

GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS

Petras Prakas

**LIETUVOS MEDŽIOJAMOSIOS FAUNOS SARKOSPORIDIJŲ
(*SARCOCYSTIS*) ĮVAIROVĖ IR EKOLOGIJA**

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2007 – 2011 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Mokslinis vadovas:

Dr. Dalius Butkauskas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Mokslinis konsultantas:

Prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Turinys

Santrumpos	5
1. Įvadas	6
2. Literatūros apžvalga	13
2.1. <i>Sarcocystis</i> parazitų sistematika	13
2.1.1. <i>Sarcocystis</i> genties sisteminė padėtis	13
2.1.2. Sarcocystidae šeimos sisteminis skirstymas	13
2.1.3. <i>Sarcocystis</i> gentis – gausi sisteminė grupė	15
2.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų biologija	16
2.2.1. <i>Sarcocystis</i> parazitų gyvybinis ciklas	16
2.2.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų cistos sandara	18
2.2.3. <i>Sarcocystis</i> parazitų transmisija	19
2.2.4. <i>Sarcocystis</i> parazitų geografinis pasiskirstymas	19
2.3. <i>Sarcocystis</i> parazitų patogenezė	20
2.3.1. Patogeniškumas tarpiniams ir galutiniams šeimininkams	20
2.3.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų infekcijų patologiniai požymiai	21
2.3.3. <i>Sarcocystis</i> parazitų infekcijos ekonominė žala ir prevencija	23
2.4. <i>Sarcocystis</i> parazitų įvairovė tarpiniuose ir galutiniuose šeimininkuose	24
2.4.1. Žmonių <i>Sarcocystis</i> parazitai	24
2.4.2. Žinduolių <i>Sarcocystis</i> parazitai	25
2.4.3. Paukščių <i>Sarcocystis</i> parazitai	26
2.4.4. Roplių <i>Sarcocystis</i> parazitai	28
2.5. <i>Sarcocystis</i> parazitų paplitimo ir gausumo įvertinimas	28
2.5.1. Infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas	28
2.5.2. Intensyvumo ir ekstensyvumo vertinimo problematika	30
2.5.3. Intensyvumą ir ekstensyvumą įtakoiantys veiksniai	30
2.6. <i>Sarcocystis</i> rūšių identifikacija ir naujų rūšių aprašymas	31
2.6.1. Istorinis aspektas	31
2.6.2. Galutinių šeimininkų nustatymo tyrimai	33
2.6.3. Fenetinė analizė	33
2.6.4. DNR analizė	35
2.7. <i>Sarcocystis</i> parazitų specifiskumas šeimininkui	36
2.7.1. Parazitų specifiskumas šeimininkui	36
2.7.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų specifiskumas tarpiniam ir galutiniam šeimininkui	37
2.7.3. <i>Sarcocystis</i> rūšių mažesnio specifiskumo tarpiniam šeimininkui įrodymai	38
2.8. <i>Sarcocystis</i> rūšių filogenetiniai tyrimai	39
2.8.1. Molekuliniai žymenys, naudojami <i>Sarcocystis</i> genties rūšių filogenetinėje analizėje	39
2.8.2. <i>Sarcocystis</i> genties monofilijos klausimas	41
2.8.3. <i>Sarcocystis</i> rūšių filogenetinių ryšių dėsningumai	42
2.9. <i>Sarcocystis</i> parazitai medžiojamuosiuose žvėryse	43
2.9.1. Tyrimai Lietuvoje	43
2.9.2. Tyrimai Pasaulyje	46
2.10. <i>Sarcocystis</i> parazitai medžiojamuosiuose paukščiuose	49
2.10.1. Tyrimai Lietuvoje	49
2.10.2. Tyrimai žąsiniuose paukščiuose	51
2.10.3. Tyrimai laukiniuose karveliuose	52

2.10.4. Tyrimai varniniuose ir kituose medžiojamuose paukščiuose	53
3. Medžiaga ir metodai	55
4. Rezultatai ir jų aptarimas	63
4.1. <i>Sarcocystis</i> parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas tirtuose gyvūnuose	63
4.2. Paukščiuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai	67
4.3. Žinduoliuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai	82
4.4. Medžiojamosios faunos sarkosporidijų genetinių tyrimų rezultatai	88
4.5. Naujų <i>Sarcocystis</i> rūšių aprašymas	97
4.6. <i>Sarcocystis</i> rūšių filogenetinių tyrimų rezultatai	99
4.7. Rezultatų apibendrinimas	108
Išvados	125
Literatūros sąrašas	126
Disertacijos tema publikuoti straipsniai	149
Konferencijų tezės	150
Padėkos	152

Santrumpos

- 5.8 rRNR, 18S rRNR, 28S rRNR – ribosominės RNR genai
- AFLP – amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. amplified fragment length polymorphism)
- bp – bazių pora
- D – parazitų agregacijos indeksas (angl. discrepancy index)
- DNR – deoksiribonukleorūgštis
- dNTP – deoksiribonukleotidtrifosfatų mišinys
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis
- EPM – arklių protozojinis mieloencefalitas (angl. equine protozoal myeloencephalitis)
- GTR + I + G – evoliucinis DNR modelis
- IFA – imunofluorescencinis testas (angl. immuno-fluorescent assay)
- ITS-1 – vidinis transkribuojamas regionas esantis tarp 18S rRNR ir 5.8S rRNR genų
- PGR – polimerazinė grandininė reakcija
- RAPD – atsitiktinai amplifikuotos DNR polimorfizmas (angl. random amplified polymorphic DNA)
- RFLP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. restriction fragment length polymorphism)
- RNR – ribonukleorūgštis
- rpm – apsisukimai per minutę
- rRNR – ribosominė RNR
- S, STD, STD* – parazitų specifiškumo šeiminiškai indeksai
- SDS – natrio dodecilsulfatas
- SDS-PAGE – natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
- Tris – tris(hidroksimetil) aminometanas

1. Įvadas

Darbo aktualumas. *Sarcocystis* genties Lankester, 1882 atstovai – tai cistas sudarančių kokcidijų grupės vienaląsčiai parazitai. *Sarcocystis* genties rūšims paprastai būdingas obligatinis- heterokseninis gyvybinis ciklas, paremtas aukos-plėšrūno ekologiniais santykiais. Tarpiniais šeimininkais dažniausiai būna žolėdžiai ir visaėdžiai, o galutiniai šeimininkai – mėšėdžiai gyvūnai. Nelytinė *Sarcocystis* rūšių vystymosi fazė vyksta tarpiniame šeimininke, pasibaigianti sarkocistos susiformavimu šeimininko raumenyse. Lytinė vystymosi stadija vyksta parazitui patekus į galutinio šeimininko žarnyną, kuriame susiformuoja oocistos/sporocistos. *Sarcocystis* parazitams būdingas platus šeimininkų spektras: žinduoliai, paukščiai, ropliai (Mehlhorn, Heydorn, 1978). *Sarcocystis* gentis yra gausiausia Sarcocystidae Poche, 1913 šeimoje, kuriai šiuo metu priskiriama virš 200 rūšių.

Kai kurios *Sarcocystis* rūšys yra svarbūs žmogaus bei naminių gyvūnų patogenai, sukeliantys parazitozę – sarkocistozę. Sarkosporidijų infekcijos žalingas poveikis daugiausia pasireiškia tarpiniuose šeimininkuose, o patogeniškumas priklauso nuo tam tikros *Sarcocystis* rūšies bei užsikrėtimo intensyvumo. Kadangi gamtoje žmogus neturi natūralių plėšrūnų, raumeninės žmonių sarkocistozės atvejai fiksuojami labai retai ir daugiausiai Pietryčių Azijoje. Dvejų sarkosporidijų rūšių (*S. hominis* (Railliet, Lucet, 1891) Dubey, 1976, *S. suihominis* (Tadros, Laarman, 1976) Heydorn, 1977) galutinis šeimininkas yra žmogus. Suvalgius termiškai neapdorotos jautienos, kiaulienos ar šernienos mėsos, užkrėstos minėtų *Sarcocystis* rūšių cistomis, gali pasireikšti pykinimo, viduriavimo, vėmimo, apetito netekimo, dusulio simptomai (Fayer, 2004). Tarp naminių gyvūnų didžiausias *Sarcocystis* parazitų infekcijos mastas nustatytas galvijuose, avyse, ožkose, taip pat sarkocistos aptinkamos arkliuose, kiaulėse, vištose, antyse ir kituose domestikuotuose gyvūnuose. Naminiuose gyvūnuose sarkosporidijos sukelia įvairius sveikatos sutrikimus galinčius pasibaigti vaisiaus ar gyvūno žūtimi. Sarkocistozė gyvulininkystėje sąlygoja nemažus ekonominius nuostolius dėl

makroskopinėmis sarkocistomis užkrėtos mėsos netinkamumo prekybai, sumažėjusios mėsos, vilnos, pieno produkcijos (Dubey ir kt., 1989).

Šiame darbe tiriamos sarkosporidijos, aptinkamos Lietuvos medžiojamojoje faunoje. Iš medžiojamų laukinių gyvūnų didžiausias dėmesys skirtas Lietuvoje populiariausiems medžioklės objektams: stirnoms (*Capreolus capreolus*), šernams (*Sus scrofa*), tauriesiems elniams (*Cervus elaphus*), laukinėms antims bei žąsims (Anseriformes būrys), taip pat analizuojami briedžiai (*Alces alces*), karveliai keršuliai (*Columba palumbus*), varniniai paukščiai (Corvidae šeima). Lyginant su naminiiais gyvūnais, laukiniuose gyvūnuose aptinkamos *Sarcocystis* rūšys kol kas menkai tyrinėtoms. *Sarcocystis* rūšinė sudėtis, *Sarcocystis* parazitų infekcijos paplitimo mastas, poveikis šeimininkui daugelyje laukinės faunos rūšių nėra tiksliai žinomas. Praktiniu požiūriu medžiojamuosiuose gyvūnuose randamų sarkosporidijų tyrimai yra svarbūs dėl šių parazitų potencialios grėsmės žmogui. Registruoti atvejai, kai valgę intensyviai sarkocistomis užkrėtos šaldytos stirnienos žmonės viduriavo, taip pat pasireiškė pykinimo ir vėmimo simptomai (Schultze, 1988). Manoma, jog negalavimus sukėlė *Sarcocystis* parazitų toksinas – sarkocistinas. Žarnyno veiklos sutrikimai galimi suvalgius termiškai neapdorotos šernienos užkrėtos *S. suihominis* sarkocistomis. Sumedžiotų laukinių ančių mėsa, kurioje plika akimi matomos *S. rileyi* (Stiles, 1893) Labbé, 1899 ryžio formos sarkocistos yra netinkama maistui (Dubey ir kt., 2003a). Keturių mėnesių elniukams (*Cervus canadensis nelsoni*), užkrėstiems didelėmis sarkocistų *Sarcocystis* spp. dozėmis, pasireiškė skeleto raumenų, širdies raumens, smegenų, akies nervo uždegimai, be to, užkrėstųjų gyvūnų masė buvo reikšmingai mažesnė lyginant su kontroline grupe (Foreyt ir kt., 1995). Ūmios natūralios sarkocistozės atvejis laukiniuose stambiuose medžiojamuosiuose žinduoliuose pirmą kartą fiksuotas devyniolikos mėnesių baltauodegio elnio (*Odocoileus virginianus*) patelei (Duncan ir kt., 2000). Nurodoma, kad iki 75% medžioklinių šunų gali būti užsikrėtę sarkosporidijomis ir toliau su išmatomis jas platina, užkrėsdami įvairias medžiojamosios faunos rūšis (cit. pagal Malakauskas, Grikiėnienė, 2002). Teoriniu aspektu laukinės faunos

Sarcocystis rūšių tyrimai yra aktualūs vertinant *Sarcocystis* parazitų paplitimą, patogenezę, specifiškumą šeimininkui, tarprūšinę ir vidurūšinę genetinę įvairovę, gilinant žinias apie infekcijos mechanizmus, gyvybinių ciklų modelius, parazito evoliucinius ryšius su šeimininkais.

Lietuvoje ieškant *Sarcocystis* rūšių paukščiuose, intensyviausiai tyrinėti žąsinių būrio paukščiai. Laukinių paukščių sarkosporidijų tyrimuose nagrinėti infekcijos gausumo ir paplitimo klausimai, šviesiniu ir elektroniniu mikroskopu nustatyti kai kurių *Sarcocystis* spp. cistų morfologiniai tipai, taip pat išaiškintas vienos *Sarcocystis* sp. rūšies, sudarančios sarkocistas baltakaktėje žąsyje (*Anser albifrons*) gyvybinis ciklas (Kutkienė, Sruoga, 2004; Kutkienė ir kt., 2006; Kutkienė ir kt., 2008). Pasauliniu mastu žąsiniuose, varniniuose ir karveliniuose paukščiuose (Columbiformes būrys) kol kas aprašytos tik keturios *Sarcocystis* rūšys: *S. rileyi*, *S. calchasi* Olias, Grubber, Hafez, Hafez, Heydorn, Mehlhorn, Lierz, 2010, *S. columbae* Olias, Olias, Lierz, Mehlhorn, Grubber, 2010 *S. kaiserae* Odening, 1997 (Cawthorn ir kt., 1981; Odening, 1997; Olias ir kt., 2010b; Olias ir kt., 2010c), o kitos šiose paukščių grupėse gausiai randamos sarkosporidijos dėl nepakankamų tyrimų identifikuojamos tik iki genties ir įvardijamos *Sarcocystis* sp.

Lietuvoje *Sarcocystis* infekcijos intensyvumas ir ekstensyvumas medžiojamuosiuose stambiuosiuose žvėryse (šernuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose, dėmėtuose elniuose (*Cervus nippon*), briedžiuose) yra tyrinėtas (Grikienienė ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002). Remiantis šviesinės mikroskopijos analizės duomenimis nustatyta, jog Lietuvos teritorijoje šernuose aptinkamos dvi, stirnose – keturios, tauriuosiuose elniuose – trys, briedžiuose – dvi sarkosporidijų rūšys (Grikienienė, Senutaitė, 1995; Kutkienė, 2001; 2002; 2003). Pastaraisiais metais Norvegijoje, naudojant DNR ir morfologinius tyrimus aprašytos šešios naujos sarkosporidijų rūšys, aptinkamos briedžiuose, stirnose ir tauriuosiuose elniuose (Dahlgren, Gjerde, 2008; 2009; 2010a; Gjerde, 2011). Naujausių tyrimų duomenys rodo, kad siekiant nustatyti bei aprašyti sarkosporidijų, aptinkamų Lietuvos elniniuose, rūšinę sudėtį vien tik morfologinės analizės nepakanka.

Tradiciškai identifikuojant *Sarcocystis* rūšis remiamasi sarkocistos morfologinėmis charakteristikomis bei parazito gyvybinio ciklu. Deja, sarkosporidijų gyvybinio ciklo galutiniai šeimininkai išaiškinti tik mažiau negu pusei visų *Sarcocystis* rūšių. Sarkocistos sienelės struktūra, kuri tiriama šviesiniu ir/ar elektroniniu mikroskopu yra *Sarcocystis* rūšių svarbiausias fenotipinis diagnostinis požymis (Dubey, Odening, 2001). Kai morfologiškai labai panašios sarkocistos randamos taksonomiškai giminingų šeimininkų rūšyse, cistų sienelės ultrastruktūros ir kitų morfologinių tyrimų nepakanka siekiant nustatyti tam tikrą sarkosporidijų rūšį (Odening, 1998). Be to, kai kurios sarkosporidijų rūšys nėra griežtai specifinės tarpiniam šeimininkui, t. y. gali sudaryti sarkocistas daugiau negu vienoje šeimininkų rūšyje, o tai apsunkina *Sarcocystis* rūšių atskyrimą (Box ir kt., 1984). Kai kuriose šeimininkų grupėse, mišrių infekcijų atveju, kai viename šeimininko individe randamos dvejų ar daugiau skirtingų *Sarcocystis* rūšių sarkocistos, tai taip pat gali komplikuoti *Sarcocystis* rūšių identifikaciją (Wesemeier, Sedlacek, 1995a). Skirtingi DNR žymenys, daugiausiai 18S rRNR genas, 28S rRNR genas, ITS–1 regionas sėkmingai naudojami morfologiškai panašių sarkosporidijų rūšių atskyrimui, parazito specifiškumo šeimininkui nustatymui, filogenetiniuose ir kituose tyrimuose (Dahlgren, Gjerde 2010a; Olias ir kt., 2010b). Šiuolaikinė *Sarcocystis* rūšių identifikacija yra sudėtinga, paremta morfologiniais ir DNR tyrimais.

Siekiant medžiojamos faunos sarkosporidijas įvertinti ekologiniais, patogenezės, genetiniais, biocheminiais ir kitais aspektais, būtina žinoti kokia *Sarcocystis* rūšis tiriama. Šiame medžiojamos faunos sarkosporidijų bioįvairovės tyrime nagrinėjamas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas, intensyvumas, rūšinė sudėtis, specifiškumas tarpiniam šeimininkui, filogenija. Identifikuojant *Sarcocystis* rūšis, naudojami klasikiniai morfologiniai bei DNR analizės metodai, gauti skirtingų metodikų duomenys glaudžiai siejami tarpusavyje atsakant į ekologinius ir filogenetinius klausimus.

Darbo naujumas. Sarkosporidijų tyrimai Lietuvoje, nagrinėjant *Sarcocystis* rūšių paplitimą, gausumą, nustatant *Sarcocystis* rūšinę sudėtį tam tikrame tarpiniame šeimininke apsiribodavo tradiciniais morfologiniais metodais. Šiame darbe, identifikuojant *Sarcocystis* rūšis medžiojamuosiuose žinduoliuose ir paukščiuose, greta šviesinės mikroskopijos naudoti elektroninės mikroskopijos bei DNR tyrimo metodai. Vertinant analizuojamų *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius naudoti molekuliniai žymenys (18S rRNR ir 28S rRNR genai, ITS–1 regionas). Sarkocistos pirmą kartą Lietuvoje aptiktos baltaskruosčių berniklių, pilkųjų žąsų, kovų, kuosų, varnų, kėkštų, keršulių, sidabrinųjų kirų raumenyse. Šio tiriamojo darbo metu aptiktos iki šiol Lietuvoje nenustatytos *S. columbae*, *S. oviformis* Dahlgren, Gjerde, 2009, *S. hjorti* Dahlgren, Gjerde, 2011, *S. silva* Gjerde, 2011 rūšys, parazituojančios atitinkamai keršuliuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose bei stirnose ir briedžiuose. Remiantis DNR sekų tyrimais išaiškinta, jog stirnose ir tauriuosiuose elniuose egzistuoja dvi sarkosporidijų rūšys, kurios anksčiau buvo įvardijamos kaip viena į *S. hofmanni* Odening, Stolte, Walter, Bockhardt, 1994 panaši rūšis. Pirmą kartą genetiškai charakterizuota *Sarcocystis* sp., pasižyminti I cistos tipu, aptikta kuosoje. Šiame darbe taip pat pirmą kartą pateikiami *S. rileyi* infekcijos įrodymai Europoje. Remiantis cistų sienelės ultrastruktūros ir DNR tyrimų rezultatais, aprašytos keturios naujos sarkosporidijų rūšys: baltakaktėje žąsyje – *S. albifronsi* Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011, baltaskruostėje berniklėje – *S. wobeseri* Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2010, didžiojoje antyje – *S. anasi* Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011 ir varnoje – *S. cornixi* Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2009.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė. Medžiojamosios faunos sarkosporidijos turi tiesiogines sąsajas su žmonių aplinka, kai kurios *Sarcocystis* rūšys yra patogeninės, taip pat šių parazitų paplitimas tiriamųjų laukinių gyvūnų populiacijose gali daryti neigiamą įtaką gyvūnų sveikatai. Dėl minėtų priežasčių, siekiant atsakyti į fundamentinius mokslinius bei praktinius

klausimus, sarkosporidijų tyrimai medžiojamuosiuose porakanopiuose žinduoliuose (*Artiodactyla* būrys) bei paukščiuose yra aktualūs bei reikalingi. Šiame darbe vertintas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas labiausiai paplitusiose Lietuvos medžiojamosios faunos rūšyse. Sarkosporidijų sarkocistos identifikuotos naudojant morfologinius ir molekulinis tyrimų metodus. Dar kartą fiksuotas aukštas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas Lietuvos medžiojamuosiuose porakanopiuose. Aptiktas nelauktai didelis, intensyvios *Sarcocystis* parazitų infekcijos mastas stirnose, todėl būtini išsamūs sarkocistomis užkrėstos žvėrienos tinkamumo maistui tyrimai. Lietuvoje didžiosiose antyse rastų makrocistų priskyrimas *S. rileyi* keičia supratimą apie šios rūšies paplitimą, nes iki šiol *S. rileyi* infekcija buvo patvirtinta tik Šiaurės Amerikoje. Tirtosios paukščių sarkosporidijų rūšys kelia tolimesnį susidomėjimą dėl nustatyto artimo giminingumo patogeninėms *S. calchasi* ir *S. neurona* Dubey, Davis, Speer, Bowman, de Lahunta, Granstrom, Topper, Hamir, Cummings, Suter, 1991 rūšims. Analizuotų *Sarcocystis* rūšių filogenetinių ryšių įvertinimas pagal 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono sekas turi didelę reikšmę išaiškinant tirtųjų *Sarcocystis* rūšių, galutinius šeimininkus. Parazito gyvybinio ciklo nustatymas, savo ruožtu, padėtų kurti prevencines programas, siekiant sumažinti aplinkos užteršimą galutinių šeimininkų išskiriamomis *Sarcocystis* rūšių sporocistomis. Naudojant DNR analizę išsiaiškinta, jog *S. wobeseri*, *S. silva*, *S. hofmanni*-like, *S. hjorti* nėra griežtai specifinės tarpiniam šeimininkui ir gali parazituoti mažiausiai dviejose skirtingose šeimininkų rūšyse. Paukščių ir elninių žinduolių (*Cervidae* šeima) grupėse *Sarcocystis* rūšių mažesnio specifiškumo šeimininkui įrodymai svarbūs vertinant *Sarcocystis* genties rūšių specifiškumą tarpiniam šeimininkui bei parodant molekulinis tyrimų naudingumą minėtoje problematikoje. Šiame darbe aprašytos keturios mokslui naujos *Sarcocystis* rūšys, formuojančios sarkocistas paukščiuose, taip pat kelios sarkosporidijų rūšys pirmą kartą aptiktos Lietuvoje. Parazitinės biologinės įvairovės pažinimas yra labai svarbus medicinos ir ekologijos mokslams, o naujų rūšių aprašymas yra esminis visų tolimesnių biologinių tyrimų pagrindas.

Darbo tikslas ir uždaviniai. Šio darbo tikslas – Lietuvos medžiojamosios faunos rūšyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių paplitimo, morfologinės ir genetinės įvairovės įvertinimas. Tikslui pasiekti buvo suformuluoti uždaviniai:

1. Naudojant kompresinį-mikroskopinį dažytų raumenų iškarpu tyrimo metodą palyginti skirtingose laukinių žinduolių ir paukščių rūšyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių infekcijos ekstensyvumą ir intensyvumą.
2. Tiriant šviesiniu mikroskopu pagal morfometrines sarkocistų ypatybes paukščiuose rastas sarkocistas suskirstyti į morfologinius cistų tipus, o žinduoliuose atrastas sarkocistas priskirti tam tikrai sarkosporidijų rūšiai.
3. Naudojant sarkocistų sienelės ultrastruktūros ir DNR analizę, identifikuoti medžiojamos faunos rūšyse parazituojančias *Sarcocystis* rūšis.
4. Naudojant 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono sekų analizę nustatyti tiriamų *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius Sarcocystidae šeimoje.
5. Įvertinti *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių elniniuose ir tirtuose paukščiuose specifiškumą tarpiniam šeiminkui.

Ginamieji teiginiai:

1. Kompleksiniai morfologiniai ir DNR tyrimai yra būtini identifikuojant medžiojamoje faunoje aptinkamas sarkosporidijų rūšis.
2. Siekiant atskirti artimai giminingas paukščių sarkosporidijų rūšis reikalingi ITS–1 regiono sekų tyrimai.
3. Aprašytos keturios naujos mokslui paukščių *Sarcocystis* rūšys.
4. Ne visos Lietuvoje medžiojamuose gyvūnuose parazituojančios *Sarcocystis* rūšys pasižymi griežtu specifiškumu tarpiniam šeiminkui.

2. Literatūros apžvalga

2.1. *Sarcocystis* parazitų sistematika

2.1.1. *Sarcocystis* genties sisteminė padėtis

Organizmų taksonominis skirstymas išlieka vienu iš daugiausia diskusijų keliančiu biologijos mokslo objektu. Žemiau pateikiama *Sarcocystis* genties sisteminė padėtis pagal Tenter ir Johnson (1997). *Sarcocystis* genties atstovai yra vienaląsčiai organizmai, priskiriami Apicomplexa Levine, 1979 tipui, kuriam priklauso daugiau kaip 4600 vien tik parazitinių rūšių, pasižyminčių gyvybinio ciklo invazinių stadijų unikaliu apikaliniu kompleksu, susidedančiu iš specialių organelių, kurios palengvina parazito patekimą į šeimininko ląstelę. Apicomplexa tipo protistai klasifikuojami į žemesnius taksonominius vienetus, remiantis tradiciniais požymiais – morfologinėmis ypatybėmis, gyvenimo ciklo pobūdžiu, vystymosi stadijų lokalizacija.

Domenas – Eukaryota

Karalystė – Protista

Tipas – Apicomplexa

Klasė – Sporozoea

Poklasis – Coccidia

Būrys – Eucoccidiida

Pobūris – Eimeriina

Šeima – Sarcocystidae

Pošeimis – Sarcocystinae

Gentis – *Sarcocystis*

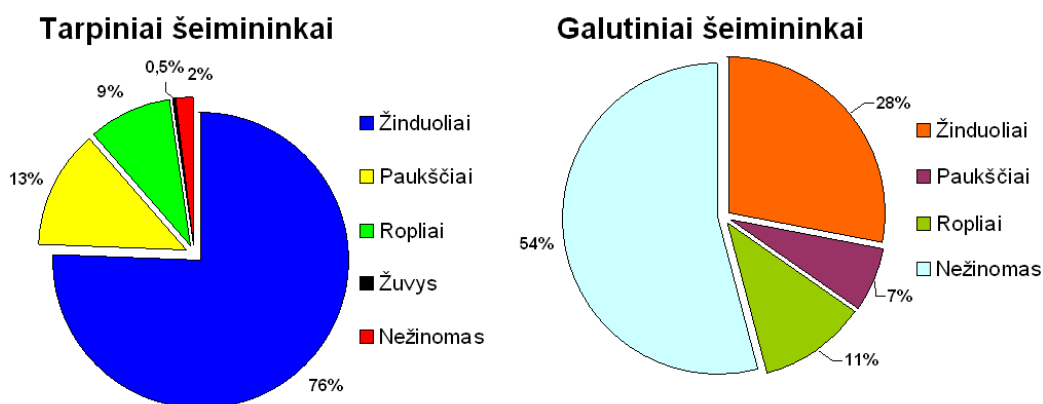
2.1.2. *Sarcocystidae* šeimos sisteminis skirstymas

Sarcocystidae šeima atskiriama nuo kitų kokcidinių pagal fakulatatyvinį arba obligatinį heterokseninį (tarpinis ir galutinis šeiminkai yra būtini tam, kad parazitas užbaigtų savo gyvybinį ciklą) vystymosi ciklą; sugebėjimą formuoti cistas tarpinių šeiminkų įvairių tipų audiniuose; oocistų morfologiją (disporinės ir tetrazoinės oocitos). (Frenkel, 1977). Tarpiniame šeiminke, kuriuo dažniausiai tarnauja žolėdis arba visaėdis, vyksta vienas arba keli merogonijos (šizogonijos) ciklai, kurie baigiasi cistų formavimu audiniuose. Dėl lytinio dauginimosi (gametogonijos), galutinio šeiminko, kuris dažniausiai būna mėšėdis, žarnyne susiformuoja oocistos. Sporogonijos metu, galutiniame šeiminke arba aplinkoje formuojamos oocistos turinčios dvi sporocistas, iš kurių kiekvienoje yra po keturis sporozoitus (Rommel, 1978; Smith, 1981).

Sarcocystidae šeimos sisteminė padėtis nėra visuotinai priimta, tačiau šiuo metu Sarcocystidae šeima dažniausiai skirstoma į du pošeimius: Sarcocystinae ir Toxoplasmatinae. Sarcocystidae šeimos genčių suskirstymui didžiausią įtaką turėjo gyvybinio ciklo išaiškinimas, skirtingose dauginimosi stadijose susiformuojančių cistų ultrastruktūrų tyrimai bei molekulinė-filogenetinių metodų panaudojimas. Sarcocystinae pošeimii būdingas obligatinis vystymasis dvejuose šeiminkuose, sporogonijos stadija vyksta galutinių šeiminkų žarnyne, tokiu būdu į aplinką paleidžiamos subrendusios sporocistos. Toxoplasmatinae pošėmis skiriasi nuo Sarcocystinae, nes jis pasižymi skirtingo tipo nelytiniu vystymusi tarpiniame šeiminke, papildoma nelytinio dauginimosi stadija galutiniame šeiminke, o sporogonija vyksta aplinkoje. (Mugridge ir kt., 1999). Sarcocystinae pošeimį sudaro *Sarcocystis* ir *Frenkelia* gentys, o Toxoplasmatinae pošeimii tradiciškai buvo priskiriamos *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Neospora*.

Frenkelia ir *Sarcocystis* gentys tradiciškai atskiriamos viena nuo kitos pagal nelytinių stadijų lokalizaciją ir morfologiją tarpiniame šeiminke. *Frenkelia* rūšių gyvybinio ciklo nelytinė fazė vyksta tarpinio šeiminko kepenyse ir turi tik vieną merozoitų kartą, o daugumoje *Sarcocystis* rūšių nelytinis vystymasis vyksta tarpinio šeiminko įvairių organų kraujagyslių

endotelio ląstelėse taip pat būdinga keletas merozoitų vystymosi kartų. *Frenkelia* parazitai formuoja skiltelės ir rutulio formos cistas, kurios randamos išskirtinai centrinėje nervų sistemoje, o *Sarcocystis* parazitų cistos dažniausiai aptinkamos skeleto ar širdies raumenyse. Be to tik *Frenkelia* rūšys gali sukelti šeimininko ląstelių branduolio hipertrofiją. (Krampitz ir kt., 1976; Göbel ir kt., 1978; Geisel ir kt., 1978).



1 pav. *Sarcocystis* rūšių tarpiniai ir galutiniai šeimininkai. Skritulinės diagramos nubraižytos autoriui apibendrinus literatūriniuose šaltiniuose pateikiamus duomenis.

2.1.3. *Sarcocystis* gentis – gausi sisteminė grupė

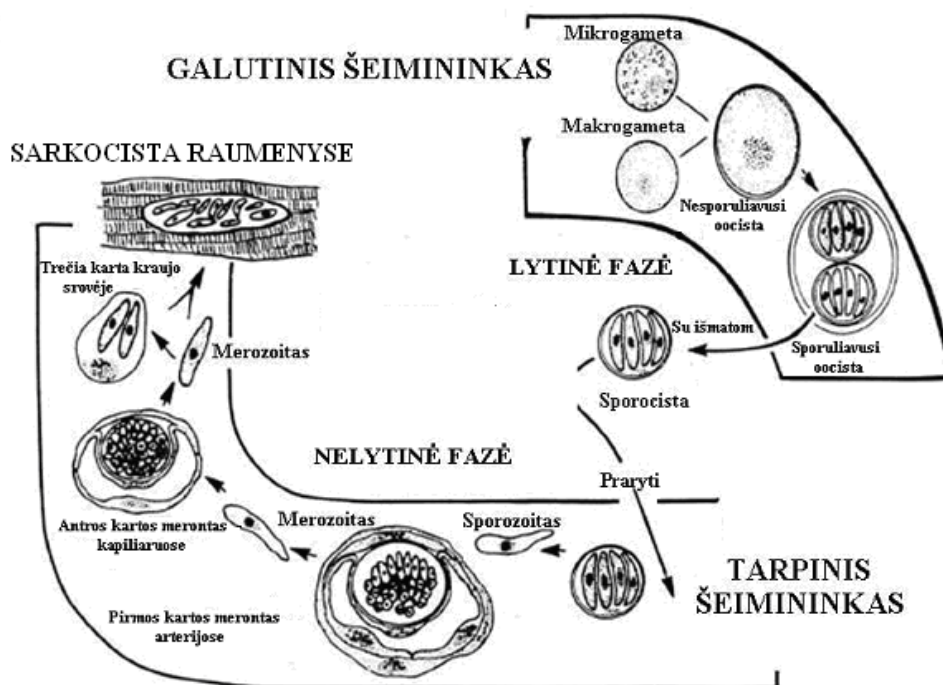
Heterogeninė *Sarcocystis* gentis yra pati gausiausia iš Sarcocystidae šeimos genčių, kuriai priklauso daugiau rūšių negu sudėjęs visas kitas Sarcocystidae genčių rūšis. Pavadinimą turinčių *Sarcocystis* rūšių skaičius labai sparčiai augo praeitame šimtmetyje: 1926 – 35 rūšys, 1975 – 54, 1980 – 93, 1986 – 122 (Wenyon, 1926; Kalyakin, Zasukhin, 1975; Levine, Tadros 1980; Levine, 1986). Paskutinėje *Sarcocystis* parazitų taksonominėje apžvalgoje pateikiamas 189 rūšių sąrašas (Odening 1998). Naujų sarkosporidijų rūšių aprašymas nenutrūksta ir šiomis dienomis, o *Sarcocystis* genčiai šiuo metu priskiriama per 200 rūšių. Šios genties rūšims būdingas sudėtingas gyvybinis ciklas, kuris yra išaiškintas tik maždaug pusei iš jų.

