol analysis: a promising biomarker of HPA activation in older adults. *Gerontologist* 2015; 55 (suppl. 1): S140–5. doi: 10.1093/geront/gnu174
56. Sergiel A, Cattet M, Kapronczai L, et al. Do follicles matter? Testing the effect of follicles on hair cortisol levels. *Conserv Physiol* 2020; 8: coaa003. doi: 10.1093/conphys/coaa003
57. Rapp-Santos KJ, Altamura LA, Norris SL, Lugo-Roman LA, Rico PJ, Hofer CC. Comparison of saliva collection methods for the determination of salivary cortisol levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*), *Cynomolgus* macaques (*Macaca fascicularis*), and African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2017; 56: 181-9.
58. Behringer V, Borchers C, Deschner T, Mostl E, Selzer D, Hohmann G. Measurements of salivary alpha amylase and salivary cortisol in hominoid primates reveal within-species consistency and between-species differences. *PLoS One* 2013; 8: e60773. doi: 10.1371/journal.pone.0060773
59. Nater UM, La Marca R, Erni K, Ehlert U. Alpha-amylase activity in blood increases after pharmacological, but not psychological, activation of the adrenergic system. *PLoS One* 2015; 10: e0130449. doi: 10.1371/journal.pone.0130449
60. El-Farhan N, Rees DA, Evans C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough? *Ann Clin Biochem* 2017; 54: 308–22. doi: 10.1177/0004563216687335

61. Turpeinen U, Hämäläinen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 795-801. doi: 10.1016/j.beem.2013.10.008
62. Hart KA, Kitchings KM, Kimura S, Norton NA, Myrna KE. Measurement of cortisol concentration in the tears of horses and ponies with pituitary pars intermedia dysfunction. *Am J Vet Res* 2016; 77: 1236-44. doi: 10.2460/ajvr.77.11.1236
63. Monk CS, Hart KA, Berghaus RD, Norton NA, Moore PA, Myrna KE. Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and after simulated stress. *Vet Ophthalmol* 2014; (17 suppl 1.): 53-60. doi: 10.1111/vop.12128
64. Markvardsen SN, Kjelgaard-Hansen M, Ritz C, Sorensen DB. Less invasive blood sampling in the animal laboratory: clinical chemistry and haematology of blood obtained by the Triatominae bug *Dipetalogaster maximus*. *Lab Anim* 2012; 46: 136-41. doi: 10.1258/la.2011.011063
65. Schaub GA. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. In: Simpson SJ, Casas J, eds. *Adv Insect Physiol*, 2009; 36: 177-242. doi: 10.1016/S0065-2806(09)37004-6
66. Spencer W, Jones G. The captive breeding and educational display of the Medicinal leech *Hirudo medicinalis* (Linnaeus 1758) at Bristol Zoo Gardens. *Int Zoo Yearb* 2007; 41: 138-44. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2007.00005.x>
67. Bauch C, Wellbrock AHJ, Nagel R, Rozman J, Witte K. "Bug-eggs" for common swifts and other small birds: Minimally-invasive and stress-free blood sampling during incubation. *J Ornithol* 2013; 154: 581-5. doi: 10.1007/s10336-013-0931-x
68. Will R. Serologische normalwerte und deren krankhafte veränderungen bei reptilien (Squamata). Stuttgart: Universität Hohenheim, Fakultät Biologie, 1971. Diploma thesis.
69. Vieira CB, Praça YR, Bentes K, et al. Triatomines: trypanosomatids, bacteria, and viruses potential vectors? *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 405. doi: 10.3389/fcimb.2018.00405
70. Alzogaray RA, Zerba EN. *Rhodnius prolixus* intoxicated. *J Insect Physiol* 2017; 97: 93-113. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.04.004
71. Lent H, Wygodzinsky PW. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Museum Nat Hist* 1979; 163: 123-520.
72. Buxton PA. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Trans R Entomol Soc Lond* 1930; 78: 227-56. doi: 10.1111/j.1365-2311.1930.tb00385.x
73. Eberhard FE. Example of the hemimetabolic life cycle of the predatory triatomine bug *Rhodnius prolixus*. <https://aktuelles.uni-frankfurt.de/english/how-the-chagas-pathogen-changes-the-intestinal-microbiota-of-predatory-bugs/> (5. 4. 2024).