Sarkosporidijos aptinkamos žinduoliuose, paukščiuose ir ropliuose (1 pav.). Išimtis – *S. salvelini* Fantam, Porter, 1943, kurios tarpinis šeimininkas yra lašišinių šeimos žuvis upokšninis šalvis (*Salvelinus fontinalis*).

2.2. *Sarcocystis* parazitų biologija

2.2.1. *Sarcocystis* parazitų gyvybinis ciklas

Sarcocystis genčiai būdingas obligatinis dvejų šeimininkų vystymosi ciklas paremtas plėšrūno–aukos ekologiniais santykiais. Nelytinis dauginimasis vyksta tarpiniame šeimininke, o lytinis – galutiniame šeimininke. *Sarcocystis* parazitų gyvybinį ciklą apibūdinamas remiantis *S. cruzi* (Hasselmann, 1923) Wenyon, 1926 rūšimi, kurios tarpiniais šeimininkais gali būti naminiai galvijai (Bovinae pošeimis), o galutiniais šeimininkais šuninių šeimos (Canidae) plėšrūnai – šunys, kojotai, lapės, vilkai, šakalai (2 pav.).



2 pav. *Sarcocystis* parazitų gyvybinis ciklas (Dubey ir kt., 1989).

Galutinis šeimininkas užsikrečia sarkosporidijomis prarydamas raumeninį audinį su subrendusiomis *Sarcocystis* parazitų cistomis – sarkocistomis. Cistozoitai atsipalaiduoja iš sarkocistos maisto virškinimo metu, skverbiasi į plonojo žarnyno gleivinę ir transformuojasi į vyriškus (mikro) ir moteriškus (makro) gamontus. Subrendusio mikrogamonto gametos išsivaduoja iš mikrogamonto ir žiuželių pagalba aktyviai juda į makrogamonto periferiją. Po apvaisinimo apie zigotą vystosi sienelė ir formuojamos oocistos. Gametogonijos ir apvaisinimo procesas gali būti užbaigtas per 24 valandas. Gametogonijos procesas yra asinchroninis, todėl vienu metu galima aptikti oocistas ir gamontus. Gametogonijos lokalizacija ir parazituojamų ląstelių tipai varijuoja priklausomai nuo rūšies ir gametogenezės stadijos. Oocistos sporuliuoja plonojo žarnyno jungiamojo audinio sluoksnyje (lot. *lamina propria*). Sporuliacija vyksta asinchroniškai, todėl tuo pačiu laiku randamos nesporuliavusios ir sporuliavusios oocistos. Po trijų branduolio pasidalijimų susiformuoja dvi sporocistos su keturiais sporozoitais. Sporocistos su fekalijomis patenka į aplinką. Daugumos *Sarcocystis* rūšių oocistos/sporocistos išmatose randamos po 7-14 dienų ir oocistų/sporocistų išskyrimas dažniausiai trunka iki kelių mėnesių.

Tarpinis šeimininkas užsikrečia sarkosporidijomis per maistą arba vandenį. Sporozoitai pasišalina iš sporocistos plonajame žarnyne ir prasideda merogonijos procesas. Merontai lokalizuojasi šeimininko ląstelių citoplazmoje, tačiau nebūna apsupti parazitoforine vakuole. Merontai dalijasi endopoligenijos būdu, o merozoitai formuojasi meronto periferijoje. Tam tikro tipo audinyje pastebimi žymūs merontų dydžio ir formos skirtumai. Merogonijos generacijų skaičius ir šeimininko ląstelės tipas, kuriame vyksta merogonija priklauso nuo *Sarcocystis* rūšies. Po merogonijos prasideda sarkocistos formavimasis. Viduląstelinis merozoitas apsuptas parazitoforine vakuole tampa metrocitu. Po kelių pasidalijimų metrocitai virsta cistozoitais, kurie yra infektyvūs galutiniam šeimininkui. Parazito vystymasis tarpiniame šeimininke vidutiniškai trunka du su puse mėnesio, tačiau brendimo laikas skirtingoms *Sarcocystis* rūšims varijuoja (Dubey ir kt., 1989).

Kol kas žinomos keletas galimų sarkosporidijų gyvybinio ciklo tarpinių ir galutinių šeimininkų kombinacijos, kurios išdėstytos nuo dažniausios: žinduolis/žinduolis, žinduolis/roplys, žinduolis/paukštis, roplys/roplys, paukštis/žinduolis, paukštis/paukštis.

Įprastai *Sarcocystis* genties atstovai pasižymi diheterokseniniu gyvybiniu ciklu (tarpiniu ir galutiniu parazito šeimininku būna skirtingos šeimininkų rūšys). Nustatyta, kad trys sarkosporidijų rūšys pasižymi dihomokseniniu vystymosi ciklu, kai nelytinis ir lytinis *Sarcocystis* parazitų dauginimasis gali vykti toje pačioje rūšyje. *S. gallotiae* Matuschka, Mehlhorn, 1984 sarkocistos randamas *Gallotia galloti* driežo uodegoje ir šio parazito transmisija vyksta dėl kanibalistinės elgsenos, kai driežai ėda vienas kito uodegas (Matuschka, Bannert 1987; Šlapeta, 2001). *S. rodentifelis* Grikienienė, Arnastauskienė, Kutkienė, 1993 ir *S. muris* (Railliet, 1886) Labbé, 1899 tarpiniais šeimininkais tarnauja smulkūs graužikai (Rodentia būrys), o galutiniu – katė (*Felis silvestris catus*). Alternatyvaus vystymosi atveju, sporocistos ir oocistos subręsta žiurkės (*Rattus norvegicus*) žarnyne (*S. rodentifelis* atvejis) arba pelės (*Mus musculus*) žarnyne (*S. muris* atvejis). Manoma, kad žiurkės, pelės užsikrečia dėl kanibalistinės, kaprofaginės elgsenos (Koudela, Modrý, 2000; Kutkienė, Grikienienė, 2003).

2.2.2. *Sarcocystis* parazitų cistos sandara

Morfologiškai apibūdinant *Sarcocystis* genties rūšis, svarbiausias požymis yra cistos sandara. Sarkocista (gr. mėsos pūslelė) yra galutinė sarkosporidijų nelytinio vystymosi stadija, randama tarpiniuose šeimininkuose. Sarkocistos visada aptinkamos šeimininkų ląstelės citoplazmos parazitoforinių vakuolių viduje. Vienoje šeimininko ląstelėje galima aptikti daugiau negu vieną sarkocistą. Sarkocista susideda iš cistos sienelės, kuri supa metrocitus ir cistozoitus. Dauguma sarkocistų vystosi skeleto skersaruožiuose raumenyse, tačiau kai kurios sarkocistos aptinkamos lygiuosiuose raumenyse. Rečiau

sarkocistos randamos centrinėje nervų sistemoje, virškinamajame trakte, širdies Purkinjė ląstelėse. Sarkocistų dydis ir forma priklauso nuo parazito rūšies ir cistos amžiaus. Sarkocistos pagal dydį skirstomos į makroskopines (matomos plika akimi) ir mikroskopines.

Skirtingų *Sarcocystis* rūšių cistos sienelės sandara ir storis skiriasi, be to bręstant cistai keičiasi sienelės struktūros ypatybės. Sarkocistos sienelė histologiškai gali būti lygi, ruožuota, vingiuota, su šakotomis išaugomis. Iš sarkocistų sienelės kilusi septa padalija zoitų grupes į atskiras kameras. Nesubrendęs zoitas yra rutulio ar kiaušinio formos ir vadinamas metrocitu. Po kelių dalijimusi metrocitai produkuoja cistozoitus, kurie būna banano ar į jį panašios formos. Sarkocistos viduje metrocitai lokalizuoti žievėje, o cistozoitai šerdyje. Senose, didelėse sarkocistose cistozoitai kartais degeneruoja centrinėje sarkocistos dalyje ir juos pakeičia granulės arba globulės (Dubey ir kt., 1989).

2.2.3. *Sarcocystis* parazitų transmisija

Infektyvių sarkosporidijų stadijų nurijimas kartu su maistu ar vandeniu iš esmės yra vienintelis tarpinio šeimininko užsikrėtimo būdas. Nors aprašyti gamtiniai placentinės infekcijos atvejai galvijuose, avyse, kai buvo atrasti merontai abortuotuose embrionuose, tačiau toks šių parazitų transmisijos kelias labiau išimtis nei dėsningumas. Sarkosporidijos tik vieną kartą aptiktos trijų dienų amžiaus kumeliuke (Cunningham, 1973), tačiau daugiau panašių atvejų neužfiksuota. Eksperimentiškai nepatvirtinta užsikrėtimo galimybė laktacijos metu per pieną ar krekenas (Fayer ir kt., 1982). Subrendusių sarkocistų, turinčių cistozoitus, prarijimas yra vienintelis žinomas galutinio šeimininko užsikrėtimo *Sarcocystis* parazitais būdas.

2.2.4. *Sarcocystis* parazitų geografinis pasiskirstymas

Sarcocystis rūšys paplitusios visame pasaulyje, tačiau tam tikros rūšys gali būti randamos specifiniuose geografiniuose regionuose. Jų buvimą tam tikram regione daugiausiai apsprendžia rūšiai būdingų tarpinių ir galutinių šeimininkų pakankamas kiekis. Pavyzdžiui, *S. falcatula* Stiles, 1893 buvo rasta tik Šiaurės Amerikos žemyne, nes šios rūšies galutinio šeimininko Virdžinijos oposumo (*Didelphis virginiana*) arealas apribotas Šiaurės ir Centrine Amerika (Box ir kt., 1984). Norvegijoje šiauriniuose elniuose (*Rangifer tarandus*) aptinkamos šešios sarkosporidijų rūšys (Dahlgren, Gjerde, 2007), o Islandijoje, kurioje iš Norvegijos šiauriniai elniai buvo atgabenti 1781–1787 metais, ištyrus 36 individus rastos trys *Sarcocystis* rūšys (*S. grueneri* Yakimoff, Sokoloff, 1934, *S. tarandivulpes* Gjerde, 1984, *S. hardangeri* Gjerde, 1984) (Dahlgren ir kt., 2007). Vienareikšmio atsakymo, kodėl šiauriniuose elniuose Islandijoje identifikuota mažiau sarkosporidijų rūšių negu Norvegijoje, nėra. Pagrindinės numanomos priežastys – Islandijoje nėra specifinių *Sarcocystis* rūšių galutinių šeimininkų, ištirta nepakankama imtis, introdukuoti šiauriniai elniai buvo užsikrėtę tik trimis sarkosporidijų rūšimis arba kitomis tik menkai.

2.3. *Sarcocystis* parazitų patogenezė

2.3.1. Patogeniškumas tarpiniams ir galutiniams šeimininkams

Sarkosporidijų patogenų sukeliama liga vadinama sarkocistoze arba sarkosporidioze. Dauguma *Sarcocystis* rūšių nėra patogeninės, tačiau kai kurios gali sukelti rimtus sveikatos sutrikimus naminiams gyvūnams ir žmonėms. Sarkocistozės klinikinių požymių pasireiškimas priklauso nuo *Sarcocystis* rūšies ir užsikrėtimo intensyvumo. Nenustatyta, jog šeimininko dydis ar svoris įtakotų atsparumą *Sarcocystis* parazitų sukeliamoms ligoms. Nėštumas, laktacija, maisto trūkumas ar kitos stresinės situacijos sunkina sarkocistozės eigą. Pastebėta tendencija, jog *Sarcocystis* rūšys, kuriomis užsikrečiama per šuninių šeimos žinduolius yra labiau patogeninės, negu rūšys,

turinčios kitus galutinius šeimininkus. Pavyzdžiui, avyse identifikuotos keturios sarkosporidijų rūšys: *S. arieticanis* Heydorn, 1985, *S. gigantea* (Railliet, 1886) Ashford, 1977, *S. medusiformis* Collins, Atkinson, Charleston, 1979, *S. tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886, iš kurių pernešamos per šuninių šeimos plėšrūnus (*S. arieticanis*, *S. tenella*) yra patogeninės, o pernešamos per katinių šeimos (Felidae) plėšrūnus (*S. gigantea*, *S. medusiformis*) – nepatogeninės.

Svarbu atskirti *Sarcocystis* parazitų poveikį galutiniam ir tarpiniam šeimininkams. *Sarcocystis* parazitų infekcijos požymiai pasireiškia tarpiniams šeimininkams, o sarkosporidijų infekcija galutiniams šeimininkams paprastai nebūna pavojinga. Įvairiems plėšrūnams: šunims, katėms, lapėms, kojotams, meškėnams, pelėdoms, gyvatėms ir kitiems, sumaitinus skirtingomis *Sarcocystis* rūšimis infekuotus audinius, šių plėšrūnų žarnyne rastos sporocistos, tačiau nepastebėta jokių klinikinių požymių. Kai kurie eksperimentiniai gyvūnai vėmė, jiems pasireiškė anoreksijos požymiai. Žmonėms savanoriams suvalgius *S. hominis* ir *S. sui hominis* sarkocistomis užkrėstos mėsos, nustatyti vėmimo, diarėjos, sunkaus kvėpavimo simptomai (Gajadhar, Marquardt, 1992; Berrocal, Lopez, 2003; Stanek ir kt., 2003; Fayer 2004).

2.3.2. *Sarcocystis* parazitų infekcijų patologiniai požymiai

Nors sarkocistozė gamtoje dažniausiai pasireiškia švelnia eiga arba klinikiniai požymiai nepastebimi, tačiau kartais ji gali pasibaigti užsikrėtusio gyvūno žūtimi. Audinių ar organų pažeidimai ankstyvojoje merogonijoje, vykstančioje vidaus organų kraujagyslių endotelio ląstelėse paprastai yra didesni negu tuo metu kai formuojamos sarkocistos raumeniniuose ar nerviniuose audiniuose. Merogonijos metu merontų indukuota lokalinė ląstelių ir audinių nekrozė nėra pakankamas veiksnys, galintis sukelti sunkius susirgimus stambiems gyvūnams. Smulkiems gyvūnams kai kurių *Sarcocystis* rūšių, pavyzdžiui *S. falcatula*, *S. idahoensis* Bledsoe, 1980 merontų intensyvaus dauginimosi sukelta audinių nekrozė gali būti gyvūno žūties priežastimi (Dubey ir kt. 1989; Uglá, Buxton, 1990; O'Donghue, Rommel,

1992). Eozinofilinis miozitas (skersaruožių raumenų uždegimas dėl eozinofilų susikaupimo) dažniausiai nustatytas naminiams jaučiams (*Bos taurus*), kartais avims (*Ovis aries*), retai kiaulėms (*Sus scrofa domesticus*) ir arkliams (*Equus caballus*). Nors eozinofilinio miozito priežastis nežinoma, manoma, kad šis sutrikimas gali būti susijęs su sarkosporidijų infekcija. (Jensen ir kt., 1986). Nėra specifinių klinikinių simptomų apibūdinančių sarkocistozę, o sarkosporidijų infekcijos požymiai priklauso nuo ligos sunkumo laipsnio, lokalizacijos ir parazito rūšies.

S. cruzi, *S. tenella*, *S. capracanis* Fischer, 1979, *S. neurona*, *S. canis* Dubey, Speer, 1991 yra patogeniškiausios naminiams bei laukiniams gyvūnams sarkosporidijų rūšys. Sunkios sarkocistozės atvejais gali pasireikšti hemoraginė diatezė (padidėjęs jautrumas mechaniniams dirgikliams, pasireiškiantis kraujo išsiliejimu odoje, gleivinėse), hepatitas (kepenų uždegimas), encefalitas (galvos smegenų uždegimas), encefalomyelitas (galvos ir nugaros smegenų uždegimas). Dėl *Sarcocystis* parazitų infekcijos apvaisintos patelės gali prarasti vaisių. Manoma, kad *Sarcocystis* parazitai netiesiogiai įtakoja vaisiaus sveikatą, sustiprindami vaisių žalojančių ligų poveikį. Naminiams galvijams, avims, ožkoms (*Capra aegagrus hircus*) *S. cruzi*, *S. tenella*, *S. capracanis* sukelia aibę klinikinių simptomų – anemiją, anoreksiją, sumažėjusią pieno ar vilnos produkciją, centrinės nervų sistemos pažeidimus, vaisiaus žūtį ir abortus (Henderson ir kt., 1997). *S. canis* sukelia hepatitus grizliams (*Ursus arctos horribilis*), juodiesiems lokiams (*Ursus americanus*), šinšiloms (*Chinchilla lanigera*), šunims (*Canis lupus familiaris*), arkliams, stambiams jūrų žinduoliams: jūrų liūtams (*Zalophus californianus*), ruoniams (*Monachus schauinslandi*), delfinams (*Stenella coeruleoalba*) (Dubey ir kt., 2003b).

Didžiulį susidomėjimą pastaruoju metu kelia *S. neurona*, galinti sukelti letalias neurologines ligas tarpiniams šeiminkams: arkliams, jūrinėms ūdroms (*Enhydra lutris*), paprastiesiems ruoniams (*Phoca vitulina*), paprastiesiems meškėnams (*Procyon lotor*), devynjuosčiams šarvuočiams (*Dasyopus novemcinctus*), katėms, naminiams šeškams (*Mustela putorius furo*),

dryžuotiesiems skunksams (*Mephitis mephitis*), rudagalviams karviaganiams (*Molothrus ater*) (Dubey ir kt., 1991a, 2001b, 2001c; Cheadle ir kt., 2001a, 2001b; Miller ir kt., 2001; Butcher ir kt., 2002; Mansfield ir kt., 2008; Britton ir kt. 2010). *S. neurona* tarpiniai šeimininkai – arkliai užsikrečia pavojinga liga, turinčia specialų pavadinimą – arklių protozoinis encefalomyelitas (angl. equine protozoal myeloencephalitis – EPM). Arkliams pasireškia šie ligos simptomai: ataksija, silpnumas, spazminė ar sustingusi eisena, raumenų atrofijs, snukio nervų paralyžius, galvos pakrypimas, sunkumai kramtant ar praryjant maistą, nukritęs akies vokas ar lūpa, nenormalūs akių judesiai, nugaros skausmai, pozos pokyčiai, judėjimas ratu, dažnas gulėjimas, priepuoliai, išsekimas ir žūtis. Histopatologiniai pakitimai būdingi EPM aprašyti ir kitiems *S. neurona* tarpiniams šeimininkams. EPM simptomai varijuoja priklausomai nuo parazito lokalizacijos nervų sistemoje. Infekcijos židiniuose aptinkami nervų uždegimai, pabrinkimai, neuronų nekrozės (Fritz, Dubey, 2002; Saville ir kt., 2002).

2.3.3. *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekonominė žala ir prevencija

Dėl *Sarcocystis* genties patogenų didžiausių ekonominių nuostolių patiria žemės ūkio gyvulininkystės šaka. Nors ir nustatyta santykinai nedaug infekcijos protrūkių naminių gyvūnų tarpe, tačiau aprašomi užsikrėtimo sarkocistomis atvejai, sąlygojantys kliniškes ligas bei kai kurių naminių gyvulių žūtį. Dėl mėsos, vilnos, pieno sumenkusios produkcijos ar suprastėjusios kokybės galvijų, kiaulių, avių, ožkų, alpakų (*Lama pacos*) augintojai patiria kasmetinius milijoninius nuostolius. Aiškiai matomomis makroskopinėmis sarkosporidijomis užkrėsta galvijų ar avių mėsa nėra tinkama prekybai. Sarkocistozės ekonominė žala, su retomis išimtimis, kol kas beveik nebuvo vertinama (O'Donoghue, Rommel, 1992). Kol kas dar nesukurtos vakcinos apsaugančios nuo kliniškes sarkocistozės. Pagrindinės prevencinės priemonės prieš sarkocistozės plitimą pateikiamos žemiau.

Nevertėtų maitinti mėsdžius nevirta mėsa ar dvėseliena, o inkubuojant užkrėstą mėsą 20 minučių, esant 55°C ir aukštesnei temperatūrai, sunaikinamos sarkocistos. Negyvus naminius gyvūnus reikėtų užkasti ar sudeginti, o ne palikti laukuose plėšrūnams. Plėšrūnai neturėtų patekti į gyvulių laikymo, maitinimo ir girdymo vietas (Dubey ir kt., 1989).

2.4. *Sarcocystis* parazitų įvairovė tarpiniuose ir galutiniuose šeimininkuose

2.4.1. Žmonių *Sarcocystis* parazitai

Žmonių sarkocistozę galima suskirstyti į žarnyno (žmogus *Sarcocystis* rūšių galutinis šeimininkas) ir raumenų (žmogus rūšių *Sarcocystis* tarpinis šeimininkas). Žmogus yra dvejų *Sarcocystis* rūšių galutinis šeimininkas: *S. hominis*, *S. suihominis*. Žmonės gali užsikrėsti *S. hominis* arba *S. suihominis* valgydami termiškai neapdorotą jautieną arba kiaulieną. *S. hominis* tarpiniai šeimininkai yra galvijai, buivolai, bizonai, o *S. suihominis* – kiaulės, šernai. Lenkijoje ir Vokietijoje ištyrus vaikų fekalijas, atitinkamai 10,3% ir 7,3% mėginių buvo surastos sarkosporidijų sporocistos (Fayer, 2004).

Iki šiol nustatyta virš šimto žmonėms sarkocistų sukeltų susirgimų. Dažniausiai raumenų sarkocistožė buvo identifikuota tropiniuose arba subtropiniuose regionuose, ypač Pietryčių Azijoje. Serologinių tyrimų Vakarų Malaizijoje duomenimis 19,7% iš 243 tirtų žmonių turėjo antikūnus prieš *Sarcocystis* parazitų antigenus, o tai parodo, kad sarkocistožė yra dažna, tačiau retai identifikuojama infekcija Malaizijoje (Thomas, Dissanaik, 1978). Masiškiausias užsikrėtimo sarkocistomis atvejis, kai iš 15 JAV kariškių grupės Malaizijoje septyniems pasireiškė *Sarcocystis* parazitų infekcijos požymiai (Arness ir kt., 1999). Raumeninės sarkocistožės simptomais gali būti karščiavimas, patinimai, išbėrimai, chroniški raumenų skausmai, eozinofilija, bronchospazmai, kraujagyslių ar limfmazgių uždegimai (Pampllett, O'Donoghue, 1990; Van den Enden ir kt., 1995). Kol kas nėra žinoma kokia

Sarcocystis rūšis arba rūšys žmonių raumenyse formuoja sarkocistas. Žmogus yra atsitiktinis tarpinis *Sarcocystis* parazitų šeimininkas. Manoma, kad žmogus sarkocistomis užsikrečia per plėšrūno, mintančio primatais, fekalijomis užterštą maistą arba vandenį (Fayer, 2004). 1 lentelėje pateikiamas apibendrintas *Sarcocystis* parazitų žmonėms sukeltų ligų pasireiškimas.

1 Lentelė. *Sarcocystis* parazitų sukeliama ligų pasireiškimas žmonėse.

Savybės	Raumenų infekcija	Žarnyno infekcija
Infekcijos šaltiniai	Nežinomo mėsėdžio ar visaėdžio išmatomis užterštas maistas ar vanduo	Žalia mėsa
Rūšys	Nežinoma	<i>S. hominis</i> , <i>S. suihominis</i>
Laikas nuo užsikrėtimo iki simptomų pasireiškimo	Savaitės, mėnesiai	3-6 valandos
Simptomų pasireiškimo trukmė	Nuo kelių mėnesių iki kelių metų	36 valandos
Simptomai	Raumenų skausmai, karščiavimas, išbėrimai, patinimai	Pykinimas, vėmimas, apetito netekimas, diarėja, dusulys
Terapija	Antikocidiniai preparatai	Nėra

2.4.2. Žinduolių *Sarcocystis* parazitai

Sarkosporidijos labiausiai paplitusios placentiniuose žinduoliuose. Keletas *Sarcocystis* rūšių nustatyta sterbliniuose, iš kurių daugiausia oposumuose Australijoje, Šiaurės ir Pietų Amerikoje. Daugiausia *Sarcocystis* rūšių aprašyta atrajojančiuose porakanopiuose (Ruminantia pobūris).

Išsamiausiai tyrinėtos ir didžiausią susidomėjimą dėl ekonominių, socialinių aspektų, bei galimo infekcijos pernešimo žmonėms, kelia domestikuotuose žinduoliuose randamos sarkosporidijų rūšys. Beveik visoms naminiuose gyvūnuose parazituojančioms *Sarcocystis* rūšims nustatyti jų galutiniai šeimininkai, įvertintas užsikrėtimo mastas, patogeneniškumas, taip pat tirtos genetinės bei imunologinės charakteristikos. Naminių gyvūnų užsikrėtimo laipsnis *Sarcocystis* rūšimis svyruoja nuo 10% iki 100%. Paprastai

labiausiai sarkocistomis būna apsikrėtę galvijai, avys, ožkos. Naminiuose gyvūnuose parazituojančių sarkosporidijų galutiniai šeimininkai yra šuninių, katinių šeimos plėšrūnai ir žmogus. Domestikų žinduolių raumenyse identifikuotų *Sarcocystis* rūšių skaičius varijuoja nuo vienos iki šešių: lamose (*Lama glama*), alpakose, triušiuose (*Oryctolagus cuniculus*) – po vieną; kupranugariuose (*Camelus gentis*), jakuose (*Bos grunniens*) – po dvi; ožkose, kiaulėse, – po tris; avyse, jaučiuose – po keturias; Azijiniuose buivoluose (*Bubalus bubalis*) ir šiauriniuose elniuose – po šešias. Kol kas lieka neaišku kiek rūšių parazituoja arklių raumenyse, manoma, kad *S. bertrami* Doflein, 1901, *S. asinus* Gadaev, 1978, *S. equicanis* Rommel, Geisel, 1975 ir *S. fayeri* Dubey, Streitl, Stromberg, Toussant, 1977 yra sinonimai (Levine, 1986; Dubey ir kt., 1989; Odening 1998).

Sarkosporidijomis taip pat gausiai užsikrėtę elninių šeimos bei graužikų būrio atstovai. Elninių šeimos rūšyse parazituoja daugiau kaip 25 *Sarcocystis* rūšys, o graužikuose atrasta apie 40. Plėšrieji žinduoliai (Carnivora būrys) paprastai yra galutiniai sarkosporidijų šeimininkai (apie 60 *Sarcocystis* rūšių), bei keleto rūšių (pavyzdžiui, *S. felis* Dubey, Hamir, Kirkpatrick, Todd, Rupprecht, 1992, *S. canis*, *S. hofmanni*, *S. melis* Odening, Stolte, Walter, Bockhardt, 1994, *S. erdmanae* Odening, 1997) tarpiniai šeimininkai.

2.4.3. Paukščių *Sarcocystis* parazitai

Paukščių raumenyse sarkocistas sudaro daugiau kaip 25 *Sarcocystis* rūšys, deja gyvybinis ciklas išaiškintas tikrai dešimčiai iš jų. Aprašytos dvi vištų (*Gallus gallus domesticus*) sarkosporidijų rūšys: *S. wenzeli* Odening, 1997, kurios galutinis šeimininkas yra šuo arba katė ir *S. horvathi* Rátz, 1909, kurios galutinis šeimininkas nežinomas (Odening, 1997). Įvairiose ančių rūšyse aptinkamos makroskopinės ryžio formos sarkocistos priskiriamos *S. rileyi* rūšiai, kuri gyvybinį ciklą užbaigia dryžuotojo skunso žarnyne. Ši rūšis pasižymi tik švelniu patogeniškumu. Eksperimentiškai užkrėtus antis,

nepastebėta jokių klinikinių simptomų, o natūraliai infekuotose antyse aptikta raumeninio audinio granuloma (Dubey ir kt., 2003a). Žąsyse ir kalakutuose (*Meleagris gallopavo*) aptiktos sarkocistos iki šiol buvo apibūdintos tik iki genties (*Sarcocystis* sp.), nesuteikiant specifinių lotyniškų rūšies pavadinimų (Wobeser ir kt., 1981; Dubey ir kt., 2000; Kutkienė, Sruoga, 2004).

Paukščiuose parazituoja kelios labai patogeniškos rūšys: *S. falcatula*, *S. calchasi*, *S. neurona*, galinčios sukelti paukščių žūtį. *S. falcatula* tarpiniais šeimininkais gali būti žvirblinių (*Passeriformes*), papūginių (*Psittaciformes*), karvelinių, gegutinių (*Cuculiformes*) būrio paukščiai, o galutiniu šeimininku yra Virdžinijos oposumas. *S. falcatula* būdinga daugiau merontų kartų, palyginus su kitomis sarkosporidijų rūšimis, tačiau visi merozoitai struktūriškai yra panašūs. *S. falcatula* merozoitų vystymasis, besitęsiantis net iki penkių su puse mėnesio lemia šio parazito stiprų patogeniškumą paukščiams. *S. falcatula* sukelia mirtinas ligas, tuo atveju kai merogonija vyksta plaučių ar širdies kapiliarų endotelyje (Box, Duszynski, 1978; Box, Smith, 1982; Box ir kt., 1984; Smith ir kt., 1989; Smith ir kt., 1990). *S. neurona*, liūdnai pagarsėjusi kaip sukelianti encefalitus įvairiems žinduoliams, neseniai buvo identifikuota ir rudagalviame karviaganiumi (*Molothrus ater*) (Mansfield ir kt., 2008). *S. calchasi* sukelia centrinės nervų sistemos sutrikimus naminiams karveliams (*Columbia livia* f. *domestica*) ir yra pernešama vištvanagio (*Accipiter gentilis*). 2006-2008 metais Berlyne, Vokietijoje iš trijų pašto karvelių pulkų ištyrus 244 individus, 47 aptiktos *S. calchasi* sarkocistos. *S. calchasi* infekcijos klinikiniai simptomai: depresija, švelni diarėja, tortikolis, paralyžius, drebulys (Olias ir kt., 2009; 2010a; 2010b).

Plėšrieji paukščiai yra keliolikos *Sarcocystis* rūšių galutiniai šeimininkai (Cawthorn ir kt., 1984; Černá, Kvašňovská, 1986; Espinosa ir kt., 1988; Yabsley ir kt., 2009; Olias ir kt., 2010b), tačiau kartais būna ir tarpiniais šeimininkais. Iki šiol aprašytos tik dvi mėsdžių paukščių *Sarcocystis* rūšys (*S. nontenella* Levine, Tadros, 1980 ir *S. otus* Krone, Rudolph, Jakob, 2000) – abi aptiktos paprastajame suopyje (*Buteo buteo*) (Levine, Tadros, 1980; Krone ir kt., 2000). Sarkocistos taip pat buvo aptiktos vanagų (*Accipitrinae* pošeimis), sakalų (*Falco* gentis), pelėdų (*Strix* gentis),

grifų (Aegypiinae pošeimis) raumenyse (Lindsay and Blagburn 1999). Sarkosporidijos indukavo encefalitus vištvanagyje ir kilniajame erelyje (*Aquila chrysaetos*) (Aguilar ir kt., 1991; Dubey ir kt., 1991b). Neseniai atskleistas įdomus *Sarcocystis* parazitų gyvybinio ciklo modelis, kai *S. ovalis* Dahlgren, Gjerde, 2008 formuojančios sarkocistas briedžio raumenyse galutiniu šeimininku nustatyta šarka (*Pica pica*). Be to manoma, jog *S. ovalis* galutiniu šeimininku gali būti ir kiti varniniai paukščiai (Gjerde, Dahlgren, 2010).

2.4.4. Roplių *Sarcocystis* parazitai

Ropliuose, kaip tarpiniuose šeimininkuose, parazituoja apie 20 sarkosporidijų rūšių. Sarkocistos aptiktos įvairių genčių driežuose (Lacertidae šeima), gekonuose (Gekkonidae šeima), scinkuose (Scincidae šeima), pitonuose (Pythonidae šeima), chameleonuose (Chamaeleonidae šeima), vėžliuose (Testudines būrys) (Matuschka, 1987). Nei viena *Sarcocystis* rūšis ropliams nesukelia jokių pastebimų klinikinių ligos simptomų. Raumenų uždegimas dėl *S. kinosterni* Lainson, Shaw, 1971 sarkocistų buvo užfiksuotas natūraliai užsikrėtusiame skorpioniniame dumblavėžlyje (*Kinosternon scorpioides*) (Lainson, Shaw, 1971). Apie 25 *Sarcocystis* rūšys savo gyvybinį ciklą užbaigia įvairiose roplių rūšyse. Dažniausiai tokių sarkosporidijų rūšių tarpiniais šeimininkais būna įvairūs smulkūs graužikai: žiurkės, pelės, pelėnai, žiurkėnai ir kt. (Matuschka, 1987). Verta pažymėti, jog Lietuvoje ropliai ieškant *Sarcocystis* rūšių kol kas nebuvo tyrinėti.

2.5. *Sarcocystis* parazitų paplitimo ir gausumo įvertinimas

2.5.1. Infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas

Parazitų pasiskirstymas šeimininko populiacijoje retai būna atsitiktinis. Dažniausiai dauguma šeimininko individų yra užsikrėtę mažu tam tikros parazitinės rūšies kiekiu, o keletas individų turi didelį parazitų kiekį. Toks reiškinys vadinamas parazitų agregacija – netolygus parazitų pasiskirstymas

tarp šeimininkų, kai dauguma infrapopuliacijų (tos pačios rūšies parazito individai esantys tame pačiame šeimininko individe) bus mažos ir keletas didelių. Todėl parazitų tankio vidurkis, t.y. parazitų skaičius tenkantis vienam šeimininkui yra nelabai tinkamas dydis apskaičiuojant parazitų paplitimą. Vertinant parazitų paplitimą šeimininko populiacijoje, žymiai naudingiau vartoti ekstensyvumo statistikas. Infekcijos ekstensyvumas apibūdinamas, kaip užsikrėtusių individų procentinė išraiška tarp visų ištirtųjų individų. Infekcijos sunkumas skirtingai pasireiškia tarp šeimininko populiacijos individų ir dažniausiai būna susijęs su parazitų skaičiumi tam tikrame individe arba, kitaip sakant, priklauso nuo užsikrėtimo intensyvumo. Dėl minėtų priežasčių, vertinant parazito gausumą, apskaičiuojamas infekcijos intensyvumas. Infekcijos intensyvumas parodo infekcijos stiprumo laipsnį viename šeimininko individe.

Teoriškai, infekcijos intensyvumo ir ekstensyvumo kriterijai per ilgą laiką pasižymi stabilumu tam tikroje šeimininkų rūšyje, o per trumpą periodą fiksuojamos variacijos. Intensyvumas svyruoja mažiau tarp šeimininko populiacijų, negu tarp skirtingų rūšių. Tuo tarpu ekstensyvumas ryškiai varijuoja tarp populiacijų (Poulin, 2007).

Ieškant sarkocistų tarpiniuose šeimininkuose, vertinamas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas. Dauguma sarkosporidijų rūšių formuoja mikroskopines cistas, todėl norint nustatyti sarkosporidijų infekcijos intensyvumą tam tikrame individe, visų sarkocistų suskaičiavimas yra beveik neįmanomas ir betikslis. Naudojama keletas *Sarcocystis* parazitų paieškos bei ekstensyvumo ir intensyvumo įvertinimo metodų: kompresinis-mikroskopinis, kompresinis-trichonoskopinis, histologinis, virškinimo (arba tripsinizacijos). Apžvelgus stirnų sarkosporidijų ekstensyvumo tyrimus, pastebėtas ryšys tarp naudoto metodo ir infekcijos ekstensyvumo (Malakauskas ir kt., 2001). Netiksliausiu laikomas kompresinis-trichonoskopinis nedažytų raumenų iškarpų tyrimo metodas. Nors raumenų virškinimo metodas laikomas tiksliausiu, tačiau šis metodas nėra efektyvus sunaudojamo laiko atžvilgiu. Histologinio tyrimo metu ištiriamas labai mažas raumenų kiekis. Kompresinio-

mikroskopinio metodo esmė – raumenų sukarpymas, nudažymas ir šviesiniu mikroskopu analizavimas kompresoriuje, suskaičiuojant sarkocistas. Kartais, tiriant šiuo metodu, infekcijos intensyvumas skirstomas į kategorijas. Bogush (1976) pasiūlė sarkosporidijų infekcijos intensyvumo grupavimą kiaulienos 24 raumenų išpjovose pagal cistų skaičių į tris klases: silpna infekcija 1-10; vidutinė infekcija 11-40; intensyvi infekcija 41 ir daugiau.

2.5.2. Intensyvumo ir ekstensyvumo vertinimo problematika

Dažniausiai labai sunku palyginti *Sarcocystis* parazitų ekstensyvumo ir intensyvumo duomenis. Pagrindinės autoriaus suklasifikuotos priežastys pateikiamos žemiau. Naudojami skirtingi analizės metodai, tiriamos skirtingos kūno dalys ar vietos, dažnas tirtų imčių skirtingumas pagal amžines ar lytines grupes, nevienodas medžioklės, kurios metu surenkami sumedžiotų gyvūnų audiniai tyrimams, metų laikas. Taip pat vertėtų atkreipti dėmesį į žmogiškąjį faktorių, tai yra nevienodą tyrėjų patirtį. Jeigu infekcijos intensyvumas yra labai mažas, sarkocistos gali būti neaptiktos ištyrus tik vieną kompresorių.

2.5.3. Intensyvumą ir ekstensyvumą įtakojantys veiksniai

Sarkocistos dažnai atrandamos ne vienodu dažniu, skirtingose raumenų grupėse. Pavyzdžiui, Irane ištyrus 400 vienakuprių kupranugarių (*Camelus dromedaries*) nustatyti statistiškai patikimi *Sarcocystis* parazitų ekstensyvumo skirtumai liežuvio, stemplės, širdies ir diafragmos raumeniniuose audiniuose (Shekarforoush ir kt., 2006). Malakauskas ir Grikienienė (2002) tauriuosiuose elniuose, stirnose, dėmėtuosiuose elniuose ir šernuose aptiko žymiai daugiau sarkocistų širdies ir stemplės raumenyse, lyginant su diafragmos raumenų grupe. Brazilijoje tiriant arklių tas pačias raumenų grupes, didžiausias infekcijos dažnis buvo nustatytas liežuvio ir stemplės raumenyse (Bonesi ir kt., 1999). Kai kurios *Sarcocystis* rūšys aptinkamos tik tam tikroje raumenų

grupėje, pavyzdžiui *S. grueneri* aptikta tik šiaurinių elnių širdyje (Dahlgren, Gjerde, 2007).

Dažnai pastebima sarkosporidijų infekcijos intensyvumo ir ekstensyvumo priklausomybė nuo amžiaus, kai senesniuose gyvūnuose aptinkama daugiau sarkocistų (Fukuyo ir kt., 2002; Hvizdošová, Goldová, 2009). Jaunikiuose daugeliu atvejų fiksuojamas žymiai mažesnis infekcijos ekstensyvumas, lyginant su kitomis amžinėmis grupėmis (Fedynich, Pence, 1992; Atkinson ir kt., 1993; Rajković-Janje ir kt., 2004).

Pasitaiko atvejų, kai fiksuojami patikimi infekcijos intensyvumo skirtumai priklausomai nuo gyvūno lyties. Slovakijoje laukinių porakanopių žinduolių patinų raumenyse nustatytas patikimai didesnis sarkosporidijų infekcijos intensyvumas, lyginant su raumenimis (Goldová ir kt., 2008). Vokietijoje taurių elnių patinai buvo intensyviau užsikrėtę sarkocistomis negu patelės, tačiau stirnose tarp skirtingų lyčių reikšmingi skirtumai nepastebėti (Partenheimer-Hannemann, 1991).

Įdomus atvejis registruotas Peru, kur aviganių šunų, gyvenančių prie alpų fermų, išmatose ieškota *Sarcocystis* parazitų sporocistų. Šunyse nustatytas patikimai didesnis infekcijos ekstensyvumas lietingojo sezono metu, lyginant su sausuoju sezonu (Choque ir kt., 2007).

2.6. *Sarcocystis* rūšių identifikacija ir naujų rūšių aprašymas

2.6.1. Istorinis aspektas

Diagnostiniai naujų *Sarcocystis* rūšių aprašymo, identifikacijos ir jau žinomų rūšių diferenciacijos metodai vystėsi tapdami vis sudėtingesniais. Pirmas pranešimas apie *Sarcocystis* parazitus užfiksuotas Šveicarijoje 1843 m., kai Miescher aprašė „pieno baltumo siūlus“ naminės pelės skeleto raumenyse. Vėliau sarkosporidijos buvo vadinamos nevarojant genties pavadinimo, tiesiog Mišerio vamzdeliais. 1865 m. Kühn atrado panašų parazitą kiaulės raumenyse ir pavadino jį *Synchytrium mieschierianum*. Kadangi šios genties pavadinimas

jau buvo suteiktas kitai grupei, Lankester pasiūlė naują *Sarcocystis* genties vardą (gr. sarco = raumuo), o Labbé pervadino *Synchytrium mieschieriana* į *Sarcocystis mieschieriana*. Tokiu būdu *S. mieschieriana* (Kühn, 1865) Labbé, 1899 tapo tipine genties rūšimi, o Miescher pelėje atrastam parazitui suteiktas *S. muris* vardas (Dubey ir kt., 1989).

Vėliau sarkosporidijų rūšių pavadinimai buvo suteikiami pagal sarkocistų, atrastų tarpinių šeimininkų raumenyse morfologinius požymius apibūdintus stebint plika akimi ar šviesiniu mikroskopu. Tokiu būdu aprašytos *S. aramidis* Splendore, 1907, *S. colii* Fantham, 1913, *S. rileyi* ir daug kitų sarkosporidijų rūšių (Kalyakin ir Zasukhin 1975).

Išaiškinus *Sarcocystis* parazitų gyvybinį ciklą, *Sarcocystis* rūšys pradėtos vadinti kombinuojant tarpinių ir galutinių šeimininkų pavadinimus. Pagal šiuos principus, Heydorn ir kt. (1975) pasiūlė naujus pavadinimus trims rūšims, kurių tarpiniai šeimininkai galvijai: *S. bovicanis*, *S. bovifelis*, *S. bovihominis* ir dviems rūšims, kurių tarpinis šeimininkas avys *S. ovicanis* ir *S. ovifelis*. Vadovaujantis tarptautiniu zoologinės nomenklatūros kodeksu, toks naujų rūšių sudarymo būdas buvo atmestas ir pasiliko senieji *Sarcocystis* rūšių pavadinimai. Taip pat paaiškėjo, jog *Sarcocystis* rūšys dažnai turi keletą galimų galutinių šeimininkų, todėl nauja sarkosporidijų rūšis negali būti aprašyta tik pagal vieną galutinį šeimininką (Levine, Tadros, 1980).

Transmisinė elektroninė mikroskopija palengvino skirtingų *Sarcocystis* parazitų gyvybinio ciklo stadijų morfologinę analizę. Sarkocistos sienelės ultrastruktūra tapo pagrindiniu *Sarcocystis* rūšių diagnostiniu kriterijumi (Mehlhorn, Heydorn, 1978; Dubey ir kt., 1989). Tačiau sunku identifikuoti *Sarcocystis* rūšis, kurios taksonomiškai artimuose tarpiniuose šeimininkuose formuoja morfologiškai panašias sarkocistas. Kai morfometriniai skirtumai tarp sarkosporidijų rūšių nėra reikšmingi, *Sarcocystis* rūšys atskiriamos taikant DNR analizę. Pastaruoju metu keletas naujų sarkosporidijų rūšių aprašytos derinant morfologinių ir DNR tyrimų rezultatus (Dubey ir kt., 2001a; Dahlgren, Gjerde, 2008, 2009, 2010; Olias ir kt., 2010b; 2010c).

2.6.2. Galutinių šeimininkų nustatymo tyrimai

Pirmą kartą *Sarcocystis* parazitų lytinė fazė kultivuota *in vitro* 1972 m., kai sarkocistų cistozoitai iš paukščių raumenų inokuliuoti į stuburinių ląstelių kultūrą, išsivystė į lytinės stadijos oocistas (Fayer, 1972). Po kelių metų buvo nustatyti galutiniai sarkosporidijų rūšių šeimininkai, kurios sudaro galvijų bei avių sarkocistas, šeimininkai (Heydorn ir kt., 1975). Išsiaiškinta, jog avių raumenyse parazituoja dvi sarkosporidijų rūšys, iš kurių vienos galutinis vystymasis vyksta šunyse, kitos – katėse; o galvijuose parazituoja trys sarkosporidijų rūšys, viena formuoja oocistas šunų, kita kačių, trečia žmonių žarnyne. *Sarcocystis* parazitų lytinės stadijos nustatymas paspartino naujų rūšių atradimą, bei pakoregavo kai kurių anksčiau aprašytų rūšių pavadinimus. Šiuo metu galutiniai šeimininkai žinomi mažiau negu pusei visų sarkosporidijų rūšių.

2.6.3. Fenetinė analizė

Sarkocistos forma ir dydis varijuoja bręstant sarkocistai, taip pat priklauso nuo šeimininko ląstelės tipo, išskyrimo ar fiksavimo metodo, todėl identifikuojant *Sarcocystis* rūšis, šiuos morfologinius parametrus vertėtų vertinti atsargiai (Levine, 1986; Tenter, 1995). Kai kurios *Sarcocystis* rūšys, kaip antai *S. bertrami*, *S. medusiformis* auga keletą metų jau po to, kai tampa infektyviomis. Tos pačios rūšies sarkocistos širdies raumenyse ar centrinėje nervų sistemoje visada yra mažesnės lyginant su randamomis skeleto raumenyse. Sarkocistos forma gali priklausyti nuo lokalizacijos organizme, pavyzdžiui *S. gigantea* stemplėje yra rutulio ar kriaušės formos, o diafragoje – plona ir ištįsusi. Sarkocistos visada yra smulkesnės fiksuotuose pavyzdžiuose lyginant su natyviniais preparatais. Kadangi sarkocistos dažnai aptinkamos susitraukiančiuose raumenyse, todėl jų dydis varijuoja priklausomai nuo to, kokiaje būsenoje fiksavimo metu buvo šeimininko ląstelė – ar susitraukusi, ar atsipalaidavusi (Dubey ir kt., 1989). Preparuojant (ypatingai iš širdies raumens)

galima pažeisti sarkocistos sienelės išaugas, taip pat išaugos gali būti nepastebėtos dėl prie sarkocistos tampriai prigludusio skaidulinio sluoksnio (Dahlgren ir Gjerde 2009).

Metrocitu struktūra nėra naudingas kriterijus nustatant *Sarcocystis* rūšį, nes metrocitai dažnai yra netaisyklingos formos, o jų dydis ypatingai greitai keičiasi kiekviename dalijimosi etape (Mehlhorn, Heydorn, 1978). Cistozoitai dažniausiai yra banano formos, o jų išlinkimai labai varijuoja, todėl jų morfometrines charakteristikas sunku įvertinti, tačiau kai kurios *Sarcocystis* rūšys pasižymi tik joms būdingos formos cistozoitais ir gali būti vienas iš diagnostinių kriterijų (Kutkienė ir kt., 2006). Merozoitų struktūra yra ribotos taksonominės vertės, nes merozoitai ypatingai stipriai skiriasi priklausomai nuo vystymosi ciklo ir šeimininko ląstelės tipo. Oocistų ir sporocistų forma svarbi identifikuojant kitus kokcidinius, tačiau *Sarcocystis* gentyje šie požymiai turi tik nedidelę taksonominę vertę. (Dubey ir kt., 1989).

Pats svarbiausias fenotipinis diagnostinis *Sarcocystis* rūšių požymis yra sarkocistos sienelės struktūra. *Sarcocystis* gentyje randamos įvairios sarkocistų ląstelės sienelės, jų sandara gali varijuoti nuo paprastų iki labai sudėtingų formų. Pirmą kartą Dubey ir kt. (1989) susistemino *Sarcocystis* rūšių cistų ultrastruktūros tyrimus ir įvardijo 24 sarkocistų sienelės tipus. Vėliau Dubey ir Odening (2001) išskyrė 37 sarkocistų sienelės tipus ir nuo to laiko naujiems tipams nebuvo suteikiami specifiniai pavadinimai. Pirminė sarkocistos sienelė susideda iš parazitoforinės vakuolės membranos ir elektronams tankaus sluoksnio, esančio žemiau parazitoforinės vakuolės membranos. Grūdėtasis sluoksnis yra žemiau pirminės sarkocistos sienelės. Iš grūdėtojo sluoksnio susiformuoja septos, suskirstančios sarkocistą į kameras, kuriose randami zoitai. Cistos sienelės diferencijuojamos pagal sienelės storį, sienelės išaugų ilgį ir formą. Sienelė gali būti beveik lygi, pasižymėti nedideliu bangavimu arba sudaryti įvairaus ilgio ir formos išaugas, atstumai tarp kurių varijuoja. Kartais ant priminių išaugų pastebimi antriniai tam tikros formos išsikišimai-išaugos (Dubey, Odening, 2001). Tame pačiame tarpiniame šeimininke randamos *Sarcocystis* rūšys dažniausiai sėkmingai identifikuojamos pagal

cistos sienelės struktūrą naudojant šviesinę mikroskopiją. Jeigu išskyla abejonių, reikalinga elektroninės mikroskopijos analizė (Mehlhorn, Heydorn, 1978). Kai tas pats sarkocistos sienelės tipas randamas daugiau negu viename tarpiniame šeimininke, cistų sienelės ultrastruktūros ir dažniausiai apskritai morfologinių tyrimų nepakanka norint identifikuoti tam tikrą sarkosporidijų rūšį. Be to pats primityviausias ir dažniausias randamas pirmas sarkocistos sienelės tipas būdingas daugiau nei 20 *Sarcocystis* rūšių, kurių tarpiniai šeimininkai – taksonomiškai tolimi gyvūnai: graužikai, dykaraginiai (Bovidae šeima), kiškiažvėriai (Lagomorpha būrys), kiauniniai (Mustelidae šeima), primatai (Primates būrys), banginiai (Cetacea būrys), ruoniai (Pinnipedia pobūris), paukščiai (Dubey ir kt., 1989).

2.6.4. DNR analizė

Tobulėjant molekuliniais tyrimo metodams, identifikuojant *Sarcocystis* rūšis ir nustatant *Sarcocystis* genties filogenetinius ryšius, vis dažniau naudojami DNR žymenys. Identifikuojant kai kurias filogenetiškai artimas sarkosporidijų rūšis fenetinės analizės neužtenka. Molekulinė analizė, padedanti patikslinti tam tikros *Sarcocystis* rūšies taksonominį statusą, dažnai naudojama kaip arbitražinis metodas atskiriant rūšį į dvi arba sujungiant į vieną. (Yang ir kt., 2001a; Olias ir kt., 2010c).

Sarcocystis rūšių molekulinei identifikacijai ir diferenciacijai dažniausiai naudojamas DNR pirminės sekos nustatymas (sekoskaita arba sekvenavimas). Daugiausiai *Sarcocystis* rūšims nustatytos ir Genų banke patalpintos 18S ir 28S ribosominės RNR (rRNR) genų sekos. Kai 18S ir 28S rRNR genų skiriamoji raiška siekiant atskirti filogenetiškai artimas Sarcocystidae šeimos rūšis yra nepakankama, rekomenduojama naudoti pirmąjį vidinį transkribuojamą tarpiklį, ITS-1 (angl. the first internal transcribed spacer) (Morrison ir kt., 2004).

ITS–1 regionas – tai nefunkcinė rRNR, esanti tarp 18S rRNR ir 5.8S rRNR genu, kuri bręstant rRNR pašalinama (Pellegrini ir kt., 1977). Lyginant Sarcocystidae šeimos rūšis, ITS–1 regionas pasižymi žymiai didesniu variabilumu negu 18S ir 28S rRNR genai. ITS–1 sekų analizė sėkmingai pritaikyta identifikuojant Toxoplasmatinae pošeimio *Besnotia*, *Hammondia*, *Neospora* genčių rūšis (Ellis ir kt., 2000; Šlapeta ir kt., 2002b; 2002c). Sprendžiant iš 18S rRNR geno sekų suliginimo buvo manoma, jog patogenezės požiūriu labai svarbios *S. neurona* ir *S. falcatula* yra sinoniminės rūšys (Dame ir kt., 1995; Fengeer ir kt., 1995). Tačiau vėliau imunocheminiai ir morfologiniai tyrimai parodė svarbius skirtumus tarp šių rūšių (Lindsay ir kt., 1999). Galiausiai, ITS–1 žymuo panaudotas atskiriant *S. neurona* ir *S. falcatula* rūšis (Marsh ir kt., 1999; Tanhauser ir kt., 1999). Taip pat ITS–1 regionas sėkmingai pritaikomas tiriant *Sarcocystis* rūšių izoliatų iš skirtingų geografinių sričių ar iš skirtingų tarpinių šeimininkų giminingumą (Dubey ir kt., 2006a; Rosenthal ir kt., 2008).

Identifikuojant kai kurias *Sarcocystis* rūšis, sarkosporidijų vidurūšiniuose tyrimuose kartais naudojami SDS-PAGE (angl. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), IFA (angl. immunofluorescent assay), RAPD (angl. random amplified polymorphic DNA), AFLP (angl. amplified fragment length polymorphism), RFLP (angl. restriction fragment length polymorphism) molekuliniai metodai (Elsheikha ir kt., 2006; Elsheikha, Mansfield, 2007; Jehle ir kt., 2009; Xiang ir kt., 2009).

2.7. *Sarcocystis* parazitų specifiškumas šeimininkui

2.7.1. Parazitų specifiškumas šeimininkui

Labai specifiški šeimininkui parazitai gali parazituoti tik vienoje šeimininkų rūšyje, o galimų šeimininkų skaičiui didėjant, specifiškumo lygis mažėja. Specifiškumas šeimininkui žymiai mažiau varijuoja tarp tos pačios rūšies populiacijų, negu tarp rūšių. Specifiškumą didina „susitikimo“ ir

„atitikimo“ filtrai, apspęsti ekologinių, etiologinių, morfologinių, fiziologinių, imunologinių priežasčių. Didelio specifiškumo tam tikram parazitiniam taksonui pranašumai – didesnė parazitų koncentracija viename šeimininke, intensyvesni genų mainai tarp individų ir didesnė genetinė įvairovė, tačiau pagrindinis trūkumas, jog tam tikroje teritorijoje šeimininkas gali išnykti. Manoma, kad evoliucija vyksta tiek specifiškumo šeimininkui didėjimo, tiek mažėjimo kryptimis. Didelės parazitų taksonominės grupės viduje, dauguma parazitų rūšių linkusios būti labai specifinės šeimininkui (Poulin, 2007).

Apskaičiuojant parazitų specifiškumą šeimininkui, naudojami skirtingi indeksai: S, STD, STD*. Vertinant parazitų specifiškumą šeimininkui reikėtų atsižvelgti į ekologinius ir filogenetinius aspektus. Kai parazitas koncentruojasi daugiausiai vienoje šeimininko rūšyje – specifiškumas didėja; kai pasiskirsto po lygiai tarp šeimininkų – specifiškumas mažėja. Jeigu dvi parazitų rūšys naudoja tą patį šeimininkų rūšių skaičių, labiau specifiškesnė parazitų rūšis bus ta, kurios šeimininkų rūšys yra giminingesnės. STD* koeficientas yra tiksliausias ir korektiškiausias, apimantis ekologinius ir evoliucinius specifiškumo šeimininkui veiksnius. Apskaičiuojant STD*, suteikiami svertiniai koeficientai pagal taksonominį giminingumą ir parazito ekstensyvumą skirtinguose šeimininkuose (Poulin, Mouillot, 2005). Specifiškumo šeimininkui vertinimas turėtų būti atsargus ir kritiškas, o didžiausias neteisingos interpretacijos pavojus išskyla dėl menkų žinių apie parazitinės rūšies paplitimą, gausumą. Pasitaiko atveju, kai tam tikros parazitinės rūšies žinomų šeimininkų skaičius koreliuoja su atliktų tyrimų skaičiumi (Poulin, 2007).

2.7.2. *Sarcocystis* parazitų specifiškumas tarpiniam ir galutiniam šeimininkui

Iki šio laiko vyrauja nuomonė, jog dauguma *Sarcocystis* rūšių yra griežtai specifinės tarpiniam šeimininkui, tai yra gali parazituoti tik vienoje tarpinių šeimininkų rūšyje. Tuo tarpu sarkosporidijų specifiškumas galutiniam

šeimininkui yra žymiai mažesnis. *Sarcocystis* rūšis galima suskirstyti pagal transmisiją per tam tikros stuburinių klasės galutinius šeimininkus: roplius, paukščius, žinduolius. Pastebėtas aiškus dėsningumas, jog *Sarcocystis* rūšys, plintančios per šuninių šeimos plėšrūnus, negali užkrato pernešti per katinių šeimos rūšį ir atvirkščiai. Išimtimi galbūt galima laikyti *S. wenzeli* rūšį. Odening (1997) pateikia dvi *Sarcocystis* rūšis, kurių tarpiniai šeimininkai vištos: *S. wenzeli* – galutinis šeimininkas šuo arba katė ir *S. horvathi* – galutinis šeimininkas nežinomas. Kai kurie autoriai vis dėlto mano, kad *S. wenzeli* galutiniu šeimininku tarnauja tik katės, o kitos vištų raumenyse sarkocistas sudarančios *S. horvathi* rūšies galutinis šeimininkas yra šuo (Olias ir kt., 2009). Eksperimentiškai įrodyta, jog *Sarcocystis* rūšis, kurių galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos žinduoliai, platina keletas šuninių šeimos plėšrūnų. Pavyzdžiui, *S. cruzi* galutiniais šeimininkais gali būti vilkai (*Canis lupus*), šunys, kojotai (*Canis latrans*), rudosios lapės (*Vulpes vulpes*) (Dubey ir kt., 1989).

2.7.3. *Sarcocystis* rūšių mažesnio specifiškumo tarpiniam šeimininkui įrodymai

Remiantis literatūriniais šaltiniais galima išskirti *Sarcocystis* rūšių specifiškumo tarpiniam šeimininkui dėsningumus, priklausomai nuo tam tikros šeimininkų grupės. Manoma, kad mažesniu specifiškumu pasižymi sarkosporidijos parazituojančios smulkiuose graužikuose, elniniuose ir paukščiuose (Box ir kt., 1984; Dubey ir kt., 1989; Wesemeier, Sedlaczek, 1995a; Dahlgren, Gjerde, 2010a).

Morfologiškai panašios sarkocistos dažnai randamos skirtingose tarpinių šeimininkų rūšyse (Odening, 1998). Pavyzdžiui, žąsiniuose paukščiuose nustatyta keletas morfologinių sarkocistų tipų, sutinkamų keliose skirtingose šeimininkų rūšyse (Drouin, Mahrt, 1980; Wobeser ir kt., 1981; Kutkienė, Sruoga, 2004). Norint atsakyti į klausimą ar taksonomiškai artimose šeimininkų rūšyse randamos morfologiškai neatskiriamos sarkocistos priklauso vienai ar skirtingom *Sarcocystis* rūšims, reikalingi detalesni tyrimai:

molekulinė analizė ar kryžminiai užkrėtimo eksperimentai. Eksperimentiškai pademonstruota, jog mažiausiai specifinė paukščių sarkosporidijų rūšis yra *S. falcatula*, kuri parazituoja keturių skirtingų paukščių būrių atstovuose (Box, Duszynski, 1978; Box, Smith, 1982; Box ir kt., 1984).

Remiantis molekuliniiais tyrimais, išaiškinta, jog kai kurių *Sarcocystis* rūšių specifiškumas apribotas taksonominiu šeimos lygmeniu. Lyginant 18S rRNR genų sekas, nustatyta, kad penkios *Sarcocystis* rūšys: *S. hardangeri*, *S. hjorti*, *S. ovalis*, *S. tarandi* Gjerde, 1984, *S. rangiferi* Gjerde, 1984 aptinkamos tiek briedžių, tiek tauriųjų elnių raumenyse (Dahlgren, Gjerde, 2010a), tačiau *S. rangiferi* genetinių duomenų vertinimas yra prieštaringas. Taip pat molekuline analize patvirtinta, jog *S. cruzi*, *S. hirsuta* Moulé, 1888, *S. hominis* ir *S. sinensis* Zou, Chen, Li, Ma, Tang, Fan, Zhao, 1995 randamos ne tik naminių jaučių, bet ir Azijinių buivolų raumenyse (Yang ir kt., 2001a; 2001b; Jehle ir kt., 2009).

Naudojant skirtingus tyrimo metodus (morfologinius, imunologinius, genetinius, klinikinius) nustatyta, kad mažiausiu specifiškumu tarpiniam šeimininkui iš visų *Sarcocystis* rūšių pasižymi *S. neurona*, parazituojanči mažiausiai devyniose taksonomiškai tolimose gyvūnų rūšyse (Dubey ir kt., 1991a, 2001b, 2001c; Cheadle ir kt., 2001a, 2001b; Miller ir kt., 2001; Butcher ir kt., 2002; Mansfield ir kt., 2008; Britton ir kt., 2010).

Specifiškumo indeksų skaičiavimas *Sarcocystis* rūšių atveju nėra tikslingas, nes dauguma *Sarcocystis* rūšių yra specifinės vienam tarpiniam šeimininkui, o galutinių šeimininkų nustatymas yra sudėtingas, todėl *Sarcocystis* rūšių specifiškumo galutiniam šeimininkui įvertinimas galimas tik retais atvejais.

2.8. *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai tyrimai

2.8.1. Molekuliniai žymenys, naudojami *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinėje analizėje

Sarcocystidae šeimos filogenetinėje analizėje dažniausiai naudojami 18S rRNR ir 28S rRNR genų fragmentai. Šių genų sėkmingą pritaikymą lemia visuotinis paplitimas tarp eukariotų, pakankamas ilgis leidžiantis daryti patikimas filogenetines išvadas, konservatyvių ir variabilių fragmentų optimalus santykis bei sąlyginai nesudėtingas pradmenų parinkimas. Mozaikinė rRNR struktūra suteikia filogenetiniams eksperimentams lankstų pritaikomumą, nes galima tirti artimai giminingus ir mažiau susijusius organizmus, o tai ypatingai svarbu analizuojant labai heterogeninės *Sarcocystis* genties rūšis (Mugridge ir kt., 2000; Morrison ir kt., 2004).

Sarcocystis genties rūšių filogenetiniai tyrimai daugiausia paremti 18S rRNR genų sekų sulyginimu. Populiarumą labiausiai lėmė beveik dvigubai trumpesnis 18S rRNR geno ilgis (~1850 bp), lyginat su 28S rRNR genu (~3600 bp), todėl 18S rRNR geno fragmentą techniškai lengviau ir pigiau padauginti (amplifikuoti), bei nuskaityti jo pirminę seką. Pagrindinis 18S rRNR geno pranašumas – tai, kad būtent šio geno pilnos arba beveik pilnos sekos nustatytos didžiausiam *Sarcocystis* rūšių skaičiui ir yra laisvai prieinamos Genų banke. 18S rRNR geno sekų sulyginimas sėkmingai panaudotas daugelyje *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinių tyrimų (Barta ir kt., 1991; Tenter ir kt., 1992; Ellis ir kt., 1994; Tenter ir kt., 1995; Jeffries ir kt., 1997; Tenter, Johnson, 1997; Johnson ir kt., 1998; Votýpka ir kt., 1998; Doležel ir kt., 1999; Holmdahl ir kt., 1999; Jenkins ir kt., 1999; Šlapeta ir kt., 2001; 2002a; Elsheikha ir kt., 2005; Dahlgren ir kt., 2008; Dahlgren, Gjerde, 2008; 2009; 2010a;).

Teigiama, kad tiriant Sarcocystidae šeimos rūšių filogenetinius ryšius, filogenetiniai medžiai, gauti sulyginus 28S rRNR geno sekas, yra patikimesi už filogenetinius medžius, gautus iš 18S rRNR geno sekų informacijos (Mugridge ir kt., 1999). Didelis informacijos kiekis duomenų masyve padeda išvengti atsitiktinių klaidų ir todėl galima suformuoti statistiškai patikimesnes išvadas. Lyginat Sarcocystidae šeimos atstovus, 28S rRNR genas pasižymi didesniu variabilumu, negu 18S rRNR genas. Taip pat nustatyta, kad filogenetinio medžio, suformuoto naudojant tik 28S rRNR geno D2 ir D3 domenus, šakų

grupavimasis atitinka filogenetinio medžio, sukonstruoto iš viso 28S rRNR geno sekų, topologiją (Mugridge ir kt., 2000). Analizuojant labiau informatyvų geną galima patikimiau atskleisti filogenetinius ryšius, tačiau 28S rRNR geno panaudojimą apriboja mažesnis *Sarcocystis* rūšių duomenų rinkinys, esantis Genų banke, lyginant su 18S rRNR genu.

Nustatant sarkosporidijų filogenetinius ryšius kai kuriais atvejais vieno geno skiriamosios raiškos nepakanka. Dėl minėtos priežasties, kai sulyginant sekas dirbtinai suliejami 28S rRNR geno fragmentai, talpinantys variabiliausius šio geno D2 ir D3 domenus su 18S rRNR geno fragmentais, kartais taikoma kompleksinė 18S rRNR ir 28S rRNR genų fragmentų analizė (Šlapeta ir kt., 2003).

2.8.2. *Sarcocystis* genties monofilijos klausimas

Frenkelia genčiai, kuri kartu su *Sarcocystis* gentimi jungiama į Sarcocystinae pošeimį, priklauso dvi rūšys: *F. microti* Henry, 1932 ir *F. glareoli* Erhardová, 1955. *Frenkelia* rūšių merogonija vyksta kepenų ląstelėse – hepatocituose. Jų cistos aptinkamos centrinėje nervų sistemoje. *F. glareoli* formuoja rutulio formos cistas *Clethrionomys* genties pelėnuose, o *F. microti* skiltelės formos cistos randamos keliose skirtingose graužikų rūšyse, o dažniausiai aptinkamos pilkajame pelėne (*Microtus arvalis*). *Frenkelia* parazitų galutiniai šeimininkai – suopių genties (*Buteo*) plėšrieji paukščiai. (Rommel ir kt., 1977; Göbel ir kt. 1978; Upton, McKown, 1992) *F. glareoli* transmisija tarpiniame šeimininke gali būti ir vertikali, perduota iš motinos palikuoniui (Tadros, Laarman, 1978).