74. Orchard I, Leyria J, Al-Dailami A, Lange AB. Fluid secretion by malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: neuroendocrine nontrol with new insights from a transcriptome analysis. *Front Endocrinol* 2021; 12. doi: 10.3389/fendo.2021.722487
75. Lehane MJ. The biology of blood-bucking in insects. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2005.

76. Voigt CC, Peschel U, Wibbelt G, Frölich K. An alternative, less invasive blood sample collection technique for serologic studies utilizing triatomine bugs (Heteroptera; Insecta). *J Wildl Dis* 2006; 42: 466–9. doi: 10.7589/0090-3558-42.2.466
77. Whitaker IS, Rao J, Izadi D, Butler PE. Historical article: *Hirudo medicinalis*: Ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2004; 42: 133–7. doi: 10.1016/S0266-4356(03)00242-0
78. Lemke S, Vilcinskas A. European Medicinal leeches - New roles in modern medicine. *Biomedicines* 2020; 8: 99. doi: 10.3390/biomedicines8050099
79. Hildebrandt JP, Lemke S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften* 2011; 98: 995-1008. doi: 10.1007/s00114-011-0859-z
80. Shakouri A, Wollina U. Time to change theory; medical leech from a molecular medicine perspective leech salivary proteins playing a potential role in medicine. *Adv Pharm Bull* 2021; 11: 261–6. doi: 10.34172/apb.2021.038
81. Shakouri A, Adljouy N, Balkani S, et al. Effectiveness of topical gel of medical leech (*Hirudo medicinalis*) saliva extract on patients with knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. *Complement Ther Clin Pract* 2018; 31: 352-9. doi: 10.1016/j.ctcp.2017.12.001
82. Zengin S, Yarbil P, Kilic H, Al B. Prolonged bleeding due to a medicinal leech bite: another treatment method, primary suture. *BMJ Case Rep* 2012: bcr0220125759. doi: 10.1136/bcr.02.2012.5759
83. Lent CM, Fliegner KH, Freedman E, Dickinson MH. Ingestive behaviour and physiology of the medicinal leech. *J Exp Biol* 1988; 137: 513–27. doi: 10.1242/jeb.137.1.513
84. Wells MD, Manktelow RT, Boyd JB, Bowen V. The medical leech: an old treatment revisited. *Microsurgery* 1993; 14: 183–6. doi: 10.1002/micr.1920140309
85. Rigbi M, Levy H, Eldor A, et al. The saliva of the medicinal leech *hirudo medicinalis*—II. inhibition of platelet aggregation and of leukocyte activity and examination of reputed anaesthetic effects. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1987; 88: 95–8. doi: 10.1016/0742-8413(87)90052-1
86. Selye H. The Evolution of the Stress Concept: The originator of the concept traces its development from the discovery in 1936 of the alarm reaction to modern therapeutic applications of syntoxic and catatoxic hormones. *American scientist* 1973; 61: 692-9.
87. Romero LM. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends in ecology & evolution* 2004; 19: 249-55.
88. Lu S, Wei F, Li G. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell stress* 2021; 5: 76.
89. Engelking LR. ACTH and glucocorticoids: II. In: Engelking LR, ed. *Metabolic and endocrine physiology*. 3rd ed. Jackson: Teton NewMedia, 2012: 44–5.
90. Greco DS, Stabenfeldt GH. Endocrine glands and their function. In: Cunningham JG, Klein BG, eds. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2013: 374–407.

91. Botía M, Escribano D, Martínez-Subiela S, et al. Different types of glucocorticoids to evaluate stress and welfare in animals and humans: General concepts and examples of combined use. *Metabolites* 2023; 13: 106. doi: 10.3390/metabo13010106
92. Engelking LR. ACTH and glucocorticoids: III. In: Engelking LR, ed. *Metabolic and endocrine physiology*. 3rd ed. Jackson: Teton NewMedia 2012: 46–7.