Filogenetiniuose Sarcocystidae šeimos medžiuose, suformuotuose iš 18S rRNR ar 28S rRNR genų sekų, abi *Frenkelia* rūšys grupuojasi su *Sarcocystis* rūšimis. 18S ir 28S rRNR genų analizė atskleidžia, kad *Sarcocystis* gentis yra parafiletinė grupė, jeigu *Frenkelia* gentis laikoma galiojančia. *Frenkelia* genties rūšis priskyrus *Sarcocystis* genčiai, *Sarcocystis* gentis taptų monofiletinė. Kai kurie autoriai mano, kad remiantis morfologiniais,

biologiniais, molekuliniais duomenimis, *Frenkelia* genties taksonominis rangas nėra teisingas ir šios genties neturėtų likti (Votýpka ir kt., 1998; Mugridge ir kt., 1999). Buvo pasiūlyta *F. glareoli* pavadinimą pakeisti į *S. glareoli*, *F. microti* pervadinti į *S. microti*, o *S. microti* pasiūlytas naujas *S. jaypeedubeyi* vardas (Modrý ir kt., 2004). *Frenkelia* genties taksonominio statuso klausimas išlieka diskusijų objektu, ginčijamasi, ar *Frenkelia* genties išskyrimas yra teisingas, kokias savybes vertinti kaip *Sarcocystis* genties taksonominius požymius. Nepaisant to, kad molekuliniai rezultatai paremia *Frenkelia* ir *Sarcocystis* genčių sinonimiškumą, kol kas literatūroje dažniausiai paliekami *F. microti* ir *F. glareoli* vardai. Šiame darbe taip pat naudojami minėtieji ir šiuo metu galiojantys *Frenkelia* genties rūšių pavadinimai.

2.8.3. *Sarcocystis* rūšių filogenetinių ryšių dėsningumai

Tiriant *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinius ryšius, filogenetinių medžių topologija, gauta analizuojant 18S rRNR genų sekas, atitinka topologiją, gautą analizuojant 28S rRNR genų sekas (Mugridge ir kt., 2000).

Įvairiuose Sarcocystinae pošeimio filogenetiniuose tyrimuose dažniausiai išskiriamos trys pagrindinės filogenetinės grupės (Doležel ir kt., 1999; Šlapeta ir kt., 2001; 2002a; 2003; Morrison ir kt., 2004; Elsheikha ir kt. 2005; Dahlgren ir kt. 2008). Nėra vieningos sistemos, suteikiant šioms grupėms tam tikrus vardus ar jas išrikiojant. Viename klasteryje apjungiamos *Sarcocystis* rūšys, kurių tarpiniai šeimininkai – porakanopiai žinduoliai (*S. aucheniae* Brumpt, 1913, *S. cruzi*, *S. arieticanis*, *S. tenella*, *S. capracanis*, *S. miescheriana*, *S. sinensis*, *S. hominis*, *S. gigantea*, *S. moulei*, *S. fusiformis* (Railliet, 1897) Bernard, Bauche, 1912, *S. buffalonis* Huong, Dubey, Nikkilä, Uggla, 1997, *S. hirsuta*, *S. alces* Dahlgren, Gjerde, 2008, *S. gracilis* Rátz, 1909, *S. tarandivulpes*, *S. grueneri*, *S. hjorti*, *S. rangi* Gjerde, 1984, *S. rangiferi* *S. alceslatrans* Dubey, 1980, *S. scandinavica* Dahlgren, Gjerde, 2008, *S. tarandi*, *S. oviformis*, *S. ovalis*, *S. hardangeri*); kitame, kurių tarpiniai

šeimininkai graužikai, o galutiniai šeimininkai – ropliai (*S. atheridis* Šlapeta, Modrý, Koudela, 1999, *S. singaporensis* Zaman, Colley, 1976, *S. zamani* Beavei, Maleckar, 1981); dar kitame – įvairiu gyvenimo ciklu pasižyminčios sarkosporidijų rūšys (*S. calchasi*, *S. columbae*, *S. falcatula*, *S. rileyi*, *S. neurona*, *S. mucosa* (Blanchard, 1885) Labbé, 1899, *S. lacertae* Babudieri, 1932, *S. gallotiae*, *S. dispersa* Černá, Sénaud, 1977, *S. muris*, *S. rodentifelis*) bei abi *Frenkelia* rūšys. Teigiama, kad pirmų dvejų grupių filogenetiniai ryšiai labiau priklauso nuo gyvybinio ciklo galutinių šeimininkų negu nuo tarpinių šeimininkų (Doležel ir kt., 1999; Holmdahl ir kt. 1999; Šlapeta ir kt., 2001; 2003; Morrison ir kt., 2004; Elsheikha ir kt., 2005). Filogenetinę grupę, kurią sudaro porakanopiuose sarkocistas formuojančios *Sarcocystis* rūšys, galima išskirti į tris pogrupius: pirmojo pogrupio galutiniai šeimininkai yra tik šuninių šeimos plėšrūnai; antrojo – tik katinių šeimos plėšrūnai; o trečiąjį sudaro trys *Sarcocystis* rūšys. Neseniai nustatyta, kad vienos iš jų, *S. ovalis* galutinis šeimininkas – paukštis (Dahlgren, Gjerde, 2009; Gjerde, Dahlgren, 2010). Reikia pabrėžti, jog kelių šios filogenetinės grupės rūšių, galutinis šeimininkas kol kas nėra žinomas.

2.9. *Sarcocystis* parazitai medžiojamuosiuose žvėryse

2.9.1. Tyrimai Lietuvoje

Lietuvoje medžiojamuosiuose žvėryse sarkocistos buvo aptiktos šernų, stirnų, taurių elnių, dėmėtų elnių, briedžių ir pilkųjų kiškių (*Lepus europaeus*) raumenyse.

Šernuose Lietuvoje identifikuotos dvi sarkosporidijų rūšys: *S. miescheriana* ir *S. sui hominis*. Šias rūšis platina skirtingi šeimininkai, *S. miescheriana* – šuninių šeimos plėšrūnai, o *S. sui hominis* – žmogus. Lietuvos mokslininkai pirmą kartą nustatė, kad usūrinis šuo (*Nyctereutes procyonoides*) gali tarnauti *S. miescheriana* galutiniu šeimininku. Po sušėrimo *S.*

miescheriana sarkocistomis užkręsta šerniena, usūrinio šuns fekalijose rastos sporocitos, kurias plėšrūnas išskyrinėjo 9 dienas (Grikienienė, Senutaitė, 1995). Pažymėtina, jog plonasienės *S. sui hominis* sarkocistos aptinkamos žymiai rečiau, lyginant su storasienėmis *S. miescheriana* sarkocistomis. Iš 115 analizuotų šernų, 110 buvo užsikrėtę sarkocistomis, iš kurių tik 8,3 % priklauso *S. sui hominis* rūšiai (Grikienienė, Senutaitė, 1995). Kitais atvejais, ištyrus 36 ir 55 šernus, *S. sui hominis* sarkocistos visai nebuvo identifikuotos (Kutkienė, Baleišis, 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002). Lietuvoje sumedžiotuose šernuose infekcijos ekstensyvumas daugeliu atvejų buvo aukštas, jis svyravo nuo 84,2% iki 97,2% (Grikienienė, Senutaitė, 1995; Grikienienė ir kt., 2001; Kutkienė, Baleišis, 2001; Malakauskas ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002), tačiau Arnastrauskienės (1989) duomenimis, sarkosporidijos rastos tik 49,4 % šernų.

Sarcocystis parazitų cistas stirnose pirmą kartą Lietuvoje aptiko Arnastrauskienė ir Kazlauskas (1984), tačiau rūšinė sarkosporidijų sudėtis nebuvo nagrinėta. Lietuvoje sumedžiotose stirnose identifikuotos trys *Sarcocystis* rūšys: *S. capreolicanis* Erber, Boch, Barth, 1978, *S. gracilis*, *S. cf. hofmanni* (Grikienienė ir kt., 2001; Kutkienė, Baleišis, 2001). Naudojant natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos analizę, stebimi aiškūs morfologiniai šių rūšių skirtumai. Nepastebėti jokie esminiai morfologiniai skirtumai tarp *S. cf. hofmanni* sarkocistų ir *S. hofmanni*, aprašytos barsukų raumenyse Vokietijoje (Odening, 1994a). Kutkienė (2001) išskyrė dar vieną morfologinį sarkocistų tipą stirnose, kuris buvo labai panašus į *S. gracilis*. Lietuvoje stirnose nustatytas labai aukštas sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas, svyruojantis nuo 77,7% (14 užsikrėtusių individų iš 18 tirtųjų) iki 94,2% (147 užsikrėtusių individų iš 156 tirtųjų) (Grikienienė, Kutkienė, 1999; Grikienienė ir kt., 2001). Didžiausiais infekcijos ekstensyvumas nustatytas, ištyrus didžiausią individų skaičių. Lietuvoje, tiriant medžiojamuosius žvėris, gausiausia *Sarcocystis* parazitų infekcija užfiksuota daugiau kaip trijų metų amžiaus Panevėžio rajone sumedžiotos stirnos patelėje, kurios 28 diafragmos raumenų iškarpose rasta 400 sarkocistų (Malakauskas,

Grikienienė, 2002). Kai kurių stirnų vienoje diafragmos iškarpoje rasta net iki 40 sarkocistų (Grikienienė ir kt., 2001).

Lietuvoje pirmi pranešimai apie tauriųjų elnių sarkosporidijų tyrimus, spaudoje pasirodė tik prieš dvylika metų. Išanalizavus tauriųjų elnių įvairių raumenų grupes, sarkocistos surastos 20 iš 27 individų (74,0%) (Grikienienė, Kutkienė, 1999). Tauriuosiuose elniuose aptiktos trys sarkosporidijų rūšys: *S. cf. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni*, *Sarcocystis* sp. (Kutkienė, 2003). Tauriųjų elnių raumenyse aptiktos *S. cf. capreolicanis* ir *S. cf. hofmanni* rūšys morfologiškai buvo identiškos *S. capreolicanis* ir *S. cf. hofmanni* rūšims parazituojančioms stirnoje. Kutkienė (2003) mano, jog *Sarcocystis* sp. parazituojančios tauriuosiuose elniuose sarkocistos sienelės struktūra buvo panaši į *S. grueneri*, aprašytą šiauriniuose elniuose. Lietuvos teritorijoje sumedžiotuose tauriuosiuose elniuose didžiausias fiksuotas sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas siekė 84,2% (32 užsikrėtusių individų iš 38 tirtųjų) (Grikienienė ir kt., 2001).

Dėl sarkosporidiozės, Lietuvoje dėmėtuosiuos elnius tyrė Malakauskas ir Grikienienė (2002). Išanalizavus Kauno rajone 41 nelaisvėje gyvenančio dėmėtojo elnio diafragmos, stemplės ir širdies raumenis, 38 individuose aptiktos sarkocistos (92,7%). Vidutinis infekcijos intensyvumas skirtinguose raumenų grupėse svyravo: diafragmoje sudarė 16 cistų, stemplėje – 27, širdyje – 41, o daugiausiai buvo aptiktos 49 sarkocistos. Deja, kokios *Sarcocystis* rūšys parazituoja dėmėtuosiuose elniuose nebuvo tirta.

Arnastrauskienė ir Kazlauskas (1984) Lietuvoje sumedžiotuose briedžiuose pirmą kartą aptiko sarkosporidijas, bet jų rūšinė sudėtis nebuvo nustatyta. Lietuvoje, ištyrus daugiau kaip 50 briedžių, *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas sudarė 83%, o infekcijos intensyvumas svyravo nuo 1 iki 27 sarkocistų 28 raumens pjūviuose (Malakauskas, Grikienienė, 2002). Lietuvoje briedžiuose aptiktos sarkocistos priskirtos *S. alceslatrans* rūšiai, o kitos sarkocistos neapibūdintos iki rūšies (Grikienienė ir kt., 2001). *Sarcocystis* sp. iš briedžio sarkocistos sienelės struktūra buvo panaši į Dubey

(1980) atrastos sarkosporidijos cistos struktūrą, tačiau sienelės storis skyrėsi (Kutkienė, 2002).

Lietuvos medžiojamųjų porakanopių tyrimuose, imčiai viršijus 100 vienetų, *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas varijavo nuo 80% iki 90%. Lyginant šernus, stirnas, elnius bei briedžius, kol kas nebuvo nustatyta statistiškai patikimų sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumo skirtumų. Mažiausiai sarkocistų aptinkama tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose, o gausiausiai apsikrečia stirnos. Nustatytas patikimai didesnis ($p < 0,05$) vidutinis infekcijos intensyvumas stemplės ir širdies raumenyse palyginus su diafragma. Kai gyvūnai buvo skirstyti į dvi amžiaus grupes, jaunesni ar vyresni negu trijų metų amžiaus, paaiškėjo, jog sarkocistų infekcijos intensyvumas stirnos ir briedžio diafragmos raumenyse priklauso nuo šeimininko amžiaus (Malakauskas, Grikienienė, 2002). Briedžiuose, elniuose ir stirnose aprašyti mišrios infekcijos atvejai, kai viename gyvūne gali parazituoti nuo dvejų iki keturių *Sarcocystis* rūšių (Kutkienė 2001; 2002; 2003).

Lietuvoje sarkocistos rastos 7,3% tirtų pilkųjų kiškių (Arnašauskienė, Kazlauskas, 1984). Vėliau Kutkienė ir Baleišis (2001) ištyrė 15 kiškių, tačiau *Sarcocystis* parazitų neaptiko. Per 1987-2000 metus Grikienienė ir kt. (2001) ištyrė septynioms rūšims priklausančius 65 plėšriuosius medžiojamosios faunos žvėris: pilkuosius vilkus, rudąsias lapes, usūrinius šunis, miškines kiaunes (*Martes martes*), akmenines kiaunes (*Martes foina*), žebenškštis (*Mustela nivalis*), juoduosius šeškus (*Mustela putorius*), tačiau sarkocistų nerado. Kito tyrimo metu, vienuolika rudųjų lapių ir keturi usūriniai šunys taip pat nebuvo užsikrėtę sarkocistomis (Kutkienė, Baleišis, 2001).

2.9.2. Tyrimai Pasulyje

Stambiojoje medžiojamojoje faunoje *Sarcocystis* parazitai labiausiai tyrinėti elninių šeimoje (Cervidae) ir šernuose. Tiriamuosiuose medžiojamuosiuose porakanopiuose *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas dažniausiai viršija 80% ar net 90% (Partenheimer-Hannemann,

1991; Spickschen, Pohlmeier, 2002; Goldová, 2008; Hvizdošová, Goldová, 2009). Ekstensyvi *Sarcocystis* parazitų infekcija šernuose užfiksuota Vokietijoje ir Slovakijoje (atitinkamai 97%, 87%) (Erber, 1978; Hvizdošová, Goldová, 2009). Žymiai mažesnis šernų užsikrėtimas sarkocistomis nustatytas Vengrijoje 48% (12/25), Kazachijoje 31% (34/108), Naujoje Zelandijoje 28% (7/25) (Kavai, Sugar, 1976; Esimov, 1990; Collins ir kt., 1980). Europoje ir Šiaurės Amerikoje stirnose, briedžiuose, tauriosiuose elniuose, šiauriniuose elniuose, juodauodegiuose elniuose (*Odocoileus hermionus*) dažniausiai nustatomas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas, viršijantis 80% (Mahrt, Colwell, 1980; Entzeroth 1982; Dubey, Speer, 1985; Lagerquist, Foreyt, 1993; Dahlgren, Gjerde, 2007). Kartais fiksuojamas 100% infekcijos ekstensyvumas. Pavyzdžiui Norvegijoje, išanalizavus 37 tauriųjų elnių širdies, stemplės ir diafragmos raumenis, visuose individuose aptiktos sarkocistos (Dahlgren, Gjerde, 2010a). JAV, Floridoje baltauodegiame elnyje nustatytas tik 69% (108/150) sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas, tačiau verta paminėti, jog tirti tik liežuvių raumenys (Atkinson ir kt., 1993).

Kaip minėta anksčiau, dėl naudojamų skirtingų metodų įvairių šalių tyrėjų gauti sarkosporidijų infekcijos intensyvumo duomenys yra sunkiai sulyginami, tačiau pastebimi ir tam tikri dėsningumai. Tiriant *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumą stambiojoje medžiojamojoje faunoje, priklausomybė nuo šeimininko lyties dažniausiai nenustatoma. Lyginant su senesniais gyvūnais, jaunesniuose nei vienerių metų medžiojamų porakanopių individuose paprastai fiksuojamas mažesnis *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumas (Erber, 1978; Enteroth, 1982).

Šernuose aptinkamos dvi sarkosporidijų rūšys: *S. miescheriana* ir *S. sui hominis*, pirmoji pernešama per šuninių šeimos plėšrūnus, o antrosios galutinis šeimininkas – žmogus. *S. sui hominis* aptinkama retai ir jos paplitimas šernuose neviršija 10% (Esimov, 1990; Griekienienė, Senutaitė, 1995).

Elniniuose aptinkamos 26 sarkosporidijų rūšys. *S. sibirica* Matchulski, 1947 laikoma *S. gracilis* rūšies sinonimu, o *S. cervi* Destombes, 1957 ir *S. capreoli* Levchenko, 1963 traktuojamos kaip *species inquirendae* (abejotino

identiteto rūšys, reikalingi tolimesni tyrimai) (Odening, 1989). *S. capreoli* rūšis nepakankamai aprašyta ir negali būti atpažįstama, manoma, jog ji yra *S. capreolicanis* sinonimas tačiau tai neįrodyta (Sedlacek, Wesemeier, 1995). *Sarcocystis* rūšių parazituojančių elniniuose identifikacija ir taksonomija komplikuota. Morfologiškai neatskiriamos ar panašios *Sarcocystis* rūšys randamos skirtinguose elninių šeimos rūšyse. Iš elninių šeimos rūšių, šiauriniuose elniuose parazituoja daugiausia *Sarcocystis* rūšių (šešios). Jos buvo anksčiausiai charakterizuotos tiek morfologiškai, tiek genetiškai, be to trims rūšims – *S. grueneri*, *S. tarandi*, *S. tarandivulpes*, nustatyti galutiniai šeimnininkai – šuninių šeimos plėšrūnai (Dahlgren, Gjerde, 2007).

Apžvelgus literatūrinius duomenis ir remiantis šiauriniuose elniuose aptinkamomis *Sarcocystis* rūšimis, morfologiškai neatskiriamos ar panašios *Sarcocystis* rūšys, randamos skirtinguose elninių šeimos rūšyse, suskirstytos į šešis dirbtinius tipus (2 lentelė). Klasifikuojant *Sarcocystis* rūšis, labiausiai atsižvelgta į Dahlgren ir Gjerde darbus bei požiūrį. Verta pažymėti, jog mokslininkai skirtingai vertina ir interpretuoja sarkocistų išskirtų iš elninių morfologinius duomenis. Sudėtinga, o kartais beveik neįmanoma korektiškai palyginti elniniuose aprašytų *Sarcocystis* spp. morfologiją, nes naudojama skirtinga tyrimo metodika (šviesinė mikroskopija, transmisinė elektroninė mikroskopija, skenuojanti elektroninė mikroskopija). Dėl minėtų priežasčių, identifikuojant *Sarcocystis* rūšis, būtina atlikti molekulinis tyrimus ar kryžminius užkrėtimo eksperimentus (Wesemeier, Sedlacek 1995a). Kadangi kryžminiai užkrėtimo eksperimentai yra brangūs ir sunkiai atliekami, sprendžiant pastarąjį klausimą buvo pasiūlyta naudoti 18S rRNR geno analizę (Odening, 1997).

2 lentelė. Morfologiškai panašios sarkosporidijų rūšys, randamos elninių (Cervidae) šeimoje.

1 tipas	2 tipas	3 tipas	4 tipas	5 tipas	6 tipas
<i>S. grueneri</i> (šiaurinis elnias)	<i>S. rangi</i> (šiaurinis elnias)	<i>S. tarandivulpes</i> (šiaurinis elnias)	<i>S. tarandi</i> (šiaurinis elnias, taurusis elnias)	<i>S. rangiferi</i> (šiaurinis elnias, taurusis elnias)	<i>S. hardangeri</i> (šiaurinis elnias, taurusis elnias)
<i>S. sp.</i> (stirna)	<i>S. alceslatrans</i> (briedis)	<i>S. alces</i> (briedis)	<i>S. hemioni</i> (juodauodegis elnias)	<i>S. americana</i> (juodauodegis elnias)	<i>S. ovalis</i> (briedis, taurusis elnias)
<i>S. sp.</i> (danielius)	<i>S. capreolicanis</i> (stirna)	<i>S. gracilis</i> (stirna)	<i>S. youngi</i> (juodauodegis elnias)	<i>S. jorrini</i> (danielius)	<i>S. oviformis</i> (stirna)
<i>S. cervicanis</i> (taurusis elnias)	<i>S. cf. capreolicanis</i> (danielius)	<i>S. hemionilatrantis</i> (juodauodegis elnias)	<i>S. cf. hofmanni</i> (stirna)	<i>S. sp.</i> (baltauodegis elnias)	
<i>S. wapiti</i> (elnias vapitis)	<i>S. cf. capreolicanis</i> (Indinis zambaras)	<i>S. odocoileocanis</i> (baltauodegis elnias)	<i>S. cf. hofmanni</i> (danielius)	<i>S. sp.</i> (dėmėtasis elnias)	
<i>S. sp.</i> (briedis)	<i>S. cf. capreolicanis</i> (taurusis elnias)		<i>S. cf. hofmanni</i> (Indinis zambaras)	<i>S. cf. hofmanni</i> (stirna)	
<i>S. sp.</i> (dėmėtasis elnias)	<i>S. hjorti</i> (taurusis elnias, briedis)		<i>S. cf. hofmanni</i> (baltasnukis elnias)	<i>S. cf. hofmanni</i> (danielius)	
	<i>S. sybillensis</i> (elnias vapitis)		<i>S. odoi</i> (baltauodegis elnias)	<i>S. cf. hofmanni</i> (Indinis zambaras)	
	<i>S. sp.</i> (baltauodegis elnias)		<i>S. scandinavica</i> (briedis)	<i>S. cf. hofmanni</i> (baltasnukis elnias)	
	<i>S. sp.</i> (dėmėtasis elnias)		<i>S. sp.</i> (dėmėtasis elnias)		

Lentelėje morfologiškai panašios *Sarcocystis* rūšys apjungiamos į šešis tipus. Skliausteliuose nurodomi *Sarcocystis* parazitų tarpinių šeiminių rūšys.

2.10. *Sarcocystis* parazitai medžiojamuosiuose paukščiuose

2.10.1. Tyrimai Lietuvoje

Lietuvoje pirmi paukščių sarkosporidijų tyrimai pradėti 1986 metais. Per 12 metų Lietuvoje ir pietinėje Kuršių Nerijoje (Kaliningrado sritis, Rusija) sarkocistų ieškota 375 laukinių paukščių (priklausančių 5 būriams: Passeriformes, Piciformes, Charadriiformes, Columbiformes, Strigiformes) ir 97 naminių paukščių (76 vištos ir 21 kalakutas) krūtinės, sparno, kojos ar kaklo raumenyse (Grikienienė, Iezhova, 1998). Autoriai nurodo, jog *Sarcocystis* spp. cistos aptiktos trijuose žvirbliniuose paukščiuose ir vieno trijų metų gaidžio raumenyse, o aptiktos sarkocistos morfologiškai buvo panašios į *S. horvathi* rūšį.

Vėliau, intensyviausiai tyrinėti medžiojamajai faunai priskiriami žąsinių būrio (Anseriformes) paukščiai. 1997-1998 metais Pamaro krašte, iš 25 analizuotų žąsinių paukščių, sarkocistos aptiktos 5 baltakaktėse žąsyse, 4 didžiosiose antyse (*Anas platyrhynchos*) ir vienoje urvinėje antyje (*Tadorna tadorna*) (Kutkienė ir kt., 1998). Platesnio tyrimo metu žąsiniuose paukščiuose užfiksuotas 29,2% (iš 342 ištirtų, 100 užsikrėtusių) *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas (Kutkienė, Sruoga, 2004). Didžiausias ekstensyvumas nustatytas baltakaktėje žąsyje (65,8%), o didžiausias intensyvumas registruotas baltakaktėje žąsyje ir ledinėje antyje (*Clangula hyemalis*), atitinkamai 66 ir 53 cistos 28 raumens pjūviuose. Paukščių raumenyse rastos mikroskopinės ir makroskopinės cistos. Makrocistos aptiktos tik vienos didžiosios anties kaklo raumenyse ir remiantis morfologiniais bruožais priskirtos *S. rileyi* rūšiai. Naudojant šviesinę mikroskopiją buvo išskirti 4 mikrocistų tipai (I, II, III, IV), kurie, autorių nuomone, reprezentuoja mažiausiai 4 skirtingas *Sarcocystis* rūšis, tačiau dėl išsamesnių tyrimų stokos, rūšies pavadinimai šioms sarkosporidijoms nebuvo suteikti. Vėliau atlikti detalesni morfologiniai tyrimai ir transmisiniu elektroniniu mikroskopu nustatytos trijų *Sarcocystis* spp. (*Sarcocystis* sp. iš klykuolės (*Bucephala clangula*) (I cistos tipas), *Sarcocystis* sp. iš didžiosios anties (II cistos tipas), *Sarcocystis* sp. iš baltakaktės žąsies (III cistos tipas) cistų sienelių ultrastruktūros (Kutkienė ir kt., 2006; Kutkienė ir kt., 2008). Atlikus užkrėtimo eksperimentus išsiaiškinta, jog *Sarcocystis* sp. iš baltakaktės žąsies (III cistos

tipas) vienu iš galimų galutinių šeimininkų yra poliarinė lapė (*Alopex lagopus*) (Kutkienė ir kt., 2006).

2.10.2. Tyrimai žąsiniuose paukščiuose

Antyse sarkociatas pirmą kartą atrado C. V. Riley 1869 metais. Stiles 1893 ryžio formos, spalvos ir dydžio makrocistas šaukštasnapėje antyje (*Anas clypeata*) pavadino *S. rileyi* (cit. pagal Dubey ir kt., 2003a). Kol kas tai buvo vienintelė pavadinimą turinti bei išsamiausiai ištirta sarkosporidijų rūšis žąsiniuose paukščiuose. Tuo pačiu metu Kanadoje ir JAV nustatyta, jog *S. rileyi* galutiniu šeimininku tarnauja dryžuotasis skunksas (Cawthorn ir kt., 1981, Wicht, 1981). *S. rileyi* pasižymi unikalia žiedinio kopūsto formos cistos sienelės ultrastruktūra (Cawthorn ir kt., 1981; Dubey ir kt., 2003a). Naudojant elektroninę mikroskopiją patvirtinta, jog kitas natūralus *S. rileyi* tarpinis šeimininkas be šaukštasnapės anties, yra didžioji antis (Dubey ir kt., 2010). Šiaurės Amerikoje makroskopinės sarkocistos rastos antyse, žąsyse ir kai kuriuose kituose vandens paukščiuose (Gower, 1938; Erikon, 1940; Wickware, 1944; Clark, 1958; Cornwell, 1963; Chabreck ir kt., 1965; Hoppe, 1976; Wobeser, Cawthorn, 1982; Costanzo, 1990; Moorman ir kt., 1991; Fedynich, Pense, 1992). Sumedžiota paukščių mėsa užkrėsta sarkosporidijų makrocistomis yra netinkama naudoti maistui (Chabreck ir kt., 1965). Šiaurės Amerikos antyse registruotas neaukštas užsikrėtimo ekstensyvumas makroskopinėmis sarkocistomis. Kanadoje 30 paukščių iš 524 (5,7%) buvo užsikrėtę sarkosporidijų makro- ar mikrocistomis (Drouin, Mahrt, 1979). Luizianoje, JAV, skaitlingiausio individų skaičiumi tyrimo metu, makrocistos rastos 365 iš 1513 (24,1%) apžiūrėtų paukščių (Chabreck ir kt., 1965). Šiaurės Dakotoje, JAV, išanalizavus 15 ančių rūšių, užfiksuotas 4,5% (59/1312) infekcijos ekstensyvumas sarkosporidijų makrocistomis (Hoppe, 1976). Kitų tyrimų JAV duomenimis, tamsiojoje antyje (*Anas rubripes*) nustatytas 16,2% (40/311), didžiojoje antyje 3,5% (8/231) infekcijos ekstensyvumas (Costanzo,

1990; Fedynich, Pense, 1992). Pažymėtina, jog visais atvejais jaunikliai buvo statistiškai patikimai ($p < 0,05$) rečiau užsikrėtę šiuo parazitais. Didžiausiais 78,3% (36/46) užsikrėtimo ekstensyvumas registruotas šaukštasnapės anties suaugėliuose (Chabreck ir kt., 1965). Europoje makroskopinės sarkocistos lyginant su Šiaurės Amerika, aptiktos labai retai. Lenkijoje ir Lietuvoje ištyrus 148 ir 112 didžiųjų ančių, atitinkamai, aptikta tik po vieną individą, užsikrėtusį *S. rileyi* primenančiomis sarkocistomis (Kalisińska ir kt., 2003; Kutkienė, Sruoga, 2004). Makroskopinės sarkocistos didžiosiojoje antyje ir jos domestikuotose formose taip pat buvo rastos Bulgarijoje ir Vokietijoje (Kalyakin, Zasukhin, 1975). Visais atvejais Europoje didžiosiose antyse rastų makrocistų detali rūšinė priklausomybė nebuvo išaiškinta.

Mikroskopinės sarkocistos kol kas tyrinėtos menkai, apsiribojant ekstensyvumo ir šviesinės mikroskopijos morfologine analize. Šviesiniu mikroskopu pagal cistos sienelės morfometrines charakteristikas, sienelės storį ir išaugų ilgį bei atstumus tarp jų, Kanadoje antyse išskirti 5 sarkocistų tipai, o žąsyse 2 tipai (Drouin, Mahrt, 1980; Wobeser ir kt., 1981). Taip pat mikroskopinės *Sarcocystis* parazitų cistos rastos Bulgarijoje, Vokietijoje, Kazachstane (Kalyakin, Zasukhin, 1975; Pak, Eshtokina, 1984; Pinayeva ir kt., 1998). Visais atvejais tiek antyse, tiek žąsyse surastoms sarkosporidijų mikrocistoms specifiniai rūšių pavadinimai nebuvo suteikti.

2.10.3. Tyrimai laukiniuose karveliuose

Neįvardintos *Sarcocystis* rūšys laukiniuose karveliuose fiksuotos Šiaurės ir Pietų Amerikoje, Afrikoje, Europoje, Azijoje (Dylko, 1962; Barrows, Hayes, 1977; Conti, Forrester, 1981; Kaiser, Markus, 1983a; Pinayeva ir kt., 1998; Ecco ir kt., 2008). Pirmą kartą sarkocistos karvelinių šeimoje (Columbidae) registruotos Baltarusijoje neįvardintoje karvelių rūšyje (Dylko, 1962). Laukiniuose karveliuose užfiksuotas sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas nebuvo aukštas ir svyravo nuo 4,3% iki 12,5% (Barrows,

Hayes, 1977; Conti, Forrester, 1981; Kaiser, Markus, 1983a). JAV trys Viktorijos karūnuotieji karveliai (*Goura victoria*) žuvo dėl, kaip manoma, *S. falcatula* sukeltos infekcijos (Suedmeyer ir kt., 2001). Pietų Afrikoje, tiriant elektroniniu mikroskopu, *Sarcocystis* sp. nustatytos mažajame purplelyje (*Streptopelia senegalensis*) sarkocistos sienelė turėjo neaukštas išaugas su mikrovamzdelias (Kaiser, Markus, 1983b). Vėliau, Odening (1997) remdamasis anksčiau aprašyta morfologija, šią sarkosporidijų rūšį pavadino *S. kaiserae*. Neseniai Olias ir kt. (2010c) aprašė naują *Sarcocystis* rūšį, aptiktą karveliuose keršuliuose Vokietijoje ir pavadino *S. columbae*. Šia sarkosporidijų rūšimi buvo užsikrėtę visi penki tirtieji keršuliai. Nepaisant nežymių cistos dydžio skirtumų, tarp patogeninės anksčiau aprašytos *S. calchasi* (Olias ir kt., 2010b) iš naminio karvelio ir *S. columbae*, šios dvi rūšys gali būti atskirtos tik naudojant molekulinę analizę.

2.10.4. Tyrimai varniniuose ir kituose medžiojamuose paukščiuose

Sarkosporidijų cistos varniniuose paukščiuose atrastos beveik visuose kontinentuose. Didžiausias 40% infekcijos ekstensyvumas užfiksuotas vakarinėje Kanados dalyje. Iš 80 tirtų varninių paukščių 32 buvo užsikrėtę *Sarcocystis* spp., o dažniausiai 60,5% (23/38) sarkocistos aptiktos šarkoje (Drouin, Mahrt, 1979). Kazachstane, ištyrus šešias varninių šeimos rūšis, sarkocistos rastos 7,4% (34 užkrėstų iš 455 tirtų) atvejų (Pak, Eshtokina, 1984). Sarkosporidijos varniniuose paukščiuose taip pat registruotos Čekijoje, Baltarusijoje ir Australijoje (Dylko, 1962; Munday ir kt., 1979; Černá, 1984). Tiriant šviesiniu mikroskopu, sarkocistų išskirtų iš kovo (*Corvus frugilegus*) ir kėkšto (*Garrulus glandarius*), sienelė buvo plona ir lygi, o sarkocistos iš varnos (*Corvus cornix*) histologiniuose preparatuose pasižymėjo ruožuota arba lygia sienelės struktūra (Černá, 1984; Pak, Eshtokina, 1984). Specifinai rūšių pavadinimai nei vienu atveju nebuvo suteikti.

Iš kitų Lietuvos medžiojamajai faunai priskiriamų paukščių, neskaitant laukinių žąsų, ančių, karvelių ir varninių paukščių, rūšies pavadinimą turinčios sarkosporidijos rastos paprastuosiuose fazanuose (*Phasianus colchicus*). Fazanuose aprašyta *S. peckai* Odening, 1997 rūšis, kuri morfologiškai panaši į *S. wenzeli*, parazituojančią vištose (Odening, 1997). Čekijoje ištyrus 41 fazaną, penkiolikoje paukščių (36,5%) rasta sarkocistų, be to šviesiniu mikroskopu identifikuotas kitas morfolginis sarkocistos tipas besiskiriantis nuo *S. peckai* sarkocistų (Černá, 1984; Černá, Pecka, 1984).

Švedijoje ištyrus 87 kurtinius (*Tetrao urogallus*), 53 nustatytas *Sarcocystis* sp. sukeltas encefalitas (Gustafsson ir kt., 1997). Vėliau, detaliau ištyrus vieną kurtinį, sarkosporidijų merontai aptikti smegenyse, plaučiuose, širdyje, kepenyse, blužnyje (Dubey ir kt., 1998). Manoma, kad šio tyrimo metu aptikta patogeninė *Sarcocystis* sp. skiriasi nuo visų iki tol aprašytų, tačiau rūšies pavadinimas jai nesuteiktas.

3. Medžiaga ir metodai

Medžiagos surinkimas. Pagal Lietuvos Respublikos aplinkos ministro 2000 m. birželio 27 d. įsakymą Nr. 258 „Dėl Medžioklės Lietuvos Respublikos teritorijoje taisyklių patvirtinimo“ su vėlesniais pakeitimais (Žin., 2000, Nr. 53-1540; 2002, Nr. 97-4308; 2003, Nr. 9-318, Nr. 90-4088; 2004, Nr. 79-2814, Nr. 185-6868; 2005, Nr. 45-1477, Nr. 113-4137, Nr. 119-4309; 2006, Nr. 10-392, Nr. 60-2150, Nr. 130-4918; 2008, Nr. 42-1575; 2009, Nr. 3-63; 2010, Nr. 8-387; 2010, Nr. 110-5652), medžiojamieji gyvūnai – tai gyvūnai, kurie dėl visuomeniniais ir asmeniniais tikslais grindžiamos vertės bei susiklosčiusių tradicijų buvo medžiojami praeityje, yra šiuo metu medžiojami ar gali būti medžiojami ateityje.

Renkant medžiagą tyrimams buvo laikomasi ES ir Lietuvoje galiojančių teisės aktų. Leidimai surinkti biologinę medžiagą išduoti Lietuvos Respublikos Aplinkos Ministerijos (įsakymų numeriai – Nr. (11-1)-D8-2544, Nr. (11-1)-D8-2614). Visi tyrime panaudoti laukinių žinduolių raumenų pavyzdžiai gauti iš Panevėžio rajone įsikūrusios žvėrienos perdirbimo įmonės „Viltlit“. Dalis analizuotų paukščių audinių surinkta ekspedicijų metu bei bendradarbiaujant su medžiotojais. Pilkųjų žąsų, baltaskruosčių berniklių, smailiauodegių ančių, šaukštasnapių ančių, pilkųjų ančių, rudžių pavyzdžiai, taip pat dalis didžiųjų ančių, dryžgalvių kryklių, rudagalvių kryklių, cyplių medžiagos gauta iš Nacionalinio Maisto ir Veterinarijos Rizikos vertinimo Instituto, kuriame buvo vykdyta paukščių gripo diagnostikos programa analizuojant Lietuvoje kritusius vandens paukščius. Šiame darbe tirta 2005-2011 metais surinkta medžiaga, kuri saugoma Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto Molekulinės ekologijos laboratorijoje.

Ieškant *Sarcocystis* parazitų cistų, tirti stirnų, šernų, tauriųjų elnių ir briedžių diafragmos raumenys, taip pat paukščių kaklo, kojos ir krūtinės raumenys. Dažniausiai negautas viso paukščio lavonėlis, o tik kaklo arba kojos pavyzdžiai, todėl sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo vertinimas, priklausomai nuo raumenų grupės nebuvo atliekamas. Dėl daugeliu

atvejų detalios informacijos trūkumo apie pavyzdžius, tirti individai nebuvo skirstomi, nei pagal geografiją, nei pagal amžių ar lytį.

Analizuotos 22 paukščių rūšys: baltakaktė žąsis (*Anser albifrons*), pilkoji žąsis (*Anser anser*), želmeninė žąsis (*Anser fabalis*), baltaskruostė berniklė (*Branta leucopsis*), didžioji antis (*Anas platyrhynchos*), dryžgalvė kryklė (*Anas querquedula*), rudagalvė kryklė (*Anas crecca*), cyplė (*Anas penelope*), smailiauodegė antis (*Anas acuta*), šaukštasnapė antis (*Anas clypeata*), pilkoji antis (*Anas strepera*) kuoduotoji antis (*Aythya fuligula*), rudė (*Aythya nyroca*), klykuolė (*Bucephala clangula*), sidabrinis kiras (*Larus argentatus*), varna (*Corvus cornix*), kovas (*Corvus frugilegus*), kuosa (*Corvus monedula*), kranklys (*Corvus corax*), šarka (*Pica pica*), kėkštas (*Garrulus glandarius*), keršulis (*Columba palumbus*), iš viso 384 individai. Iš medžiojamųjų žinduolių tirti šernai (*Sus scrofa*), stirnos (*Capreolus capreolus*), taurieji elniai (*Cervus elaphus*), briedžiai (*Alces alces*), iš viso 177 individai (4 lentelė).

Mikroskopinė analizė. *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas analizuotuose gyvūnuose nustatytas naudojant kompresinį-mikroskopinį dažytų raumenų iškarpų metodą. Iš tiriamosios raumenų grupės išilgai raumenų skaidulų buvo iškerpami 28 avižos grūdo dydžio raumenų gabalėliai, sudedami ant sintetinio tinklelio ir 20-30 minučių perkeliama į mėlynojo metileno dažų vandeninį tirpalą (1 g metileno 500 ml vandens). Iš dažų ištrauktas tinklelis su pjūviais padėtas ant filtrinio popieriaus, tam, kad dažų perteklius būtų sugertas ir nuskaidrinimui 15-20 minučių pamerkiamas į 1,5% acto rūgšties tirpalą. Ištrauktas tinklelis vėl uždedamas ant filtrinio popieriaus, o paskui pjūviai patalpinami į stiklinį kompresorių. Stiklinį kompresorių sudaro dvi stiklo plokštelės, kurios suveržiamos varžtais ir raumenų išpjovos tiriamos šviesiniu mikroskopu. Ištyrus vieną pavyzdžio kompresorių, *Sarcocystis* parazitų infekcijos mastas vertintas naudojant Bogush (1976) pasiūlytą metodiką: 1-10 cistų – silpna infekcija; 11-40 cistų – vidutinė infekcija; daugiau kaip 40 cistų – intensyvi infekcija.

Sarkocistų morfologinės charakteristikos, morfologinis cistų tipas bei preliminari *Sarcocystis* rūšis buvo nustatoma šviesiniu mikroskopu (Nicon ECLIPSE 80i), remiantis morfometriniiais kriterijais – cistos sienelės storiu, išaugų forma ir ilgiu bei cistozoitų forma ir dydžiu. Taip pat *Sarcocystis* parazitai morfologiškai apibūdinti pagal cistos formą, ilgį ir plotį, tačiau diagnozuojant galimą sarkosporidijų rūšį, šie požymiai vertinti kaip pagalbiniai. Šviesinės ir elektroninės mikroskopijos bei DNR analizei naudotos tik subrendusios sarkocistos. Jeigu dažytuose preparatuose rastos *Sarcocystis* parazitų cistos, ruošiami antriniai raumenų preparatai, pamerkiant raumenų išpjovas 3-5 minutėms į fiziologinį tirpalą. Fiziologinio tirpalo prisisotinusios sarkocistos tampa tamsesnėmis ir natyviuose preparatuose yra geriau matomos, bei lengviau atskiriamomis nuo šeimininko miofibrilių. Pjūviai, kuriuose rastos sarkocistos, perkeliama ant objektyvinio stiklelio ir vėl tiriami mikroskopu. Dviejų preparavimo adatėlių pagalba dauguma aplink sarkocistas esančių raumeninių skaidulų, atsargiai atskiriamos nuo sarkocistos ir pašalinamos. Mažas raumens gabalėlis su išlindusia sarkocista, pridengiamas dengiamuoju stikleliu ir cistos morfologija vertinama prie 40× bei 100× mikroskopo padidinimų, naudojant vaizdo analizės sistemą INFINITY3. Šviesiniu mikroskopu nustatius sarkocistos morfologines savybes, cista išpreparuojama ir su nedideliu miofibrilių kiekiu perkeliama į 1,5 ml talpos mėgintuvėlį su 70% etilo alkoholio tirpalu ir laikoma šaldiklyje (-20°C) iki DNR išskyrimo.

Elektroninio mikroskopavimo analizei, raumeninio audinio pavyzdžiai su sarkocistomis fiksuoti Kornovskio tirpale, paskui fiksuoti osmio tetrokside, dehidratuoti ir įlieti į epoksidinių dervų mišinį. Labai ploni pjūviai nudažyti 2% uranil acetatu ir švino citratu bei tirti transmisiniu elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100B. Elektroninės mikroskopijos analizė atlikta Inovatyvios Medicinos Centro Eksperimentinės ir Klinikinės Medicinos Departamente.

Molekulinė analizė. Iš pradžių genomines *Sarcocystis* parazitų DNR išskyrimui iš sarkocistų cistozoitų naudotas univeralus DNR išskyrimo iš

įvairių audinių metodus (Aljanabi, Martinez, 1997). Keletas išpreparuotų sarkocistų buvo mechaniškai homogenizuojamos su stikline lazdele, pripylus 400 µl homogenizuojančio buferio (0,4 M NaCl, 10 mM Tris–HCl pH ir 8,0 mM EDTA pH 8,0). Vėliau pridėta 40 µl 20% SDS, 8 µl Proteinazės K, gerai išmaišyta ir mažiausiai valandą inkubuota termostate 60°C temperatūroje. Po inkubacijos, pridėta 300 µl prisotinto 6M NaCl tirpalo, kratyta 30 s ir centrifuguota 30 min. esant 10000 rpm (apsisukimai per minutę). Supernatantas perpiltas į kitą sterilų mėgintuvėlį, užpilta 750 µl izopropanolio, gerai išmaišyta ir valandą laikyta šaldiklyje. Po inkubacijos, DNR nusodinta centrifuguojant 20 min., esant 10000 rpm, perplauta 70% etilo alkoholio tirpalu, išdžiovinta ir ištirpinta 100 µl dejonizuoto vandens. Vėliau, siekiant užtikrinti didesnę išskiriamos DNR koncentraciją, DNR iš sarkocistų buvo išskiriama naudojant „Macherey-Nagel” firmos „NucleoSpin[®] tissue“ DNR išskyrimo iš audinių rinkinį, vadovaujantis gamintojo pateiktomis instrukcijomis ir rekomendacijomis.

Spektrofotometru buvo nustatomas DNR švarumas ir kiekis. Visais atvejais optinių tankių santykis 260nm/280nm svyravo 1,7-1,9 ribose, kas parodo DNR tirpalų švarumą. Vėliau genomine DNR atskiesta iki 0,04 µg.

Sarkosporidijų rūšys, išskirtos iš žinduolių, genetiškai charakterizuotos naudojant 18S rRNR geno sekų analizę. Kadangi paukščiuose cistas sudarančios *Sarcocystis* rūšys pasižymi tarpusavio nedideliais 18S rRNR geno sekų skirtumais, jų genetinei analizei taip pat naudotos 28S rRNR geno dalinės sekos ir ITS–1 regionas. Sulyginus duomenų bazėse esančias *Sarcocystis* rūšių 18S rRNR geno, 28S rRNR geno, Sarcocystidae šeimos 5.8S rRNR geno sekas, nustatyti konservatyvūs fragmentai. Naudojant Primer3 programą (Rozen, Skaletsky, 2000), sukurtos septynios pradmenų poros, komplementarios dalinėms konservatyvių fragmentų sekoms, kurios panaudotos darbe, pagausinant bei sekvenuojant 18S rRNR geną, ITS–1 regioną ir 28S rRNR geno fragmentą, talpinantį savyje labai variabilius ir informatyvius D2 ir D3 domenus (3 lentelė). Pradmenys buvo susintetinti „Biomers“ firmoje.

3 lentelė. Pradmenų poros skirtos 18S rRNR geno, 28S rRNR geno ir ITS–1 regiono padauginimui.

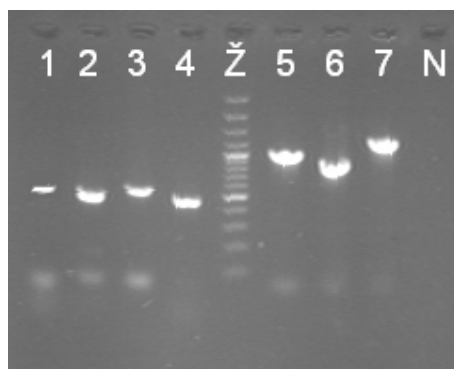
Nr	Pradmenų pora	Regionas	Kairinis pradmuo	Dešininis pradmuo	Pozicija
1	SarAF\SarAR	18S rRNR	ctggttgatcctgccagtag	ttccatcattccaactact	4-23\506-525 ^a
2	SarBF\SarBR	18S rRNR	gggaggtagtacaagaataacaa	ggcaaatgcttgcagtag	462-486\942-961 ^a
3	SarCF\SarCR	18S rRNR	tttaactgtcagaggtgaaattctt	cctgttattgctcaaactcc	899-923\1417-1438 ^a
4	SarDF\SarDR	18S rRNR	ttccgtaacgaacgagacc	gcaggttcacctacggaaa	1322-1341\1775-1793 ^a
5	KL-P1F\KL-P1R	28S rRNR	taccgctgaacttaagcat	cccaagtttgacgaacgatt	1-20\989-1008 ^b
6	KL-P2F\KL-P2R	28S rRNR	aaccgaccgctcttgaac	tgctactaccaccaagatctgc	722-740\1551-1572 ^b
7	P-ITSF\P-ITSR	18S rRNR/ ITS-1 /5.8S rRNR	attgagtggtccggtgaatta	gccatttgcgttcagaaatc	1581-1601\2070-2089 ^c

^a Pagal *Sarcocystis neurona* (Genų Banko nr. U07812); ^b Pagal *S. neurona* (Genų Banko nr. AF092927); ^c Pagal *Besnoitia besnoiti* (Genų Banko nr. FJ797432).

Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) atlikta galutiniame 25 µl tūryje, susidedančiam iš 1 x PGR buferio (turinčio 50 mM KCl), 0,2 mM dNTP, po 0,2 µM kiekvieno iš pradmenų, 1 vieneto (u) Taq polimerazės (MBI, Fermentas, Lietuva), 2,5 mM MgCl₂, 0,04 µg genominės DNR ir likusio kiekio vandens. Amplifikacija atlikta pradėdant pirmu „karšto starto“ denatūracijos žingsniu 5 min. 94°C temperatūroje, toliau reakcija vykdyta 5 amplifikacijos ciklus: 45 s. – 94°C, 60 s. – 64°C, 70 s. – 72°C, toliau reakcija tęsta 30 amplifikacijos ciklą 45 s. – 94°C, 60 s. – 58°C, 70 s. – 72°C, reakcija baigiama galutiniu prailginimo žingsniu 10 min. – 72°C. Kiekvienos reakcijos metu naudotos dvi neigiamos kontrolės – PGR mišinys su iš šeimininko audinio išskirta DNR ir PGR mišinys be DNR.

Pagausintų DNR fragmentų analizei naudota elektroforezės agarozės gelyje metodika. Elektroforezė atlikta horizontaliame 1,7% agarozės gelyje,

turinčiame 1µg/ml etidžio bromido (3 pav.). Siekiant nustatyti analizuojamų fragmentų ilgį, į vieną šulinėlį įpiltas DNR fragmentų dydžio žymuo GeneRuler™ 100 bp (MBI, Fermentas, Lietuva). Elektroforezė vykdyta 40 min. per į TAE buferį panardintą gelį, leidžiant 100 V įtampos elektros srovę. Gelis vizualizuotas UV šviesoje, naudojant kompiuterizuotą analizės sistemą. Visais atvejais šulinėliuose su neigiamos kontrolės pavyzdžiais, DNR fragmentai UV šviesoje nebuvo matomi.



3 pav. Elektroforezės agarozės gelyje, naudojant septynias pradmenų poras, pavyzdys. Šulinėliuose *Sarcocystis rileyi* padauginti DNR fragmentai, numeriai atitinka 3 lentelės pradmenų porų numerius. Ž – DNR fragmentų dydžio žymuo (GeneRuler™ 100 bp, MBI, Fermentas, Lietuva), N – neigiama kontrolė.

Sėkmingai padauginti PGR produktai, ruošiant sekvenavimo reakcijoms, buvo gryninami naudojant egzonukleazių rinkinį. 5µl PGR mišinys, kuriame amplifikuotas dominantis fragmentas buvo sumaišytas su 10 u koncentracijos egzonukleaze I (0,5µl) ir 1 u koncentracijos CIAP egzonukleaze (1µl) arba FastAP egzonukleaze (1µl) (MBI, Fermentas, Lietuva). Reakcija vykdyta 15 min. 37°C ir 15 min. 85°C temperatūroje. Sekoskaita atlikta Biotechnologijos Instituto Sekvenavimo centre automatinio sekvenatoriaus ABI Prism 377 pagalba, sekvenavimui naudojant tuos pačius pradmenis kaip ir pagausinant DNR fragmentus. Kiekvieno analizuoto fragmento pirminė DNR seka nustatyta su kairiniu ir dešiniu pradmenimis.

Statistinė analizė. *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo rodikliai tirtuose medžiojamuosiuose gyvūnuose apskaičiuoti naudojant Quantitative Parasitology 3.0 programą (Rozsa ir kt., 2000). Infekcijos ekstensyvumo pasikliautiniai intervalai apskaičiuoti pagal Sterne testą (Reicigel, 2003). Parazitų agregacija, tai yra netolygus parazitų pasiskirstymas tarp šeimininkų, įvertintas naudojant D indeksą (angl. discrepancy index), kuris parodo neatitikimą tarp nustatyto ir tolygaus pasiskirstymų (Poulin, 1993). Lyginant infekcijos ekstensyvumo skirtumus tarp imčių, taikytas Fišerio testas. Sarkosporidijų infekcijos intensyvumo skirtumai analizuotose gyvūnų rūšyse įvertinti naudojant Moodo testą, lyginant infekcijos intensyvumo medianų reikšmes. Statistiškai patikimi skirtumai laikyti, kai $p < 0,05$. *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumo Box-Whisker grafikai nubraižyti naudojant SPSS 10.0 programinį paketą (SPSS Inc., Chicago).

Gautų sekų specifiškumo įvertinimas atliktas BLAST programa, lyginant šiame darbe nustatytas sekas su Genų banko skelbiamomis sekomis, pasižyminčiomis aukščiausiu genetinio panašumo laipsniu naujai nustatytoms sekoms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Procentinės sekų identiškumo vertės, gautos naudojant EMBOSS programą pagal numatytąsias parinktis (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>). Sekų sulyginimas atliktas MUSCLE algoritmu (Edgar, 2004), kuris įdiegtas į MEGA 5.05 programinį paketą (Tamura ir kt., 2011). Analizuotos sekos buvo sutrumpinamos tam, kad visos sekos prasidėtų ir pasibaigtų ta pačia nukleotidų pozicija. Siekiant išvengti dviprasmiškai išsidėsčiusių nukleotidų, sekų sulyginimo korektiškumas vėliau patikrintas rankiniu būdu. Filogenetinių medžių šakų išsidėstymas nustatytas Bayesian metodu, MrBayes 3.1.2 programa (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Filogenetiniai ryšiai įvertinti panaudojus programoje įvestą patį sudėtingiausią nepriklausomą, baigtinių vietų DNR fragmente, grįžtamojo laiko evoliucinį modelį (GTR + I + G), kuris leidžia visoms šešioms galimoms DNR pakaitoms varijuoti kartu su pastovių vietų DNR fragmente proporcija ir gama formos

pasiskirstymo dažniu visose DNR fragmento vietose (Tavaré, 1986). Filogenetinėse analizėse išorine grupe pasirinktos rūšys, kurios taksonomiškai artimiausios tiriamajai grupei. 18S rRNR ir 28S rRNR genų filogramose išorine grupe pasirinkta *Besnoitia besnoiti*, o ITS-1 regiono filogramoje – *S. tarandi*. Filogenetiniai medžiai nubraižyti naudojant TreeView programą (Page, 1996).

4. Rezultatai ir jų aptarimas

4.1. *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas tirtuose gyvūnuose

Tiriant 26 gyvūnų rūšis, 18 iš jų atrastos sarkocistos: baltakaktėje žąsyje, pilkojoje žąsyje, baltaskruostėje berniklėje, didžiojoje antyje, rudagalvėje kryklėje, cyplėje, kuoduotoje antyje, klykuolėje, sidabriname kire, varnoje, kove, kuosoje, kėkšte, keršulyje, šerne, stirnoje, tauriajame elnyje, briedyje (4 lentelė).

4 lentelė. Sarkocistų aptinkamumas tirtose gyvūnų rūšyse.

Rūšis	Užsikrėtusių individų skaičius/tirtų individų skaičius	Rūšis	Užsikrėtusių individų skaičius/tirtų individų skaičius
Baltakaktė žąsis	41/95	Klykuolė	2/5
Pilkoji žąsis	5/11	Sidabrinis kiras	4/11
Želmeninė žąsis	0/1	Varna	14/39
Baltaskruostė berniklė	1/3	Kovas	1/20
Didžioji antis	26/130	Kuosa	2/8
Dryžgalvė kryklė	0/9	Kranklys	0/2
Rudagalvė kryklė	1/11	Šarka	0/4
Cyplė	4/7	Kėkštas	1/1
Smailiauodegė antis	0/1	Keršulis	2/18
Šaukštasnapė antis	0/3	Šernas	45/51
Pilkoji antis	0/1	Stirna	80/82
Kuoduotoji antis	2/3	Taurusis elnias	29/36
Rudė	0/1	Briedis	5/8

Dėl didelių biologinių skirtumų, bendra parazitų šeiminių imtis buvo suskaidyta į paukščių ir žinduolių grupes. Ištyrus 384 paukščius *Sarcocystis* parazitų cistos aptiktos 106 individuose, sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas sudarė 27,6% (duomenų patikimumo pasikliautiniai intervalai buvo nuo 23,3% iki 32,3%). Žymiai aukštesnis ekstensyvumas užfiksuotas žinduoliuose – 89,8% (159 užsikrėtusių iš 177 tirtųjų, o duomenų patikimumo pasikliautiniai intervalai buvo nuo 84,5% iki 93,6%). Paukščiuose užfiksuotas 11,1 infekcijos intensyvumo vidurkis, 4,0 infekcijos intensyvumo mediana. Žinduoliuose infekcijos intensyvumo vidurkis buvo 62,0, o mediana 23,0. Lyginant paukščių ir žinduolių sistematines grupes, žinduoliuose

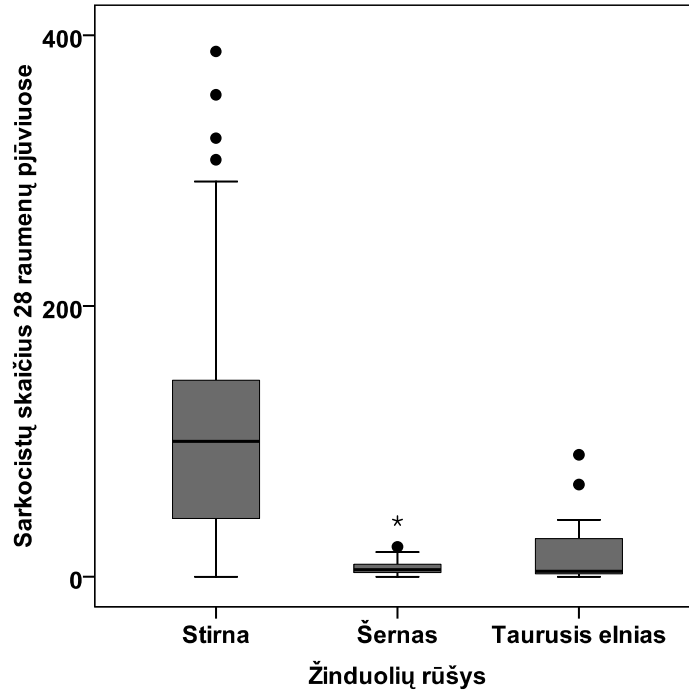
nustatyti patikimai ($p < 0,05$) didesni *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo bei intensyvumo rodikliai.

Detalesniam *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo parametrų palyginimui tarp atskirų medžiojamosios faunos rūšių, pasirinktos šešios rūšys, turinčios didžiausią ištirtų individų imtį. Analizuota po tris rūšis, priklausančias paukščių ir žinduolių grupėms, tai yra baltakaktės žąsys, didžiosios antys, varnos ir atitinkamai stirnos, šernai, taurieji elniai. Medžiojamuosiuose paukščiuose infekcijos ekstensyvumas svyravo nuo 20,0% (didžiojoje antyje), iki 43,2 % (varnoje). Tarp medžiojamųjų žinduolių didžiausiu infekcijos ekstensyvumu išsiskyrė stirnos (97,6%), taip pat labai aukštos infekcijos ekstensyvumo vertės nustatytos šernuose (88,2%) ir tauriuosiuose elniuose (80,6%) (5 lentelė). Lyginant infekcijos ekstensyvumą tarp paukščių ir žinduolių rūšių, nustatyti statistiškai patikimi ($p < 0,05$) skirtumai. Vertinant užsikrėtimo sarkocistomis ekstensyvumą, taip pat statistiškai patikimi skirtumai ($p < 0,05$) nustatyti tarp didžiosios anties – varnos, didžiosios anties – baltakaktės žąsies, stirnos – šerno, stirnos – tauriojo elnio porų. Patikimų skirtumų neužfiksuota tik tarp dvejų porų: varnos – baltakaktės žąsies, šerno – tauriojo elnio.

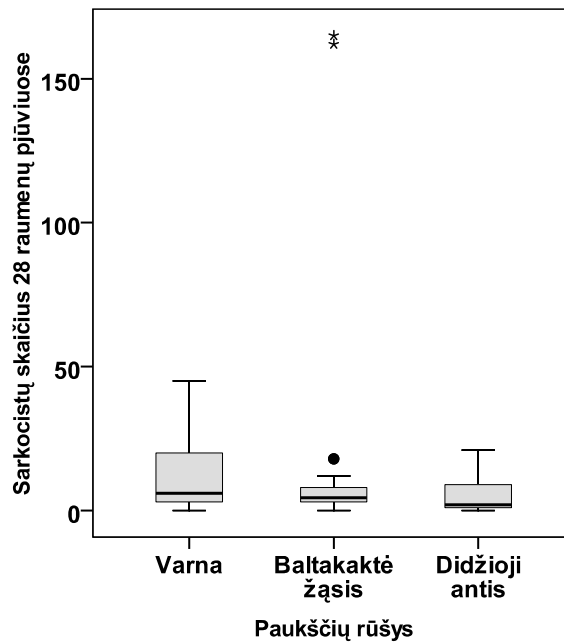
5 lentelė. *Sarcocystis* parazitų paplitimas šešiose gyvūnų rūšyse.

Gyvūno rūšis	Ištirtų individų skaičius	Infekcijos ekstensyvumas, %	95% duomenų patikimumo pasikliautiniai intervalai, %
Baltakaktė žąsis	95	35,9%	33,4 – 53,7%
Didžioji antis	130	20,0%	13,7 – 28,0%
Varna	39	43,2%	21,9 – 52,6%
Šernas	51	88,2%	76,6 – 94,8%
Stirna	82	97,6%	91,6 – 100%
Taurusis elnias	36	80,6%	64,0 – 90,7%

Panašios infekcijos intensyvumo medianų vertės, svyruojančios nuo 2 iki 7,5, apskaičiuotos beveik visose analizuotose rūšyse, išskyrus stirnas, kuriose šis rodiklis siekė net 100,5 (4 pav., 5 pav.). Pačios intensyviausios infekcijos atvejais žinduoliuose nustatytas stirnoje, sumedžiojoje Širvintų rajone (388 sarkocistos 28-iuose diafragmos raumenų pjūviuose), o paukščiuose – baltakaktėje žąsyje iš Šilutės rajono (165 sarkocistos 28-iuose kaklo raumenų



4 pav. Stirnų, elnių ir taurių elnių *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumo Box-Whisker grafikas.



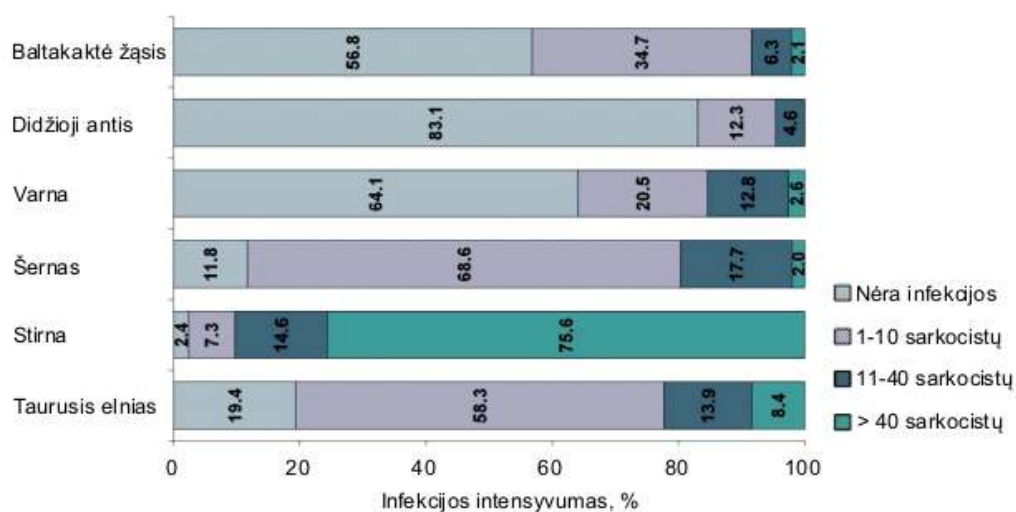
5 pav. Varnos, baltakaktės žąsies ir didžiosios anties *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumo Box-Whisker grafikas.

pjūviuose). Mažiausias infekcijos intensyvumo vidurkis paukščiuose buvo didžiosiose antyse (5,36), o baltakaktėse žąsyse ir varnose šio parametro reikšmės buvo labai panašios (6 lentelė). Žinduoliuose mažiausias infekcijos intensyvumo vidurkis apskaičiuotas šernuose (7,71), apie du kartus didesnis nustatytas tauriuosiuose elniuose ir net apie 15 kartų didesnis stirnose. Tarp trijų paukščių rūšių neaptikta reikšmingų sarkosporidijų infekcijos intensyvumo skirtumų ($p > 0,05$). Priešingai, lyginant tris žinduolių rūšis, nustatyti patikimi sarkocistų infekcijos intensyvumo skirtumai ($p > 0,05$), kurie daugiausiai buvo sąlygoti stirnose aptikto gerokai didesnio infekcijos intensyvumo, todėl statistiškai reikšmingi skirtumai pastebėti ir tarp stirnos-šerno, stirnos-tauriojo elnio imčių porų. Paukščiuose patikimai didesnis infekcijos intensyvumas ($p < 0,05$) užfiksuotas varnose, lyginant su didžiosiomis antimis. D indekso, parodančio parazitų agregaciją, vertės buvo aukštesnės paukščių rūšyse, lyginant su žinduoliais (6 lentelė). Mažesnės D indekso reikšmės stirnose, tauriuosiuose elniuose ir šernuose paaiškinamos nustatytu statistiškai patikimai didesniu *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumu žinduoliuose, negu paukščiuose. Didžiausios D koeficiento reikšmės fiksuotos baltakaktėse žąsyse, didžiosiose antyse, varnose, kur daugelyje individų atrasta santykinai mažai sarkocistų, o tik kai kuriuose santykinai daug sarkocistų. Mažiausios D indekso vertės apskaičiuotos stirnose ir šernuose, o tai parodo, kad šiose rūšyse *Sarcocystis* parazitų cistos pasiskirsčiusios tolygiausiai iš analizuotų gyvūnų rūšių.

6 lentelė. *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumo ir parazitų agregacijos parametrai šešiose gyvūnų rūšyse.

Gyvūno rūšis	Infekcijos intensyvumo vidurkis	Infekcijos intensyvumo mediana	D indeksas
Baltakaktė žąsis	13,44	5,00	0,86
Didžioji antis	5,36	2,00	0,92
Varna	14,21	7,50	0,80
Šernas	7,71	5,00	0,49
Stirna	112,56	100,50	0,45
Taurusis elnias	14,79	4,00	0,70

Sarcocystis parazitų infekcijos intensyvumą sugrupavus į tris kategorijas, paaiškėjo, jog intensyvios infekcijos (> 40 sarkocistų) atvejų, aptikta penkiose iš šešių analizuotų gyvūnų rūšių, intensyvi infekcija nenustatyta tik didžiosiose antyse (6 pav.). Daugiausia intensyvios infekcijos atvejų, net 62 (75,6%), nustatyti stirnose, o kitose rūšyse intensyvios infekcijos atvejai buvo labai reti arba pavieniai. Statistiškai patikimi intensyvios infekcijos skirtumai nustatyti, lyginant stirnas su tauriaisiais elniais ir šernais ($p < 0,05$). Vidutinės infekcijos didžiausiomis reikšmėmis tarp žinduolių pasižymėjo šernai (17,7%) o tarp paukščių – varnos (12,8 %), tačiau lyginant vidutinę infekciją, statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta ($p > 0,05$).