93. Mormede P, Andanson S, Auperin B, et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92: 317–39. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.12.003
94. Follenius M, Simon C, Brandenberger G, Lenzi P. Ultradian plasma corticotropin and cortisol rhythms: time-series analyses. *J Endocrinol Invest* 1987; 10: 261–6. doi: 10.1007/bf03348128
95. Olsson T, Sapolsky R. The healthy cortisol response. In: Arnetz BB, Ekman R, eds. *Stress in health and disease*. Hoboken: Wiley, 2006: 214–25. doi: 10.1002/3527609156.ch11
96. Petroff B, Greco D. Endocrine glands and their function. In: Klein BG, ed. *Cunningham's textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2020: 394–427. doi: 10.1016/B978-0-323-55227-1.00034-X
97. Ralph CR, Tilbrook AJ. The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *J Anim Sci* 2016; 94: 457–70. doi: 10.2527/jas.2015-9645
98. Kvapil P, Pirš T, Slavec B, et al. Tear production, intraocular pressure and conjunctival bacterial flora in selected captive wild ruminants. *Vet Ophthalmol* 2018; 21: 52–7. doi: 10.1111/vop.12478
99. Nedić S, Pantelić M, Vranjes-Durić S, et al. Cortisol concentrations in hair, blood and milk of Holstein and Busha cattle. *Slov Vet Res* 2017; 54: 163–72. doi: 10.26873/SVR-398-2017
100. Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1040: 162–71. doi: 10.1196/annals.1327.021
101. Touma C, Palme R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1046: 54–74. doi: 10.1196/annals.1343.006
102. Cook NJ. Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can J Anim Sci* 2012; 92: 227–59. doi: 10.4141/cjas2012-045
103. Verkerk G, Phipps A, Carragher J, Matthews L, Stelwagen K. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Anim Welf* 1998; 7: 77–86. doi: 10.1017/S0962728600020273
104. Sgorlon S, Fanzago M, Guiatti D, Gabai G, Stradaoli G, Stefanon B. Factors affecting milk cortisol in mid lactating dairy cows. *BMC Vet Res* 2015; 11: 259. doi: 10.1186/s12917-015-0572-9
105. Macbeth BJ, Cattet MRL, B SG, Gibeau ML, Janz DM. Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging grizzly bears (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Can J Zoo* 2010; 88: 935–49. doi: 10.1139/z10-057

106. Murtagh R, Behringer V, Deschner T. LC-MS as a method for non-invasive measurement of steroid hormones and their metabolites in urine and faeces of animals. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2013; 100: 247–54.
107. DeBoer S, Garner J, McCain R, Lay D, Eicher S, Marchant J. An initial investigation into the effects of isolation and enrichment on the welfare of laboratory pigs housed in the PigTurn® system, assessed using tear staining, behaviour, physiology and haematology. *Anim Welf* 2015; 24: 15–27. doi: 10.7120/09627286.24.1.015
108. Gregurić Gračner G, Pavičić Ž, Žužul S, et al. Monitoring saliva cortisol level in dairy goats during April, May and July in a semi-intensive rearing system. *Vet Stanica* 2018; 49: 179–85.
109. Singh S, Ramachandran N, Sharma N, Singh M, Rahal A. Lipopolysaccharide exposure modifies salivary and circulating level of cortisol in goats. *Small Rumin Res* 2018; 162: 30–3. doi: 10.1016/j.smallrumres.2018.02.010
110. Palme R, Touma C, Arias N, Dominchin F, Lepschy M. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. *Wien Tierarztl Monatsschr* 2013; 100: 238–46.
111. Hunninck L, Ringstad IH, Jackson CR, et al. Being stressed outside the park—conservation of African elephants (*Loxodonta africana*) in Namibia. *Conserv Physiol* 2017; 5. doi: 10.1093/conphys/cox067
112. Guerriero G. Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1163: 154–68. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04460.x
113. Adams JS. "Bound" to work: the free hormone hypothesis revisited. *Cell* 2005; 122: 647–9. doi: 10.1016/j.cell.2005.08.024
114. ElAttar TM, Hugoson A. Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog. *J Periodontal Res* 1974; 9: 284–9. doi: 10.1111/j.1600-0765.1974.tb00683.x
115. Siiteri PK, Wilson JD. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 113–25. doi: 10.1210/jcem-38-1-113
116. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987; 8: 1–28. doi: 10.1210/edrv-8-1-1
117. Harwood D, Mueller K. Reproductive system. In: Harwood D, Mueller K, eds. *Goat medicine and surgery*. Boca Raton: CRC Press, 2018: 21–59. doi: 10.4324/9781315152233
118. Cook RA, Roskop ML, Bowerman DL. Hematologic and serum chemistry values for captive Alpine ibex, *Capra ibex ibex*. *J Zoo Anim Med* 1986; 17: 65–8. doi: 10.2307/20094797
119. Peinado VI, Fernandez-Arias A, Viscor G, Palomeque J. Haematology of Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) restrained by physical or chemical means. *Vet Rec* 1993; 132: 580–3. doi: 10.1136/vr.132.23.580
120. Zoetis Inc. Vetscan[†] HM5 Reference Intervals (Additional Species). https://www.zoetisus.com/content/_assets/docs/Diagnostics/technical-papers/HM5-Reference-Ranges-iPad-VTS-00426.pdf (5. 5. 2024).