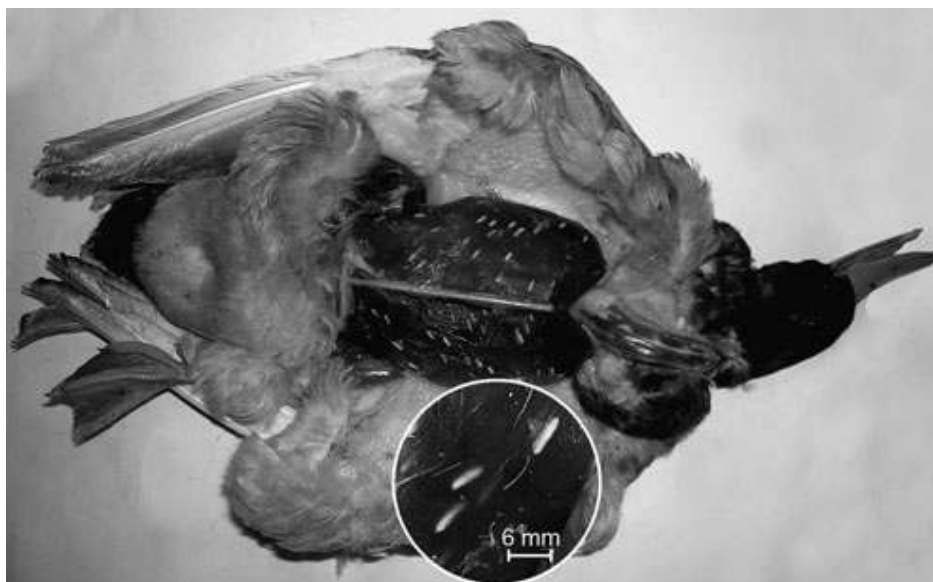


6 pav. *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumas šešiose gyvūnų rūšyse. 1-10 cistų – silpna infekcija; 11-40 cistų – vidutinė infekcija; daugiau kaip 40 cistų – intensyvi infekcija.

4.2. Paukščiuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai

Iš tirtų 22 paukščių rūšių makroskopinės, pilka akimi matomos sarkocistos atrastos tik tai didžiosios anties keturiuose patinėliuose: dvejų individų tyrimams gauti tik kaklo pavyzdžiai, o kitų dviejų – analizuotas visas paukščio lavonėlis. Paukščių, kurių tirtas visas kūnas, makroskopinės cistos tankiausiai buvo išsidėsčiusios krūtinės raumenyse, taip pat kelios sarkocistos

rautos pamatinėje kaklo dalyje. Cistos buvo gelsvai baltos spalvos 1,5–2,0×4,2–7,0 mm dydžio ir savo išvaizda priminė ryžio grūdą (7 pav.).



7 pav. Makroskopinės *Sarcocystis* parazitų cistos didžioios anties krūtinės raumenyse.

Šviesiniu mikroskopu tirtos cistos sienelė pasižymėjo sudėtinga struktūra, o jos storis siekė iki 5,6 μm . Cistozoitai buvo tiesios formos – 15,3–16,8 μm ilgio (8A pav.). Tiriant elektroniniu mikroskopu, pirminė cistos sienelė, susidedanti iš parazitoforinės vakuolės membranos ir elektronams tankaus sluoksnio, buvo labai banguota ir sudarė sudėtingos formos ir skirtingo dydžio išaugas (išaugų ilgis siekė iki 4,2 μm) (8B, C pav.). Elektronams tankus sluoksnis buvo iki 0,08 μm storio ir kai kuriuose priminės cistos sienelės įlinkimuose pertrauktas (8E pav.). Daugelyje išaugų matomi siūliniai dariniai ir smulkios granulės (8D pav.). Grūdėtasis sluoksnis (iki 0,7 μm storio) įsiterpdavo į cistos vidų kaip septos ir padalindavo cistą į kameras, pripildytas cistozoitų. Cistos sienelės išaugos priminė žiedinio kopūsto formą ir pagal Dubey ir Odening (2001) sarkocistų sienelių ultrastruktūros klasifikaciją atitiko 23 cistos sienelės tipą. Šiuo tipu pasižymi tik *S. rileyi* rūšies makrocistos, išskirtos iš šaukštasnapės ir didžiosios ančių (Dubey ir kt. 2003a; 2010).

Apibendrinant, pagal morfologines savybes, tirtosios makrocistos iš didžiosios anties, priskirtos *S. rileyi* rūšiai.

Šviesiniu mikroskopu analizuojant paukščių mikroskopines sarkocistas, jos diferencijuotos į morfologinius cistų tipus pagal sienelės storį, sienelės išaugų ilgį ir formą bei cistozoitų morfometrines ypatybes. Klasifikuojant paukščių sarkocistas, remtasi Kutkienės ir Sruogos (2004) sistema, kuria žąsinių būrio paukščiuose atrastos *Sarcocystis* parazitų mikrocistos skirstomos į keturis tipus (I, II, III, IV). Vėliau buvo išskirtas V morfologinis mikrocistų tipas. Šio darbo metu Kutkienės ir Sruogos (2004) pasiūlyti I ir IV tipai buvo sujungti į vieną ir pavadinti I tipu.

Šviesiniu mikroskopu identifikuotos sarkocistos apibendrintai suskirstytos į sarkocistas, neturinčias išaugų ant sienelės paviršiaus (I tipas) ir sarkocistas, turinčias išaugas (II, III, V tipai). I tipo sarkocistos pasižymėjo plona (~ 1.0 μm) lygia ar truputį banguota cistos sienele, be aiškiai matomų išaugų ir santykinai mažais (6,3–8,1 μm ilgio) lanceto ar banano formos cistozoitais (9A, B pav.; 10A-C pav.; 11A, B pav.; 12A-C pav.). II tipo sarkocistos pasižymėjo iki 1,5 μm storio cistos sienele turinčia tankiai išsidėsčiusias išaugas, kurios formavo į tvorelę panašią struktūrą, o cistozoitai buvo 13,0–16,1 μm ilgio, palinkusios formos, vienas galas šiek tiek platesnis (13A, B pav.). III tipo sarkocistos pasižymėjo santykinai stora (iki 2,4 μm) cistos sienele su piršto ar spenelio formos išaugomis, o 10,0–13,5 μm ilgio cistozoitai buvo beveik tiesūs ir savo forma priminė šaudyklę (14A, B pav.). V tipo sarkocistos pasižymėjo ruožuota iki 2,5 μm ilgio cistos sienele ir smulkiais (6,1–7,9 μm ilgio) banano formos cistozoitais (15A, B pav.).

Šiame darbe analizuotos *Sarcocystis* parazitų mikrocistos, aptiktos 14-oje paukščių rūšių. Verta pabrėžti, jog I tipo sarkocistos nustatytos visose sarkosporidijomis užsikrėtusių paukščių rūšyse. II tipo sarkocistos nustatytos didžiojoje antyje ir klykuolėje, III tipo sarkocistos identifikuotos baltakaktėje žąsyje, pilkojoje žąsyje ir cyplėje, V tipo sarkocistos išimtinai nustatytos tik varnoje. Baltakaktėje žąsyje žymiai dažniau aptiktos III tipo sarkocistos, lyginant su I tipo sarkocistomis. Kitose paukščių rūšyse, kuriose nustatyti du

sarkocistų tipai, patikimų tendencijų apie skirtingų tipų sarkocistų pasiskirstymą, išskyrimas yra ribotas, dėl menkos imties. Užfiksuota mišrios *Sarcocystis* parazitų infekcijos atveju, kai vienas paukštis užsikrečia daugiau, negu vieno morfologinio tipo sarkocistomis. Kai kuriuose infekuotuose individuose nepavyko nustatyti sarkocistų morfologinio tipo dėl nesubrendusių cistų ar mažo infekcijos intensyvumo.

Remiantis fenotipinėmis sarkocistų savybėmis, sarkosporidijos, kurioms atlikta mikrocistų elektroninės mikroskopijos analizė ir/ar DNR analizė pavadintos: *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus*, *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp (V cistos tipas) ex *Corvus cornix*. Toks sarkosporidijų rūšių įvardijimas paliktas, tol kol joms nebuvo suteikti specifiniai rūšių pavadinimai. Elektroniniu mikroskopu tirta po vieną tam tikros *Sarcocystis* sp. rūšies sarkocistos preparatą. Detalus morfologinių savybių aprašymas *Sarcocystis* rūšių izoliatams, kuriems atlikta elektroninės mikroskopijos analizė, pateikiamas žemiau.

Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis (iš baltaskruostės berniklės)

Sarkocistos kaspino formos, labai ilgos (ilgiausias fragmentas atrastas natyviniuose preparatuose siekė 5,2 mm), bet santykinai plonos (iki 100 μm). Sarkocistos septų pagalba padalintos į cistozoitais pripildytas kameras. Šviesiniu mikroskopu cistos sienelė (iki 1,0 μm storio) atrodė lygi (9A pav.), o banano formos cistozoitai buvo maži (6.4–7.9 μm; n=10; 9B pav.).

Tiriant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė (iki 1,1 μm storio) buvo banguota. Kai kuriose vietose bangos priminė išaugas (9C pav.), kitose vietose sienelė atrodė beveik lygi (9D pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo

daug smulkių įlinkimų (9E pav.). Grūdėtasis sluoksnis įsiterpdavo į cistos vidų kaip septa. Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė priklausė 1 tipui.

Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos (iš didžiosios anties)

Sarkocistos kaspino formos, ilgos ir plačios, didžiausias surastas fragmentas buvo 8,0×0,2 mm dydžio. Sarkocistos septomis padalintos į kameras. Tiriant šviesiniu mikroskopu, cistos sienelė atrodė banguota, o jos storis siekė iki 1,0 μm (10A pav.). Banano formos cistozoitai buvo maži (6,7–8,1 μm; n=20; 10B pav.). Cistos paviršius priminė bičių korį (10C pav.).

Tiriant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė atrodė banguota, o jos storis siekė iki 1,6 μm. Kai kuriuose cistos sienelės fragmentuose, bangos priminė išaugas (10D pav.), tačiau kiti sienelės fragmentai buvo beveik lygūs (10E pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo daug smulkių įlinkimų (10F pav.). Grūdėtasis sluoksnis įsiterpdavo į cistos vidų kaip septa. Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė priklausė 1 tipui.

Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus (iš keršulio)

Sarkocistos kaspino formos, labai ilgos ir plonos (ilgiausias pastebėtas fragmentas 7 mm ilgio, o jo storis siekė 150 μm). Septa padalijo cistas į dideles kameras. Cistozoitų forma varijavo nuo lanceto iki banano, o jų ilgis buvo 6,3–7,3 μm (n=11; 11B pav.). Stebint šviesiniu mikroskopu, cistos sienelė (1,0 μm storio) atrodė lygi ar truputėlį banguota (11A pav.).

Elektroninės mikroskopijos analizė parodė, jog cistos sienelė buvo nežymiai ar aiškiai banguota, be aiškių išaugų, o jos storis siekė 2,0 μm. Kai kuriose sienelės vietose bangos buvo aukštos, o kitur sienelė buvo beveik lygi (11C, D pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana pasižymėjo smulkiais pabangavimais (11E pav.). Grūdėtasis sluoksnis nusitęsė į cistos vidų kaip

septa. Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė priklausė 1 tipui.

Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus (iš sidabrinio kiro)

Kaspino formos sarkocistos buvo labai ilgos (siekė iki 6 mm) ir storos (iki 220 μm). Tirtosios cistos buvo subrendusios, padalintos į kameras pripildytas cistozoitų. Nagrinėjant sarkocistas šviesiniu mikroskopu, iki 1,0 μm storio cistos sienelė atrodė lygi ar truputį banguota (12A pav.). Smulkūs 6,5–7,5 ilgio ($n=21$) cistozoitai buvo banano ar lanceto formos (12B pav.). Žiūrint iš viršaus, cistos paviršius atrodė padengtas kalvelėmis, o visa struktūra priminė bičių korį (12C pav.).

Tiriant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė buvo lygi ar banguota ir siekė iki 1,3 μm storio (12D pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo daug smulkių įlinkimų (12E pav.). Grūdėtasis sluoksnis nusidriekdavo į cistos vidų kaip septa. Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė priklausė 1 tipui.

Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos (iš didžiosios anties)

Sarkocistos kaspino formos, plonos ir ilgos, didžiausias rastas fragmentas buvo 5 mm ilgio ir 80 μm storio. Tiriant šviesiniu mikroskopu, cistos sienelė (iki 1,5 μm) pasižymėjo glaudžiai susigrupavusiomis tvorelės formos išaugomis (13A pav.). Cistos buvo padalintos septomis į kameras, pilnas cistozoitų. Cistozoitai (13,0–16,1 \times 1,8–2,5 μm , $n=31$) buvo truputėlį palinkę į vieną pusę, abu galai buki, iš kurių vienas platesnis, jie savo išvaizda priminė kuokas (13B pav.).

Analizuojant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė turėjo santykinai trumpas (iki 1,3 μm) išaugas, besiskiriančias viena nuo kitos savo dydžiu ir forma (13C, D pav.). Pirminė cistos sienelė turėjo antrines išaugas, kurios aiškiai buvo matomos įstrižuose išaugos pjūviuose (13E, F pav.). Pagal Dubey

ir Odening (2001) klasifikaciją, cistos sienelė buvo panaši į 9 tipą, tačiau savo forma ir mažesniu išaugų dydžiu skyrėsi nuo pastarojo tipo.

Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons (iš baltakaktės žąsies)

Kaspino formos sarkocistos buvo iki 4 mm ilgio ir 750 μm storio. Šviesiniu mikroskopu stebint sarkocistą, jos sienelė (iki 2,4 μm storio) pasižymėjo piršto ar spenelio formos išaugomis su aiškiais tarp išaugų matomais tarpais (14A pav.). Preparuojant sarkocistas, vienu išaugos buvo palinkusios į kairę, kitų į dešinę, o išaugų klasteriai kartais priminė krūminius dantis. Septos padalijo cistas į kameras, pripildytas cistozoitų. Cistozoitai (10,0–13,5 \times 1,5–2,5 μm , n=36) buvo beveik tiesūs ir savo forma priminė šaudyklę (14B pav.).

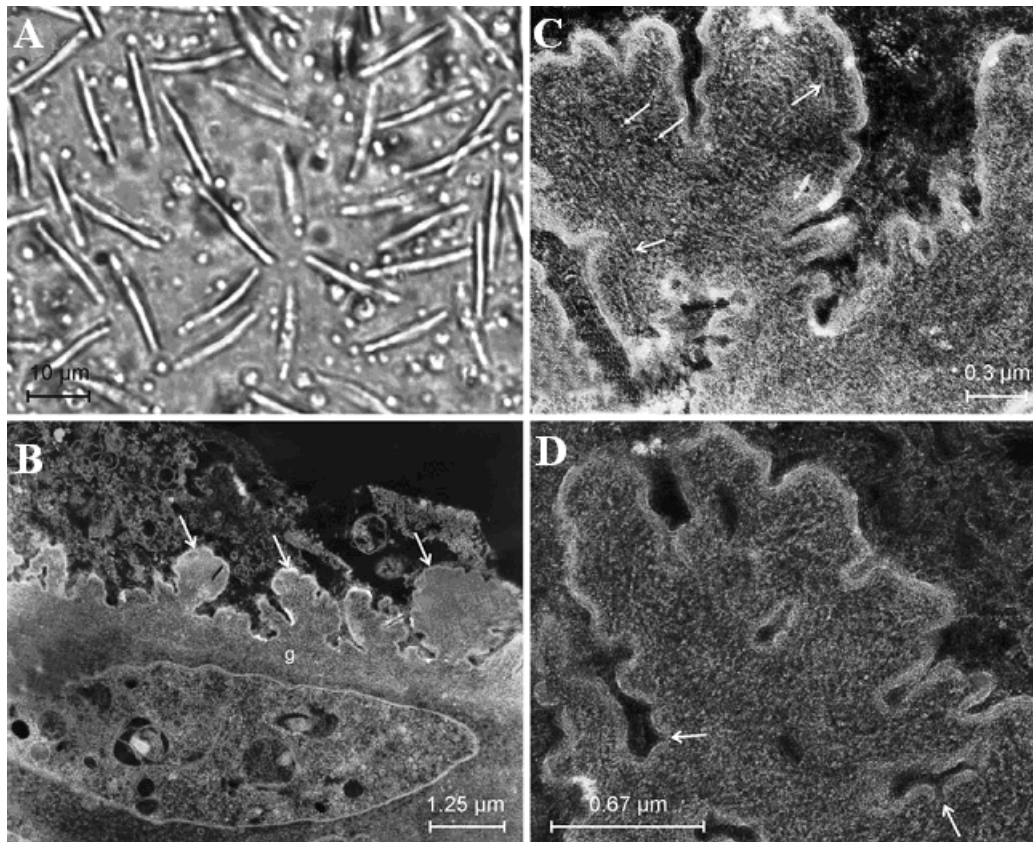
Tiriant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė turėjo iki 2,3 μm ilgio piršto ar spenelio formos išaugas, kurios tarpusavyje skyrėsi savo ilgiu ir pločiu (14C, D pav.). Išaugų viduje buvo matomi fibriliniai elementai, kurie nusitęsė nuo išaugų viršūnių į cistos grūdėtąjį sluoksnį (14E pav.). Skersiniuose pjūviuose buvo matomi parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai. Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė priklausė 9 tipui.

Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix (iš varnos)

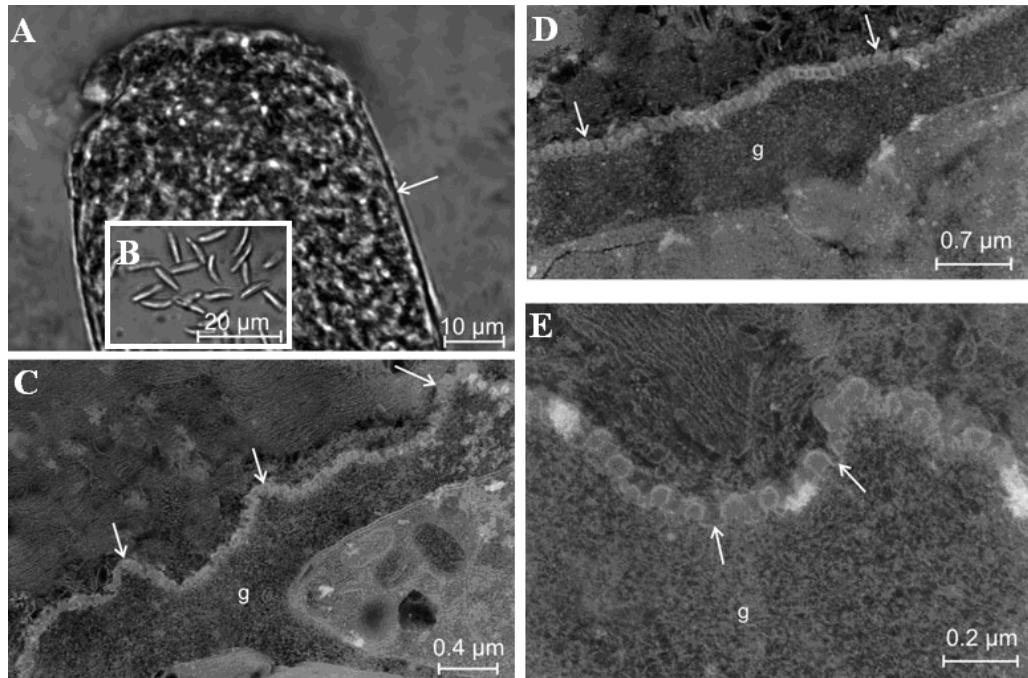
Sarkocistos kaspino formos, labai ilgos (ilgiausias fragmentas siekė 6,0 mm) ir storos (iki 0,3 mm). Sarkocistos septų padalintos į kameras, pripildytas cistozoitų. Tiriant šviesiniu mikroskopu, cistos sienelė atrodė ruožuota, jos storis siekė iki 2,5 μm (15A pav.), o banano formos cistozoitai maži (6,1–7,9 \times 1,4–1,8 μm , n=20) (15B pav.).

Analizuojant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė siekė iki 2,1 μm storio, turėjo kelmo formą primenančias išaugas, kurių dydis ir forma varijavo (15C pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo įlinkimus ir aiškiai

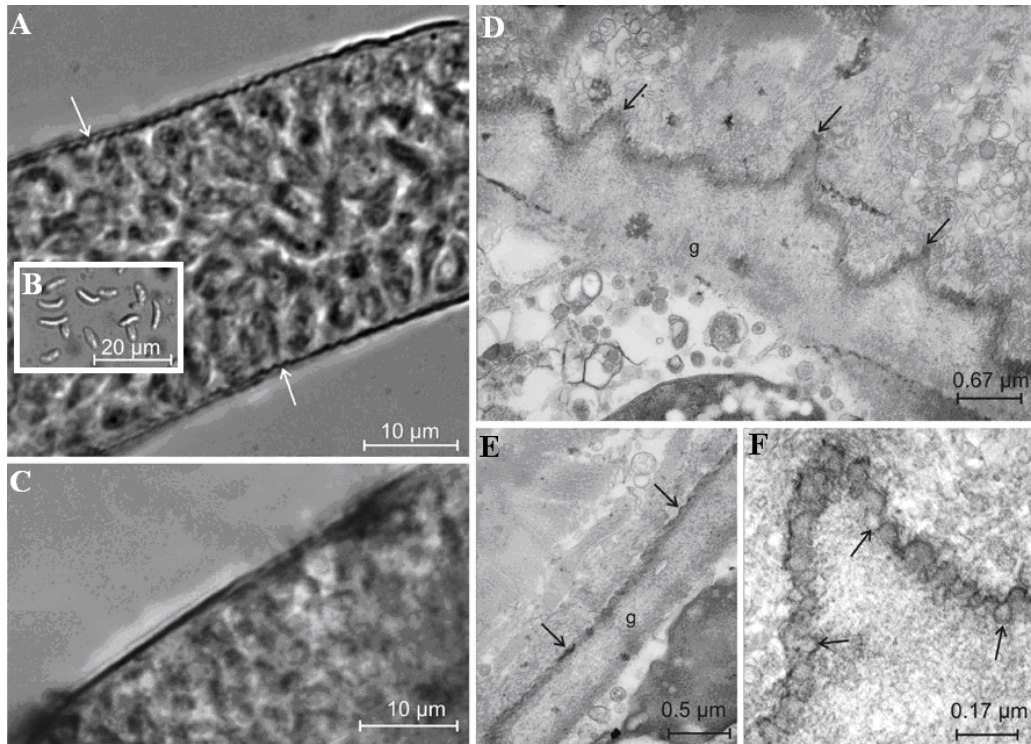
matomas (iki $0,2 \mu\text{m}$) antrines išaugas, kurių forma ir dydis smarkiai skyrėsi (15D pav.). Santykinai storas (iki $1,5 \mu\text{m}$) grūdėtasis sluoksnis, turintis mažas granules, nusitęsavo į cistos vidų kaip septa (15E pav.). Cistos sienelė nepriskirtina nei vienam iš anksčiau aprašytų cistos sienelės tipų.



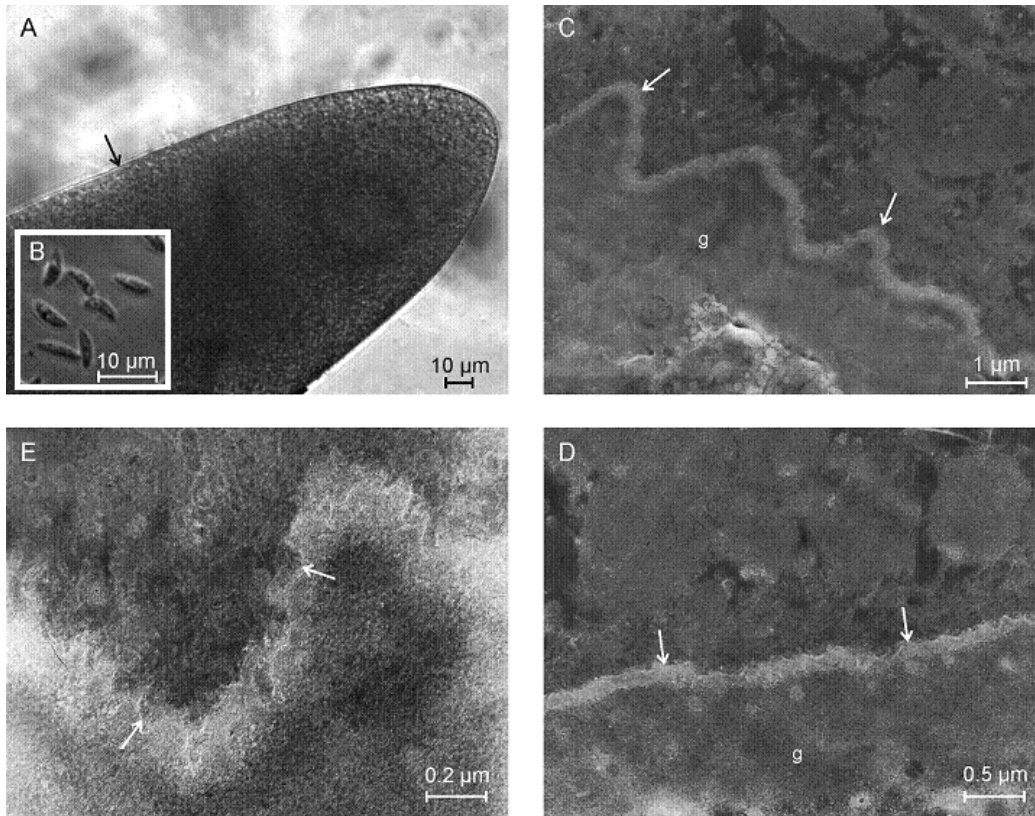
8 pav. *Sarcocystis rileyi* makrocistos, išskirtos iš didžiosios anties, morfologija: **A** – cistozoitų natyvinio preparato šviesinės mikroskopijos nuotrauka; **B-D** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **B** – cistos sienelės fragmentas, rodyklėmis pažymėtos skirtingos formos ir dydžio išaugos; **C** – cistos sienelės išauga, rodyklės parodo mikrogranules ir mikrofilamentines struktūras; **D** – cistos sienelės išauga, rodyklės pažymi išaugos vietas, kuriose elektronams tankus sluoksnis, esantis po parazitoforinės vakuolės membrana yra pertrauktas; **g** – grūdėtasis sluoksnis.



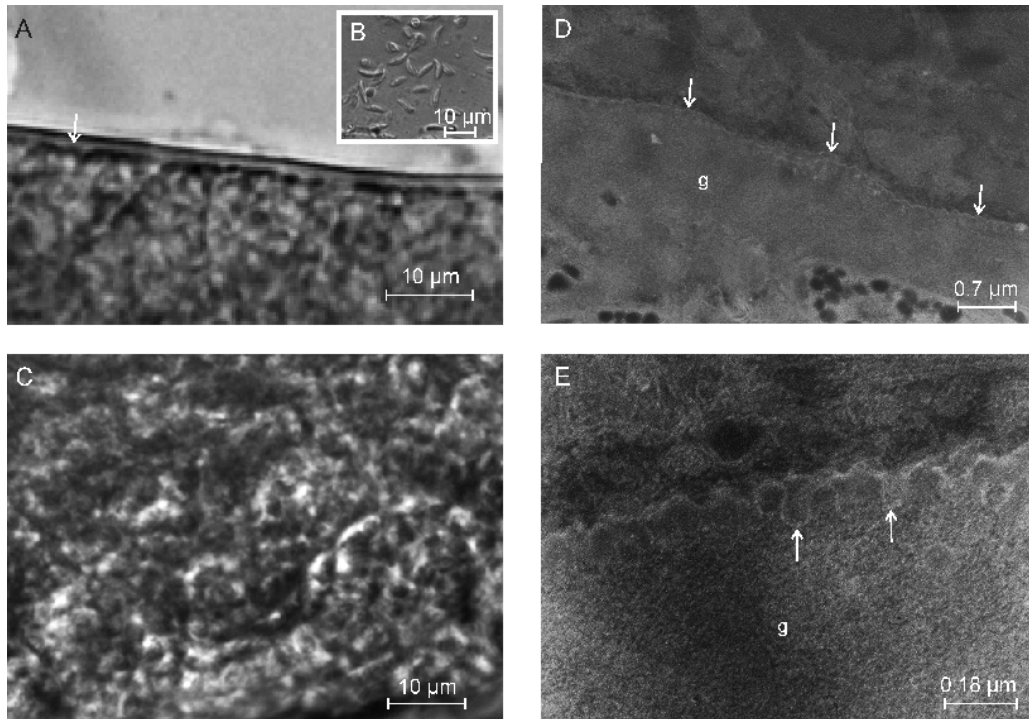
9 pav. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis* morfologija: **A, B** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, cistos sienelė pažymėta rodykle; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C** - cistos sienelės fragmentas, sienelės pabangavimai parodyti rodyklėmis; **D** – cistos sienelės fragmentas, beveik lygi cistos sienelė parodyta rodyklėmis; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai pažymėti rodyklėmis; **g** – grūdėtasis sluoksnis.



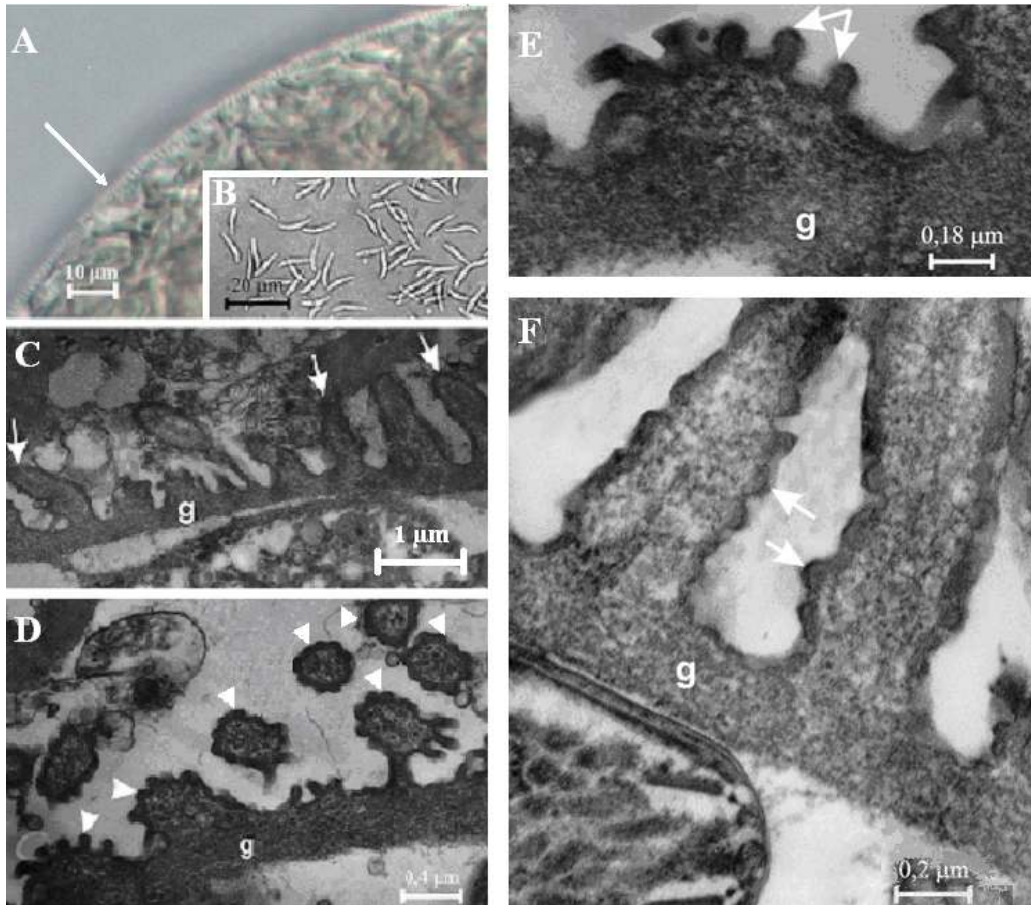
10 pav. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* morfologija: **A-C** – natyviųjų preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklės pažymi banguotą cistos sienelę; **B** – cistozoitai; **C** – cistos sienelės paviršiaus fragmentas primenantis bičių korį; **D-F** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **D** – cistos sienelės fragmentas, sienelės pabangavimai parodyti rodyklėmis; **E** – cistos sienelės fragmentas, lygi cistos sienelė pažymėta rodyklėmis; **F** – padidintas cistos sienelės fragmentas, parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai parodyti rodyklėmis; **g** – grūdėtasis sluoksniš.



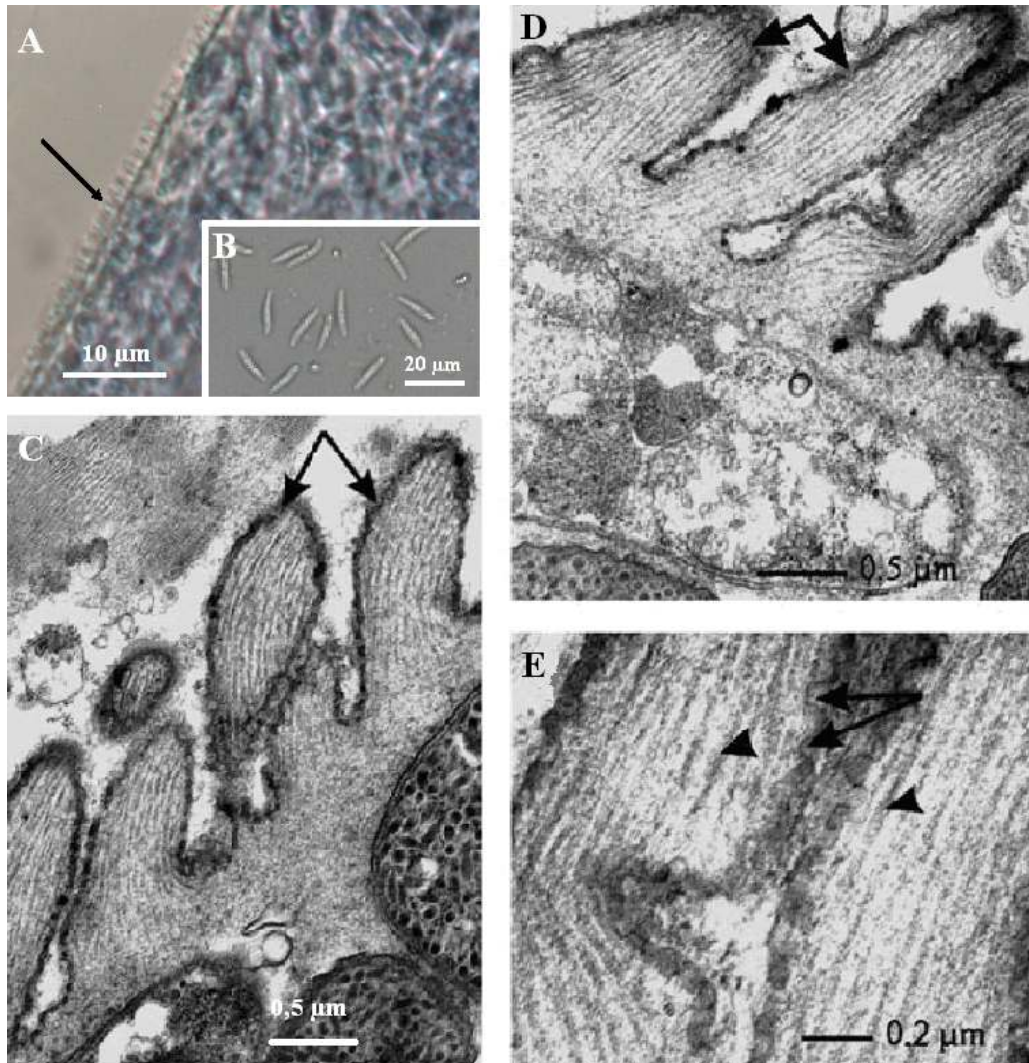
11 pav. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus* morfologija: **A**, **B** – natyviųjų preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodykle pažymėta lygi ar truputį banguota cistos sienelė; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C** – cistos sienelės fragmentas, rodyklės parodo aukštas bangas; **D** – cistos sienelės fragmentas, rodyklės parodo beveik lygią cistos sienelę; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai parodyti rodyklėmis; **g** – grūdėtasis sluoksnis.



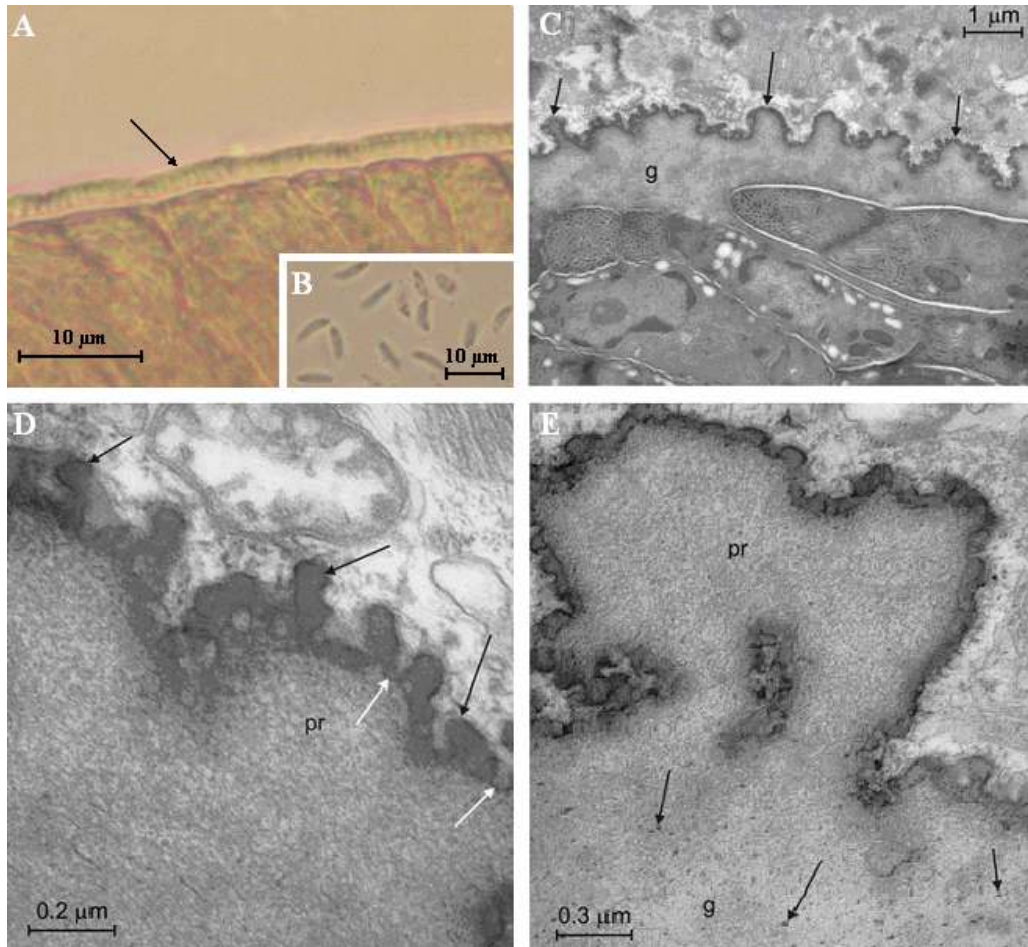
12 pav. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* morfologija: **A-C** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo ploną ir truputį banguotą cistos sienelę; **B** – cistozoitai; **C** – cistos sienelės paviršiaus fragmentas primenantis bičių korį; **D, E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **D** – banguotos cistos sienelės fragmentas pažymėtas rodyklėmis; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai parodyti rodyklėmis; **g** – grūdėtasis sluoksnis.



13 pav. *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* morfologija: **A**, **B** – natyviųjų preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo tvorelės formos sienelę; **B** – cistozoitai; **C-F** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C** – cistos sienelės fragmento pjūvis, rodyklėmis pažymėtos išaugos, kurios viena nuo kitos skiriasi forma ir dydžiu; **D** – įstrižas cistos sienelės fragmento pjūvis, strėlytės rodo išaugas; **E**, **F** – padidintas cistos sienelės fragmentas, rodyklės pažymi ant cistos sienelės išaugų esančias antrines išaugas; **g** – grūdėtasis sluoksnis.



14 pav. *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons* morfologija: **A, B** – natyviųjų preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo cistos sienelę pasižyminčia piršto ar spenelio formos išaugomis; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C, D** – skersiniai cistos sienelės fragmentų pjūviai, rodyklės pažymi piršto ar spenelio formos išaugas; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai parodyti rodyklėmis, strėlytės pažymi fibrilinius elementus; **g** – grūdėtasis sluoksniš.



15 pav. *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* morfologija: **A**, **B** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo ruožuotą cistos sienelę; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos. **C** – cistos sienelės fragmentas, rodyklės parodo kelmo formos išaugas; **D** – padidintas cistos sienelės fragmentas, baltos rodyklės pažymi parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimus, o juodos rodyklės – antrines išaugas; **E** – padidinta cistos sienelės sudėtingos formos išauga, rodyklės parodo mikrogranules; **g** – grūdėtasis sluoksniš. **pr** – cistos sienelės išauga.

4.3. Žinduoliuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai

Tiriant briedžių, stirnų, tauriųjų elnių ir šernų raumeninius audinius, kiekvienoje šeimininko rūšyje aptiktos mikroskopinės sarkocistos. Šviesiniu mikroskopu natyviniuose preparatuose rastos cistos, remiantis cistos morfologija, preliminariai priskirtos tam tikrai žinomai *Sarcocystis* rūšiai. Diferencijuojant sarkocistas, didžiausias dėmesys skirtas cistos sienelės ypatybių vertinimui.

Įvertinus cistų morfologinius požymius, stirnose nustatytos keturių morfologinių tipų sarkocistos, trys iš kurių identifiкуotos kaip *S. capreolicanis* (16A pav.), *S. gracilis* (16B pav.) ir *S. hofmanni-like* (16C pav.). Verta pažymėti, jog -like prierašas prie *Sarcocystis* rūšies pavadinimo, reiškia, jog minima rūšis yra panaši į tam tikrą sarkosporidijų rūšį, aprašytą kitame tarpiniame šeimininke, tačiau tyrimo rezultatų nepakanka teigti, kad tai tikrai toji *Sarcocystis* rūšis. Šios trys *Sarcocystis* rūšys jau anksčiau buvo aptiktos Lietuvoje ir jų morfologija šviesiniu mikroskopu detalai aprašyta (Kutkienė, 2001). Sarkocistos, kurios apibūdintos kaip *S. hofmanni-like*, kai kuriose stirnose šiek tiek skyrėsi, jų sienelės išaugos buvo truputį aukštesnės ir siauresnės, tačiau priminė tą pačią, lyg iš pirštos formos išaugų sudarytos tvorelės struktūrą. Tiriant šviesiniu mikroskopu nebuvo galima garantuoti, jog *S. hofmanni-like* sarkocistas skaidant į du morfologinius tipus (pirmam tipui priskiriant sarkocistas, turinčias aukštesnes ir siauresnes sienelės išaugas, o antram tipui – trumpesnes ir platesnes išaugas), kiekviena sarkocista bus teisingai priskirta tam tikram tipui. Entzeroth (1982) stirnose nustatė šešis *Sarcocystis* spp. cistų sienelės tipus, iš kurių trys pirmi tipai atitinka *S. hofmanni-like* rūšį ir, autoriaus manymu, priklauso tai pačiai rūšiai, o morfometriniai skirtumai atsirado dėl nevienodo sarkocistų subrendimo lygio. Todėl visos sarkocistos, kurių sienelė primena tvorelės struktūrą, sudarytą iš piršto formos išaugų buvo identifiкуojamos kaip *S. hofmanni-like*. Šiame darbe naujo morfologinio tipo sarkocistos aptiktos tik vienoje iš visų tirtų stirnų. Cistos pasižymėjo kiaušiniška forma, jų dydis siekė iki 0,9×0,4 mm (16D

pav.). Sarkocistos buvo apgaubtos apie 6 µm storio skaidulinio sluoksnio kapsule, kurios nepavyko atskirti nuo cistos paviršiaus, esant kapsulei cistos sienelė atrodė lygi (16E pav.). Sarkocistos septų padalintos į kameras, pripildytas cistozoitų. Savo morfologinėmis savybėmis aptiktos kiaušinio formos sarkocistos atitiko *S. hardangeri*, *S. ovalis*, *S. oviformis* rūšis. Šiuo atveju elektroninės mikroskopijos analizė nebuvo atlikta, nes lyginant cistų sienelių ultrastruktūras, *S. hardangeri*, *S. ovalis* ir *S. oviformis* rūšių atskirti nepavyksta, o naudojant 18S rRNR geno sekų analizę nustatyta, jog Norvegijoje stirnose parazituoja *S. oviformis* rūšis (Dahlgren, Gjerde, 2008b).

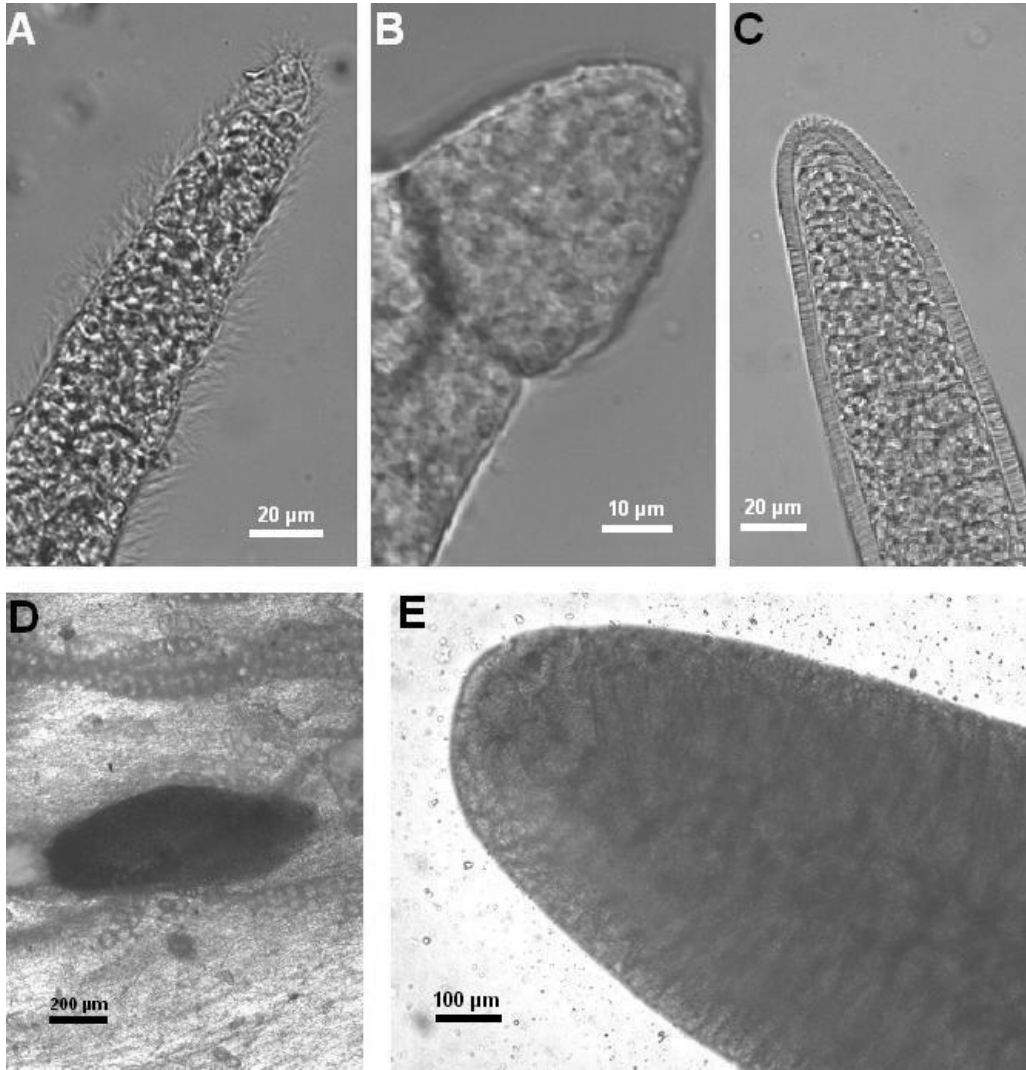
Šiame darbe tirtose stirnose dažnai pasitaikydavo mišri infekcija, kai viename individe buvo randama daugiau, negu vienas skirtingas sarkocistų morfologinis tipas, atitinkantis tam tikrą sarkosporidijų rūšį. Detaliau paanalizavus 13 *Sarcocystis* spp. cistomis užsikrėtusias stirnas, nustatyti keturi dvigubos infekcijos atvejai: *S. hofmanni*-like + *S. gracilis* – 2 kartus ir po vieną kartą *S. hofmanni*-like + *S. capreolicanis* bei *S. capreolicanis* + *S. gracilis*. Taip pat aptikti penki trigubos infekcijos variantai: keturis kartus *S. hofmanni*-like + *S. capreolicanis* + *S. gracilis* bei vieną kartą *S. capreolicanis* + *S. hofmanni*-like + kiaušinio formos sarkocistos.

Šernuose nustatytos vieno tipo sarkocistos, kurios diagnozuotos kaip *S. miescheriana* rūšis (17A pav.).

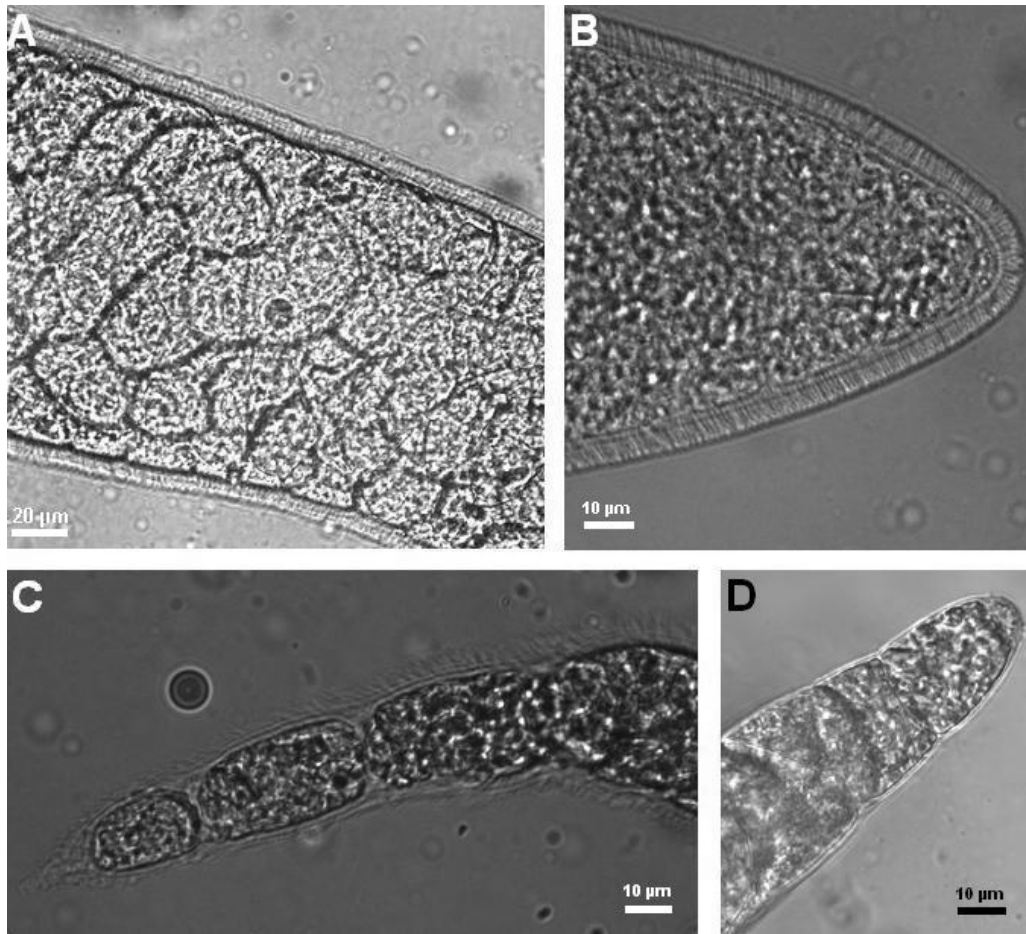
Tauriuosiuose elniuose nustatyti 3 sarkocistų tipai, kurie, vertinant morfologines ypatybes, įvardinti kaip *S. hofmanni*-like (17B pav.), *S. capreolicanis*-like (17C pav.) ir *S. grueneri*-like (17D pav.). *S. capreolicanis*-like ir *S. hofmanni*-like rūšys aptiktos tauriuosiuose elniuose pagal morfologinius požymius buvo identiškos *S. capreolicanis* ir *S. hofmanni*-like rūšims, parazituojančioms stirnose. Šiame darbe elniuose rasti sarkocistų tipai atitiko visus iki šiol Lietuvoje nustatytus sarkocistų tipus (Kutkienė, 2003). Šešiuose tauriuosiuose elniuose, kuriuose aptiktos subrendusios cistos bei pavyko identifikuoti sarkocistų morfologinius tipus, nustatyti du *S. capreolicanis*-like, po vieną *S. grueneri*-like, *S. hofmanni*-like, *S. grueneri*-like + *S. capreolicanis*-like ir *S. grueneri*-like + *S. capreolicanis*-like + *S.*

hofmanni-like infekcijos atvejus. Taigi, tauriuosiuose elniuose, kaip ir stirnose, pasitaikė mišrios infekcijos atvejų.

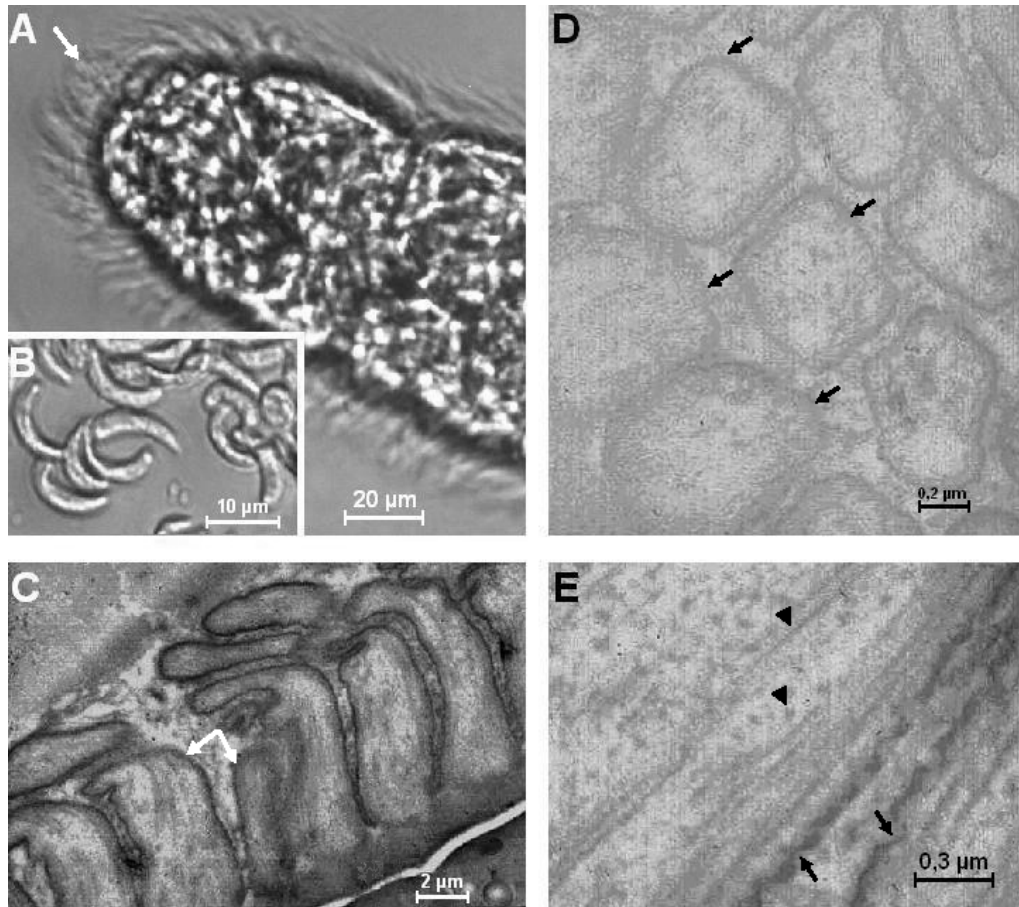
Briedžiuose aptiktos tik vieno tipo sarkocistos, tai kaspino formos cistos (iki 1,5 mm ilgio bei 0,1 mm storio). Sarkocistos septomis padalintos į kameras su cistozoitais. Tiriant šviesiniu mikroskopu, cistos sienelės paviršius buvo padengtas plauko formos iki 12 μm ilgio išaugomis, kurios priklausimai nuo preparavimo būdo, buvo pasišiaušusios, palinkusios į kairę arba dešinę (18A pav.). Cistozoitai stambūs, banano formos (12,8–14,1 \times 3,8–4,5 μm , n=25) (18B pav.). Kadangi tokios morfologinės išvaizdos sarkocistos briedžiuose Lietuvoje anksčiau nebuvo aptiktos, atlikta sarkocistos sienelės elektroninės mikroskopijos analizė. Analizuojant transmisiniu elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė turėjo 10 – 12 μm ilgio plauko formos palinkusias išaugas, kurios pamatinėje dalyje išplatėjusios, o atstumai tarp išaugų pagrindų buvo beveik vienodi (18C pav.). Išaugos pasižymėjo netaisyklinga forma bei skirtingu dydžiu (18D pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo įlinkimus, o išaugų viduje matomi fibriliniai elementai bei mikrogranulės (18E pav.). Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė buvo panaši į 6-7 tipus.



16 pav. *Sarcocystis* rūšių, aptiktų stirnų raumenyse, morfologija: **A-E** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – *S. capreolicanis*; **B** – *S. gracilis*; **C** – *S. hofmanni*-like; **D, E** – kiaušiniškos formos *Sarcocystis* sp. cistos.



17 pav. *Sarcocystis* rūšių, aptiktų šernų ir tauriųjų elnių raumenyse, morfologija: **A-D** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – *S. miescheriana* iš šerno; **B** – *S. hofmanni*-like iš tauriojo elnio; **C** – *S. capreolicanis*-like iš tauriojo elnio; **D** – *S. grueneri*-like iš tauriojo elnio.



18 pav. *Sarcocystis* sp., rastos briedyje, morfologija: **A, B** – natyvinių preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo plauko formos sienelės išaugas; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C** – cistos sienelės fragmento pjūvis, rodyklėmis pažymėtos išaugos; **D** – įstrižas cistos sienelės fragmento pjūvis, rodyklėmis parodytos išaugos; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, rodyklėmis pažymėti parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai, strėlytės parodo fibrilinius elementus ir mikrogranules.

4.4. Medžiojamosios faunos sarkosporidijų genetinių tyrimų rezultatai

Siekiant genetiškai identifikuoti bei charakterizuoti *Sarcocystis* rūšis, parazituojančias paukščiuose, nustatytos jų 18S rRNR geno sekos, ITS–1 regiono sekos bei 28S rRNR geno dalinės sekos, apimančios apie 45% viso geno. Sarkosporidijų, išskirtų iš medžiojamųjų stambiųjų žinduolių, identifikavimui panaudotas 18S rRNR genas. Nustatytos sekos buvo patalpintos į Genų Banko duomenų bazę, o sekoms priskirti identifikavimo numeriai pateikti 7 lentelėje.

7 lentelė. Genetinėje analizėje panaudotų kokcidijų rūšių Genų banko identifikavimo numeriai.

Rūšis	18S rRNR genas	28S rRNR genas	ITS–1 regionas
<i>Besnoitia besnoiti</i>	AF109678	AF076900	–
<i>Frenkelia glareoli</i>	AF009245	AF044251	–
<i>Frenkelia microti</i>	AF009244	AF044252	–
<i>Sarcocystis alces</i>	EU282018	–	–
<i>Sarcocystis alceslatrans</i>	EU282033	–	–
<i>Sarcocystis arieticanis</i>	L24382	AF076904	–
<i>Sarcocystis atheridis</i>	AF120114	–	–
<i>Sarcocystis aucheniae</i>	AF017123	–	–
<i>Sarcocystis buffalonis</i>	AF017121	–	–
<i>Sarcocystis calchasi</i>	GQ245670	FJ232949	FJ232948
<i>Sarcocystis canis</i>	–	–	DQ176645
<i>Sarcocystis capracanis</i>	L76472	AF012885	–
<i>Sarcocystis capreolicanis</i>	JN256129	–	–
<i>Sarcocystis columbae</i>	GU253883, HM125054	GU253887, HM125053	GU253885, HM125052
<i>Sarcocystis cruzi</i>	AF017120	AF076903	–
<i>Sarcocystis dispersa</i>	AF120115	–	–
<i>Sarcocystis falcatula</i>	–	–	AY082638, AY082639 AF098242–AF098246
<i>Sarcocystis felis</i>	–	–	AY190081
<i>Sarcocystis fusiformis</i>	U03071	–	–
<i>Sarcocystis gallotiae</i>	AY015112	–	–
<i>Sarcocystis gigantea</i>	L24384	U85706	–
<i>Sarcocystis gracilis</i>	FJ196261, JN256131	–	–
<i>Sarcocystis grueneri</i>	EF056010	–	–
<i>Sarcocystis hardangeri</i>	EF056013, EF056014, EF467654, GQ250987	–	–
<i>Sarcocystis hirsuta</i>	AF017122	–	–
<i>Sarcocystis hjorti</i>	GQ250990, EU282017, JN256124, JN256128	–	–
<i>Sarcocystis hofmanni-like1</i>	EU282016, JN256132	–	–
<i>Sarcocystis hofmanni-like2</i>	JN256125, JN256133– JN256137	–	–
<i>Sarcocystis kalvikus</i>	–	–	GU200661
<i>Sarcocystis lacertae</i>	AY015113	–	–
<i>Sarcocystis lindsayi</i>	–	–	AF387164
<i>Sarcocystis miescheriana</i>	JN256123	AF076902	–
<i>Sarcocystis moulei</i>	L76473	AF012884	–
<i>Sarcocystis mucosa</i>	AF109679	–	–
<i>Sarcocystis muris</i>	M64244	AF012883	–
<i>Sarcocystis neurona</i>	U07812	AF092927	AH009986, AY009113,

			AY082644, AY082648, AY082634–AY082637, AF081944, AF204230, AF252407, DQ084483–DQ084484, DQ084486–DQ084488
<i>Sarcocystis ovalis</i>	EU282019, EU282034, GQ250988, GQ250989	–	–
<i>Sarcocystis oviformis</i>	FJ196262, JN256130	–	–
<i>Sarcocystis rangi</i>	EF467655, EF056011	–	–
<i>Sarcocystis rangiferi</i>	GQ251024 GQ250977–GQ250986, GQ251021–GQ251023, GQ251025–GQ251030, EF056015, EF056016	–	–
<i>Sarcocystis rileyi</i>	GU120092, HM185742	GU188426, HM185743	GU188427, HM185744
<i>Sarcocystis rodentifelis</i>	AY015111	–	–
<i>Sarcocystis scandinavica</i>	EU282032 EU282020–EU282031	–	–
<i>Sarcocystis singaporensis</i>	AF434051, AF434054, AF434057, AF434059	AF237617	–
<i>Sarcocystis tarandi</i>	GQ251019 EF056017, EF056018, GQ250967–GQ250976, GQ251011–GQ251018, GQ251020	–	GQ250957
<i>Sarcocystis tarandivulpes</i>	EF056012, EF467656	–	–
<i>Sarcocystis tenella</i>	L24383	AF076899	–
<i>Sarcocystis zamani</i>	–	AF237616	–
Sarcocystis I	U97524	–	–
Sarcocystis II	AF513489	–	–
Sarcocystis III	AF513490	–	–
Sarcocystis IV	AF513491	–	–
Sarcocystis V	AF513487, AF513488	–	–
Sarcocystis VI	GU253884	GU253888	GU253886
Sarcocystis VII	AB257156, AB257154, AB257155, AB257157–AB257162, AB257085, AB257086, AB251926	–	–
<i>Sarcocystis</i> sp I cistos tipas ex <i>Corvus monedula</i>	JN256117	JN256118	JN256119
<i>Sarcocystis</i> sp I cistos tipas ex <i>Branta leucopsis</i>	GQ922885	GQ922887	GU475111
<i>Sarcocystis</i> sp I cistos tipas ex <i>Anas platyrhynchos</i>	GQ922886	GQ922888	GU475112, JN256121
<i>Sarcocystis</i> sp I cistos tipas ex <i>Larus argentatus</i>	HM159419	HM159420	HM159421
<i>Sarcocystis</i> sp I cistos tipas ex <i>Anser albifrons</i>	EU502869	EF079886	–
<i>Sarcocystis</i> sp II cistos tipas ex <i>Anas platyrhynchos</i>	EU553477	EF079887	JF520779
<i>Sarcocystis</i> sp III cistos tipas ex <i>Anser albifrons</i>	EU502868	EF079885	JF520780, JN256122
<i>Sarcocystis</i> sp V cistos tipas ex <i>Corvus cornix</i>	EU553478	EF079884	JF520781, JN256120
<i>Sarcocystis</i> sp ex <i>Cervus elaphus</i>	JN256126, JN256127	–	–

Pajuodintos *Sarcocystis* parazitų sekos buvo nustatytos šiame tyrime.