121. Laboklin. Reference values - cattle, sheep, goat and pig. Bad Kissingen: Laboratory for clinical diagnostics, 2022. Bad Kissingen, Germany: Laborklin, Laboratory for clinical diagnostics. https://laboklin.com/wp-content/uploads/2023/03/Bestell-Poster_CATTLE-SHEEP-GOAT-PIG_web.pdf (5. 5. 2024).
122. UnitsLab.com. The resource for conversion SI units to conventional or traditional units used in laboratory and medical practice: about online calculator unit conversion tool. UnitsLab. <https://unitslab.com/> (30. 4. 2024).
123. Direktiva Sveta 92/65/EGS z dne 13. julija 1992 o zahtevah zdravstvenega varstva živali za trgovino in za uvoz v Skupnost živali, semena, jajčnih celic in zarodkov, za katere ne veljajo zahteve zdravstvenega varstva živali, določene v posebnih pravilih Skupnosti iz Priloge A(I) k Direktivi 90/425/EGS. Ur List EU 1992; 54–72. (Ta ni več v veljavi, ampak ga zamenjuje Uredba 2016/429) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=CELEX%3A31992L0065&qid=1714996749351> (8. 5. 2024)
124. Dziki-Michalska K, Tajchman K, Kowalik S, Wójcik M. The levels of cortisol and selected biochemical parameters in red deer harvested during stalking hunts. *Animals (Basel)* 2024; 14: 1108. doi: 10.3390/ani14071108
125. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37: 589–601. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.009>
126. Jewgenow K, Azevedo A, Albrecht M, Kirschbaum C, Dehnhard M. Hair cortisol analyses in different mammal species: Choosing the wrong assay may lead to erroneous results. *Conserv Physiol* 2020; 8: coaa009. doi: 10.1093/conphys/coaa009
127. Dulude-de Broin F, Cote SD, Whiteside DP, Mastromonaco GF. Faecal metabolites and hair cortisol as biological markers of HPA-axis activity in the Rocky mountain goat. *Gen Comp Endocrinol* 2019; 280: 147–57. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.04.022
128. Wester VL, van der Wulp NRP, Koper JW, de Rijke YB, van Rossum EFC. Hair cortisol and cortisone are decreased by natural sunlight. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 72: 94-6.
129. Gold AJ, Langlois DK, Refsal KR. Evaluation of basal serum or plasma cortisol concentrations for the diagnosis of hypoadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1798–805. doi: 10.1111/jvim.14589
130. Seth J, Brown LM. A simple radioimmunoassay for plasma cortisol. *Clin Chim Acta* 1978; 86: 109–20. doi: 10.1016/0009-8981(78)90465-5
131. Posautz C. Measurement of glucocorticoid metabolites in feces of Capricorns (*Alpine Ibex*). Vienna: University of Veterinary Medicine, 2012.
132. Sica N. Dealing with stress: responses for a good fitness on Alpine ibex. Sassari: University of Sassari, School in Natural Sciences, 2014. Doctoral thesis.
133. Newcomer B, Cebra C, Chamorro M, Reppert E, Cebra M, Edmondson M. Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (multisystem diseases). In: Pugh D, ed. *Sheep, Goat, and Cervid Medicine 3rd ed.* Amsterdam: Elviseer, 2021: 405–38. doi: 10.1016/B978-0-323-62463-3.00025-6
134. Sousa DER, Castro MB. Pancreatic eurytrematosis in small ruminants: a forgotten disease or an untold history? *Vet Parasitol* 2022; 311: 109794. doi: 10.1016/j.vetpar.2022.109794

135. Romeo C, Wauters LA, Santicchia F, et al. Complex relationships between physiological stress and endoparasite infections in natural populations. *Curr Zool* 2020; 66: 449–57. doi: 10.1093/cz/zoaa029
136. Defolie C, Merklung T, Fichtel C. Patterns and variation in the mammal parasite–glucocorticoid relationship. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2020; 95: 74–93. doi: <https://doi.org/10.1111/brv.12555>
137. Santiago-Moreno J, Gomez-Brunet A, Toledano-Diaz A, Pulido-Pastor A, Lopez-Sebastian A. Social dominance and breeding activity in Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) maintained in captivity. *Reproduction, fertility, and development* 2007; 19: 436–42.