18S rRNR geno sekų, gautų iš *Sarcocystis* rūšių, sudarančių cistas medžiojamuosiuose žinduoliuose, ilgai svyravo nuo 1835bp iki 1915bp. *S. miescheriana*, išskirtų iš keturių šernų, sekos buvo identiškos. Iki šiol duomenų bazėse buvo pasiekiamos *S. miescheriana* 18S rRNR geno dalinės sekos (782bp, 844bp, 864bp), apimančios mažiau negu pusę viso geno. Lyginant šiame darbe gautą 18S rRNR geno fragmentą, nustatytas 99,5–99,9% sekų identiškumas su *S. miescheriana* sekomis (GU395554, EU327974, DQ839352), kita genetiškai artimiausia rūšis buvo *S. suihominis* (sekų identiškumas siekė 97,3%), kurios tarpiniai šeimininkai - kiaulė ar šernas, o galutinis šeimininkas - žmogus. Taigi, genetiškai patvirtinta, jog šiame tyrime iš šernų raumenų išskirtos sarkocistos priklauso *S. miescheriana* rūšiai. *Sarcocystis* sp. iš briedžio 18S rRNR geno seka 100% sutapo su *S. hjorti* rūšies iš tauriojo elnio GQ250990 ir briedžio EU282017 sekomis. *Sarcocystis* sp. iš stirnos, kurios pasižymi kiaušinio sarkocistų forma 18S rRNR geno gauta seka visiškai sutapo su *S. oviformis* FJ196262 seka. Nenustatyti sekų skirtumai tarp dviejų *S. capreolicanis* izoliatų iš stirnų bei tarp šešių *S. gracilis* izoliuotų taip pat iš stirnų. *S. capreolicanis* rūšies 18S rRNR geno sekos buvo nustatytos pirmą kartą. Šiame tyrime šešiuose izoliatuose nustatyta *S. gracilis* seka buvo identiška *S. gracilis* FJ196261 sekai. Sekvenavus dešimt iš stirnų išskirtų *S. hofmanni-like* izoliatų gautos 6 skirtingos sekos. Trys sekos buvo identiškos ir joms suteiktas JN256132 Genų Banko numeris, kitoms trimis identiškoms sekoms priskirtas JN256137 Genų Banko identifikavimo numeris, o keturios likusios sekos skyrėsi viena nuo kitos ir joms suteikti atitinkami Genų Banko numeriai (JN256133–JN256136). JN256132 sekos identiškumo skirtumai, lyginant su kitomis *S. hofmanni-like* sekomis, svyravo nuo 3,8 iki 4,0%, tuo tarpu tarp likusių sekų skirtumai buvo 0,1–0,3%. Dėl reikšmingų genetinių skirtumų, lyginant 18S rRNR geno sekas, *S. hofmanni-like* išskaidyta į *S. hofmanni-like1* ir *S. hofmanni-like2*, nesuteikiant joms atskirų rūšių pavadinimų, nes išsamūs cistų sienelių ultrastruktūros palyginimai nebuvo atlikti. JN256132 seka priskirta *S. hofmanni-like1*, o JN256133–JN256137 sekos - *S. hofmanni-like2*. *S. hofmanni-like1* sarkocistų sienelės išaugos buvo

aukštesnės ir siauresnės lyginant su žemesnėmis ir platesnėmis *S. hofmanni-like2* sarkocistų sienelės išaugomis. *S. hofmanni-like1* JN256132 seka visiškai sutapo su *Sarcocystis* sp. TypeD iš briedžio EU282016 seka. Todėl *hofmanni-like1* ir *Sarcocystis* sp. TypeD vertintos kaip viena rūšis. *S. hofmanni-like* iš tauriojo elnio 18S rRNR geno JN256125 seka skyrėsi nuo *S. hofmanni-like2* sekų iš stirnos tik 0,1-0,2%, todėl šis izoliatas iš tauriojo elnio irgi pavadintas *S. hofmanni-like2*. Du *S. capreolicanis-like* izoliatai iš tauriojo elnio pagal 18S rRNR geną buvo identiški tarpusavyje bei taip pat sutapo, lyginant su *S. hjorti* sekomis. Morfologiškai ištyrus iš tauriojo elnio dvejų skirtingų individų išskirtas sarkosporidijas, jos buvo priskirtos *S. grueneri-like* tipui, o nustatčius 18S rRNR geno sekas tirtieji izoliatai tarpusavyje skyrėsi 0,2%. Tuo tarpu *S. grueneri-like* sekų identiškumas su *S. grueneri* iš šiaurinio elnio siekė tik 96,3%, o tai parodo, jog tirtieji izoliatai nepriklauso *S. grueneri*. Lyginant 18S rRNR geno sekas, *S. grueneri-like* skyrėsi nuo visų kitų *Sarcocystis* rūšių daugiau kaip 3,5%. *S. grueneri-like* negali būti priskiriama nei vienai sarkosporidijų rūšiai, kuriai nustatytos 18S rRNR geno sekos, todėl *S. grueneri-like* laikinai įvardinta *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*, nesuteikiant specifinio rūšies pavadinimo dėl sarkocistų sienelės ultrastruktūros tyrimų trūkumo. Apibendrinant, analizuojant 18S rRNR geno sekas tirtuose medžiojamuosiuose žinduoliuose identifikuotos aštuonios *Sarcocystis* rūšys: stirnose – *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *S. hofmanni-like1*, *S. hofmanni-like2*, *S. oviformis*; šernuose – *S. miescheriana*; tauriuosiuose elniuose – *S. hjorti*, *S. hofmanni-like2*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*; briedžiuose – *S. hjorti*, iš kurių *S. hjorti* ir *S. oviformis* Lietuvoje aptiktos pirmą kartą. Dvi sarkosporidijų rūšys: *S. hjorti* ir *S. hofmanni-like2* aptiktos dvejų skirtingų tarpinių šeimininkų rūšyse.

Laukiniuose žinduoliuose rastų sarkosporidijų vidurūšinė genetinė įvairovė analizuojant 18S rRNR geno sekas buvo nedidelė, o sekų skirtumai buvo mažesni negu 0,4% (8 lentelė). Skirtingos sekos tarp tirtųjų izoliatų aptiktos tik *S. hofmanni-like2* ir *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* rūšims. Tuo tarpu *Sarcocystis* parazitų iš analizuotų žinduolių tarprūšiniai skirtumai

svyravo nuo 87,3% (*S. oviformis* lyginant su *S. capreolicanis*) iki 96,9% (*S. hjorti* lyginant su *S. capreolicanis*). *S. oviformis* ir *S. miescheriana* rūšys pasižymėjo mažiausiai panašiomis sekomis, lyginant su kitomis tirtomis sarkosporidijų rūšimis. Poriniuose sekų sulyginimuose mažiausias bendras nukleotidų skirtumas, įskaičiuojant ir tarpus, buvo 58, kuris užfiksuotas tarp *S. hjorti* ir *S. capreolicanis*.

8 lentelė. Medžiojamosiuose žinduoliuose aptiktų *Sarcocystis* rūšių genetinis panašumas artimiausioms rūšims (išskirtos paryškintu šriftu), nustatytas lyginant 18S rRNR geno sekas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>S. miescheriana</i>	100 (4)	171 [110]	176 [122]	206 [147]	159 [124]	173 [131]	226 [141]	177 [120]
2 <i>S. hjorti</i>	91,1	100 (3)	58 (30)	111 [79]	130 [90]	148 [105]	236 [165]	79 [48]
3 <i>S. capreolicanis</i>	91,0	96,9	100 (2)	123 [93]	132 [90]	157 [107]	248 [171]	105 [74]
4 <i>S. gracilis</i>	89,6	94,2	93,7	100 (6)	151 [106]	180 [131]	233 [155]	121 [80]
5 <i>S. hofmanni-like1</i>	91,7	93,1	93,1	92,2	100 (3)	74 (41)	217 [153]	131 [84]
6 <i>S. hofmanni-like2</i>	91,1	92,2	91,8	90,7	96,0	99,7– 99,9 (8)	237 [168]	136 [79]
7 <i>S. oviformis</i>	88,5	87,9	87,3	88,2	88,7	87,8	– (1)	211 [135]
8 <i>S. sp. ex Cervus elaphus</i>	90,9	95,8	94,5	93,7	93,1	92,8	89,1	99,8 (2)

Pajuodinti skaičiai įstrižainėje parodo vidurūšinio sekų identiškumo procentines vertes, apvaliuose skliaustuose – tirtų izoliatų skaičius. Tarprūšinio sekų identiškumo procentinės vertės po įstrižaine. Pirmas skaičius virš įstrižainės nurodo bendrą nukleotidų skirtumą, gautą sulyginus dvi sekas, laužtiniuose skliaustuose – tarpų skaičius.

Pagal 18S rRNR geno sekas *S. miescheriana* artimiausia *S. sui hominis* iš kiaulės bei *S. hirsuta* ir *S. buffalonis* rūšims iš naminių galvijų. (9 lentelė). Sarkosporidijų rūšys iš stirnos, tauriojo elnio ir briedžio buvo genetiškai panašiausios *Sarcocystis* rūšims iš elninių. *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* giminiausias *Sarcocystis* rūšims, kurių galutiniai šeiminkai - šuninių šeimos plėšrūnai. *S. oviformis* pasižymėjo didžiausiomis sekų identiškumo vertėmis lyginant su pagal sarkocistos morfologiją neatskiriamomis *S. ovalis* ir *S. hardangeri* rūšimis. Dvi

rūšys įvardintos kaip *S. hofmanni*-like buvo genetiškai artimiausios *S. tarandi*, *S. rangiferi* ir rūšies pavadinimo neturinčiai *Sarcocystis* sp. iš dėmėtojo elnio. Nustatyti tiriamųjų sarkosporidijų genetiniai skirtumai, lyginant su artimiausia rūšimi, svyravo nuo 1 iki 4%.

Pagal 18S rRNR geno sekas *S. miescheriana* artimiausia *S. sui hominis* iš kiaulės bei *S. hirsuta*, ir *S. buffalonis* rūšims iš naminių galvijų. (9 lentelė). Sarkosporidijų rūšys iš stirnos, tauriojo elnio ir briedžio buvo genetiškai panašiausios *Sarcocystis* rūšims iš elninių. *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* giminingiausios *Sarcocystis* rūšims, kurių galutiniai šeiminkai šuninių šeimos plėšrūnai. *S. oviformis* pasižymėjo didžiausiomis sekų identiškumo vertėmis lyginant su pagal sarkocistos morfologiją neatskiriamomis *S. ovalis* ir *S. hardangeri* rūšimis. Dvi rūšys įvardintos kaip *S. hofmanni*-like buvo genetiškai artimiausios *S. tarandi*, *S. rangiferi* ir rūšies pavadinimo neturinčiai *Sarcocystis* sp. iš dėmėtojo elnio. Tiriamoms sarkosporidijoms su artimiausia rūšimi nustatyti skirtumai svyravo nuo 1 iki 4%.

9 lentelė. Genetiškai artimiausios rūšys medžiojamuosiuose žinduoliuose aptiktoms *Sarcocystis* rūšims (išskirtos paryškintu šriftu), lyginant 18S rRNR geno sekas.

<i>S. miescheriana</i>	<i>S. sui hominis</i> 97,3	<i>S. hirsuta</i> 93,8	<i>S. buffalonis</i> 93,5
<i>S. hjorti</i>	<i>S. rangi</i> 98,1	<i>S. cruzi</i> 97,7	<i>S. alceslatrans</i> 97,7
<i>S. capreolicanis</i>	<i>S. rangi</i> 97,5	<i>S. alceslatrans</i> 97,5	<i>S. hjorti</i> 96,9
<i>S. gracilis</i>	<i>S. alces</i> 96,0	<i>S. capracanis</i> 95,8%	<i>S. grueneri</i> 95,1
<i>S. hofmanni-like1</i>	<i>S. sp. ex Cervus nippon</i> 99,0	<i>S. tarandi</i> 98,9	<i>S. rangiferi</i> 98,7
<i>S. hofmanni-like2</i>	<i>S. hofmanni-like1</i> 96,0	<i>S. tarandi</i> 95,9	<i>S. rangiferi</i> 95,8
<i>S. oviformis</i>	<i>S. ovalis</i> 97,4	<i>S. hardangeri</i> 96,6	<i>S. scandinavica</i> 90,1
<i>S. sp. ex Cervus elaphus</i>	<i>S. rangi</i> 96,5	<i>S. grueneri</i> 96,3	<i>S. hjorti</i> 95,8

Skaičiai pažymi sekų identiškumo procentines vertes.

Šiame darbe analizuojamoms žinduolių sarkosporidijų rūšims užfiksuoti mažiausi tarprūšiniai skirtumai (1%) buvo didesni už vidurūšinius skirtumus (< 0,4%), nustatytus lyginant tiriamųjų rūšių skirtingus izoliatus. *S. hofmanni-like1* pasižymėjo labai aukštomis sekų identiškumo vertėmis (98,7–99,0%),

lyginant su trimis artimiausiomis *Sarcocystis* rūšimis. *S. hofmanni-like2* ir *S. gracilis* rūšys pasižymėjo didžiausiais sekų skirtumais artimiausioms rūšims.

Tiriant paukščių sarkosporidijas, šiame darbe gauti 1765–1795bp ilgio 18S rRNR geno fragmentai, 1409–1510bp ilgio 28S rRNR geno fragmentai bei 832–942 ilgio ITS–1 regiono fragmentai. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anser albifrons* rūšiai pavyko amplifikuoti ir nusekvenuoti tik 18S rRNR ir 28S rRNR genų fragmentus. Vidurūšinės genetinės įvairovės pradiniam įvertinimui *S. rileyi*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* rūšims nustatytos tirtųjų genetinių žymenų sekos, priskiriamos vienos iš tirtųjų *sarcocystis* rūšių parazitams, išskirtiems iš dvejų skirtingų tos pačios šeimininko rūšies individų. To paties sarkocistų morfologinio tipo, išskirto iš tos pačios šeimininko rūšies, bet dvejų skirtingų individų, 18S rRNR ir 28S rRNR genų sekos buvo vienodos, o genetiniai skirtumai pastebėti tik lyginant ITS–1 regiono sekas. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* dvejų izoliuotų sekos skyrėsi dviem pakaitomis, *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons* – trim pakaitomis, *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix*, atitinkamai, skyrėsi vieno nukleotido inercija ar delecija. Tuo tarpu *S. rileyi* ir *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* rūšims genetinių skirtumų tarp dvejų izoliatų visai nenustatyta. Vertinant procentiškai, vidurūšinio sekų identiškumo vertės svyravo nuo 99,7 iki 100%.

Lyginant 18S ir 28S rRNR genų sekas (bendras fragmentų ilgis – 3082bp), *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus* tirtosios sekos buvo genetiškai identiškos *S. columbae*, išskirtos iš keršulio, homologinėms sekoms. Pagal ITS–1 regioną, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus* sekų identiškumas su *S. columbae* siekė 99,9%. Remiantis DNR tyrimų rezultatais Lietuvoje keršuliuose pirmą kartą identifikuota *Sarcocystis* rūšis – *S. columbae*.

Šiame darbe, remiantis morfologiniais tyrimais, didžiojoje antyje nustatyta *S. rileyi* genetiškai skyrėsi nuo *S. rileyi*, identifikuotos didžiojoje

antyje JAV, tik vienu nukleotidu, kai buvo sulyginotos ITS–1 regiono sekos. Tai pirmas genetiškai patvirtintas *S. rileyi* infekcijos atvejis Europoje.

Visos kitos iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų, išskirtos sarkosporidijų rūšys genetiškai charakterizuotos pirmą kartą. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* 18S ir 28S rRNR genų sekos buvo vienodos. Lyginant *Sarcocystis* parazitų izoliatų, pasižyminčių pirmu morfologiniu cistos sienelės tipu iš baltaskruostės berniškės, didžiosios anties ir sidabrinio kiro ITS–1 regiono sekas, sekų identiškumo vertės svyravo nuo 99,8 iki 100%. DNR tyrimų rezultatai parodo, jog šios sarkosporidijos iš trijų skirtingų tarpinių šeimininkų priklauso vienai rūšiai.

10 lentelė. Paukščių sarkosporidijų 18S/28S rRNR genų (žemiau diagonalės) bei ITS–1 regiono (virš diagonalės) sekų identiškumo procentinės vertės.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>S. anasi</i>	***	90,8	43,6	45,3	45,3	72,9	45,0	45,0	45,1	46,1
2 <i>S. albifrons</i>	99,7/ 99,2	***	47,3	45,1	45,1	70,7	46,6	46,6	42,9	45,4
3 <i>S. calchasi</i>	99,4/ 96,1	99,3/ 96,1	***	82,8	79,1	44,5	93,0	93,0	73,6	82,0
4 <i>S. columbae</i>	99,3/ 95,7	99,3/ 95,7	99,9/ 98,7	***	77,5	45,2	81,9	81,9	72,2	93,6
5 <i>S. cornixi</i>	99,1/ 95,2	99,0/ 95,4	99,6/ 98,6	99,6/ 98,4	***	45,1	79,4	79,4	77,1	77,2
6 <i>S. rileyi</i>	99,4/ 97,3	99,5/ 97,3	99,4/ 95,9	99,4/ 95,7	99,1/ 95,0	***	44,7	44,7	45,1	44,5
7 <i>S. wobeseri</i>	99,4/ 95,9	99,3/ 95,9	100/ 99,6	99,9/ 99,2	99,6/ 98,7	99,4/ 95,6	***	99,9	73,7	82,2
8 <i>S. wobeseri-like</i>	99,4/ 95,9	99,3/ 95,9	100/ 99,6	99,9/ 99,2	99,6/ 98,7	99,4/ 95,6	100/ 100	***	73,7	82,2
9 <i>S. sp. ex Accipiter nisus</i>	99,4/ 95,7	99,3/ 95,7	99,9/ 98,7	99,8/ 98,8	99,6/ 99,0	99,4/ 95,5	99,9/ 99,0	99,9/ 99,0	***	71,4
10 <i>S. sp. ex Corvus monedula</i>	99,3 95,6	99,2 95,6	99,9 99,2	99,9 99,7	99,3 98,4	99,3 95,6	99,9 99,3	99,9 99,3	99,8 99,0	***

Sarcocystis sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* įvardinta *S. anasi*; *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons* įvardinta *S. albifrons*; *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* įvardinta *S. cornixi*; *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* įvardinta *S. wobeseri*; *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* įvardinta *S. wobeseri-like*.

Analizuotos *Sarcocystis* spp. pasižymėjo didžiausiais sekų panašumais su *Sarcocystis* rūšimis, kurių tarpiniai šeimnininkai – paukščiai, taip pat pažymėtinas tirtųjų rūšių genetinis panašumas su *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, kurios galutinis šeimnininkas yra paukštvanagis, o tarpinis šeimnininkas – nežinomas. *Sarcocystis* rūšių iš paukščių 18S rRNR geno sekų identiškumo skirtumai buvo labai nedideli ir neviršijo 1% (10 lentelė). *S. calchasi* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) iš baltaskruostės berniklės, didžiosios anties, baltakaktės žąsies ir sidabrinio kiro 18S rRNR geno sekos sutapo. Dėl nedidelio 18S rRNR geno sekų kintamumo, kai lyginamos *Sarcocystis* rūšys iš paukščių, buvo būtina pasirinkti labiau informatyvų genetinį žymenį, todėl toliau analizuotas 28S rRNR geno variabilus fragmentas. Analizuotų rūšių 28S rRNR geno sekų identiškumo reikšmės buvo mažesnės (95,2–99,7%), lyginant su 18S rRNR genu. Pagal 28S rRNR geną genetiškai artimiausios buvo *S. columbae* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*. Nors paukščių *Sarcocystis* rūšių vidurūšinių skirtumų, lyginant 28S rRNR geno sekas, iki šiol nebuvo nustatyta, tačiau tarprūšiniai skirtumai daugeliu atvejų buvo nedideli.

Siekiant pasirinkti didesnės skiriamosios gebos molekulinį žymenį tirtų paukščių *Sarcocystis* rūšių molekuliniam identifikavimui naudotas labai variabilus ITS–1 regionas. Lyginant tirtų sarkosporidijų rūšių ITS–1 regiono sekas, nustatytas labai didelis sekų variabilumas, o sekų identiškumas, daugeliu atvejų, nesiekė 50%. Didžiausios ITS–1 regiono sekų identiškumo reikšmės, viršijančios 90%, apskaičiuotos tarp *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* ir *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*; *S. calchasi* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) iš baltaskruostės berniklės, didžiosios anties, baltakaktės žąsies, sidabrinio kiro; *S. columbae* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* rūšių porų. Mažiausias nustatytas tarprūšinis sekų identiškumo skirtumas buvo 6,4%.

Remiantis DNR tyrimų rezultatais, gautais analizuojant 18S ir 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono sekas, šiame darbe pirmą kartą genetiškai charakterizuotos penkios paukščių *Sarcocystis* rūšys. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*, *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas*

platyrhynchos, *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* vertintinos kaip keturios skirtingos rūšys, o penktai rūšiai priskirtina *Sarcocystis* sp., pasižyminti I morfologiniu cistos tipu, buvo išskirta iš baltaskruostės berniklės, didžiosios anties ir sidabrinio kiro.

4.5. Naujų *Sarcocystis* rūšių aprašymas

Remiantis cistų sienelės ultrastruktūros tyrimų ir DNR analizės, naudojant 18S rRNR, 28S rRNR, ITS–1 žymenis rezultatais, buvo aprašytos keturios naujos *Sarcocystis* rūšys, sudarančios cistas paukščių raumenyse. *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, įvardinta *Sarcocystis albifronsi*; *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, įvardintos *Sarcocystis wobeseri*; *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, įvardinta *Sarcocystis anasi*; *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix*, įvardinta *Sarcocystis cornixi*. Pagal genetinius ir morfologinius tyrimų rezultatus, *Sarcocystis* sp., išskirta iš sidabrinio kiro (Charadriiformes būrys), nesiskyrė nuo *S. wobeseri*, kurios tarpiniai šeimininkai – baltaskruostė berniklė ir didžioji antis (Anseriformes būrys). Iki šiol buvo žinomos tik dvi sarkosporidijų rūšys (*S. neurona* ir *S. falcatula*), kurių tarpiniai šeimininkai priklausytų skirtingiems būriams ar aukštesniems taksoniniams rangams. Dėl minėtos priežasties, kol neatlikti kryžminiai užkrėtimo eksperimentai, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pavadinta *S. wobeseri*-like. Žemiau pateikiamos trumpos taksonominės santraukos, skirtos šiame darbe aprašytoms naujoms *Sarcocystis* rūšims, kurioms suteikti lotyniški pavadinimai.

Sarcocystis albifronsi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Tipinis tarpinis šeimininkas: baltakaktė žąsis (*Anser albifrons*).

Galutinis šeimininkas: vienas iš galutinių šeimininkų – poliarinė lapė (*Alopex lagopus*).

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU502868 (18S rDNR); EF079885 (28S rDNR); JF520780, JN256122 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga ir histologiniai preparatai saugomi Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: baltakaktės žąsies lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

Sarcocystis wobeseri Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2010

Tipinis tarpinis šeimininkas: baltaskruostė berniklė (*Branta leucopsis*). Kitas tarpinis šeimininkas – didžioji antis (*Anas platyrhynchos*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: GQ922885, GQ922886 (18S rDNR); GQ922887, GQ922888 (28S rDNR); GU475111, GU475112, JN256121 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga saugoma Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: rūšis pavadinta veterinarinės patologijos tyrimais pasižymėjusio Kanados mokslininko Gary Wobeser garbei, kuris pirmasis žąsyse surado sarkocistas turinčias 1 sienelės tipą.

Sarcocystis anasi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Tipinis tarpinis šeimininkas: didžioji antis (*Anas platyrhynchos*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU553477 (18S rDNR); EF079887 (28S rDNR); JF520779 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga saugoma Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: Plaukiojančių ančių genties lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

Sarcocystis cornixi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2009

Tipinis tarpinis šeimininkas: varna (*Corvus cornix*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU553478 (18S rDNR); EF079884 (28S rDNR); JF520781, JN256120 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga ir histologiniai preparatai saugomi Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: varnos lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

4.6. *Sarcocystis* rūšių filogenetinių tyrimų rezultatai

Filogenetinio *Sarcocystis* genties rūšių tyrimo metu atlikti trijų skirtingų DNR fragmentų homologinių sekų sulyginimai: 18S rRNR geno, 28S rRNR geno ir ITS–1 regiono. 18S rRNR geno filogenetinėje analizėje panaudotos sekos, apimančios daugiau kaip 85% viso geno, mažiausias į analizę įtrauktos *S. gallotiae* sekos ilgis siekė 1591bp. 28S rRNR geno filogenetinėje analizėje tirtos sekos, kurių sudėtyje yra dideliu kintamumu šiame gene pasižymintys D2 ir D3 domenai. Tais atvejais, kai buvo nustatyta daugiau negu po vieną 18S rRNR geno seką, priskiriamą tai pačiai *Sarcocystis* rūšiai, konstruojant filogenetinius medžius panaudota ta seka, kuri buvo artimiausia teorinei vienodžiausiai sekai (tokios sekos 7 lentelėje pateikiamos pirmos). 18S rRNR geno sekų sulyginimas atliktas panaudojus 55 taksonų, priskiriamų skirtingoms rūšims, sekas, kurias sudarė 1858 nukleotidų pozicijos, įskaičiuojant ir tarpus.

28S rRNR geno sekų sulyginimas atliktas panaudojus 23 sarkosporidijų rūšių sekas, kurių ilgis 1625 nukleotidų pozicijos su trapais. ITS–1 regiono sekų sulyginimą sudarė 44 taksonai ir 709 pozicijos, įskaičiuojant ir tarpus. ITS–1 regiono filogenetinėje analizėje į tiriamąją grupę įtrauktos Genų banke prieinamos tos pačios rūšies skirtingų izoliatų sekos.

Filogenetiniame medyje, sudarytame panaudojus 18S rRNR geno sekas, išskirtos keturios filogenetinės grupės (I, II, III, IV), kurių buvimą paremia aukštos tikimybinės vertės (19 pav.). Daugiausia analizuotų sarkosporidijų rūšių, kurių tarpiniai šeimininkai yra porakanopiai žinduoliai, išsidėsto IV filogenetinio medžio grupėje (20 pav.). Ši grupė suskaidyta į tris smulkesnes (IVA, IVB, IVC) pagal galutinius šeimininkus nors IVB bei IVC išsiskyrimą paremia žema (0.61) tikimybinė reikšmė. Į IVB grupę patenka tik tos *Sarcocystis* rūšys, kurių galutiniai šeimininkai yra katinių šeimos plėšrūnai, IVC grupę formuoja *Sarcocystis* rūšys, kurių galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai, iš IVA grupę sudarančių trijų *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas nustatytas tik *S. ovalis* rūšiai, jos galutiniu šeimininku tarnauja paukščiai. *S. aucheniae* patikimai nesigrupavo su kitoms porakanopių sarkosporidijomis. *S. aucheniae*, *S. miescheriana*, *S. scandinavica* sekos pasižymėjo didesniais tarprūšiais skirtumais lyginant su kitomis porakanopių *Sarcocystis* rūšimis, todėl jas buvo sunku sulyginti ir šių rūšių filogenetinė padėtis gali būti netiksli. *Sarcocystis* rūšys, pasižyminčios „graužikai–gyvatės“ gyvybiniu ciklu, formuoja III grupę, o *Sarcocystis* rūšys, pasižyminčios „graužikai–katinių šeimos“ plėšrūnai gyvybiniu ciklu, apjungiamos II grupėje. 15 *Sarcocystis* rūšių ir du Frenkelia genties atstovai priskirti I filogramos grupei. 18S rRNR žymens skiriamoji raiška pasirodė esanti nepakankama, siekiant daryti patikimas išvadas apie filogenetinius ryšius tarp I grupės rūšių. Užfiksuotos aukštos tikimybinės vertės paremiančios tik *S. gallotiae* ir *S. lacertae*, *S. anasi* ir *S. albifronsi* rūšių porų grupavimąsi bei *S. rileyi* grupavimąsi su *S. anasi*, *S. albifronsi* šaka. Tuo tarpu kitų rūšių filogenetinius ryšius sunku įvertinti. Visos *Sarcocystis* rūšys, kurių tarpiniai ar galutiniai šeimininkai yra paukščiai, pateko į pirmą grupę, todėl, siekiant nustatyti tirtų

paukščių sarkosporidijų filogenetinius ryšius, papildomai panaudota 28S rRNR geno ir ITS–1 regiono filogenetinė analizė.

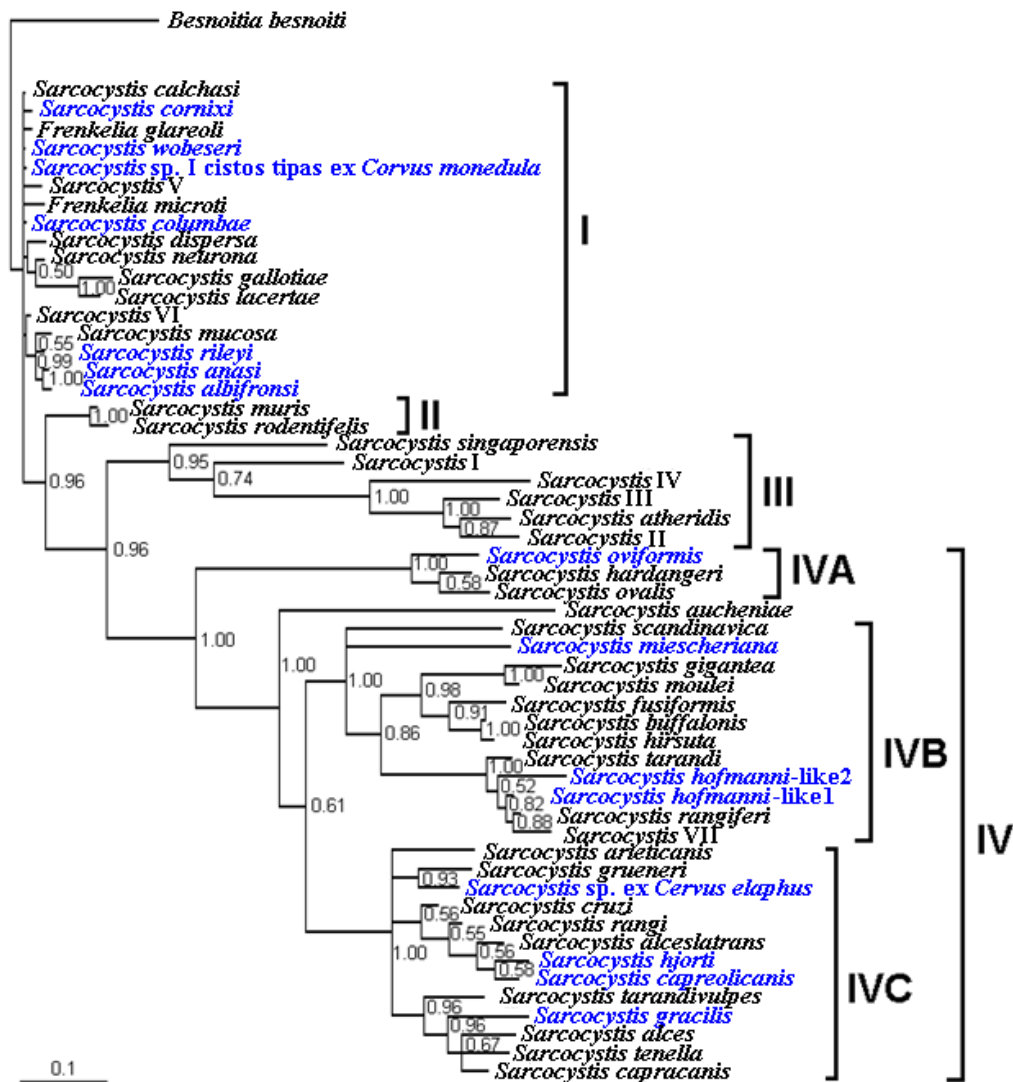
Tirtosios aštuonios *Sarcocystis* rūšys, išskirtos iš medžiojamųjų porakanopių žinduolių, buvo išskaidytos į tris filogenetines grupes. *S. oviformis* iš stirnos grupavosi su *S. ovalis* ir *S. hardangeri*. Minėtosios trys rūšys pasižymi labai panašia, sunkiai atskiriama sarkocistų morfologija, be to, jų sarkocistos aptiktos tik elninių šeimos rūšyse. *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* filogenetiškai artimiausios porakanopių *Sarcocystis* rūšims, kurių galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai. *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* iš tauriojo elnio grupavimasi su *S. grueneri* iš šiaurinio elnio paremia aukšta tikimybinė vertė (0.98). *S. capreolicanis* iš stirnos apjungiama su *S. hjorti* iš tauriojo elnio ir briedžio, tačiau tokį rūšių išsidėstymą paremia žema (0.58) tikimybinė reikšmė. Morfologiškai *S. capreolicanis* ir *S. hjorti* nėra atskiriamos šviesiniu mikroskopu analizuojant šių rūšių sarkocistų struktūrą. Pagal 18S rRNR filogramą *S. gracilis* artimiausia *S. tarandivulpes*, išskirtai iš šiaurinio elnio, *S. alces* – iš briedžio, *S. tenella* – iš ožkos ir *S. capracanis* – iš avies. *S. hofmanni-like1* – iš stirnos ir *S. hofmanni-like2* – iš stirnos bei tauriojo elnio yra apjungiamos IVB grupėje kartu su sarkosporidijų rūšimis, pasižyminčiomis „porakanopiai žinduoliai–katinių šeimos plėšrūnai“ gyvybiniu ciklu. *S. hofmanni-like1* ir *S. hofmanni-like2* filogenetiškai artimiausios sarkosporidjoms, kurių tarpiniai šeimininkai – elniai: *S. tarandi*, *S. rangiferi* (parazituoja tauriuosiuose ir šiauriniuose elniuose), *Sarcocystis* sp. VI (parazituoja dėmėtuose elniuose).

28S rRNR geno sekų filogenetiniame medyje išryškėja paukščių *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai ryšiai, paremti aukštomis šakų grupavimosi reikšmėmis (21 pav.). Analogiškai, kaip ir 18S rRNR geno sekų filogramoje, *S. anasi*, *S. albifronsi* ir *S. rileyi* apjungiamos į vieną filogenetinę grupę. *S. cornixi*, *S. columbae*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* sudaro vieną filogenetinę grupę kartu su *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* ir dviem *Frenkelia* genties rūšimis. Šiame klasteryje

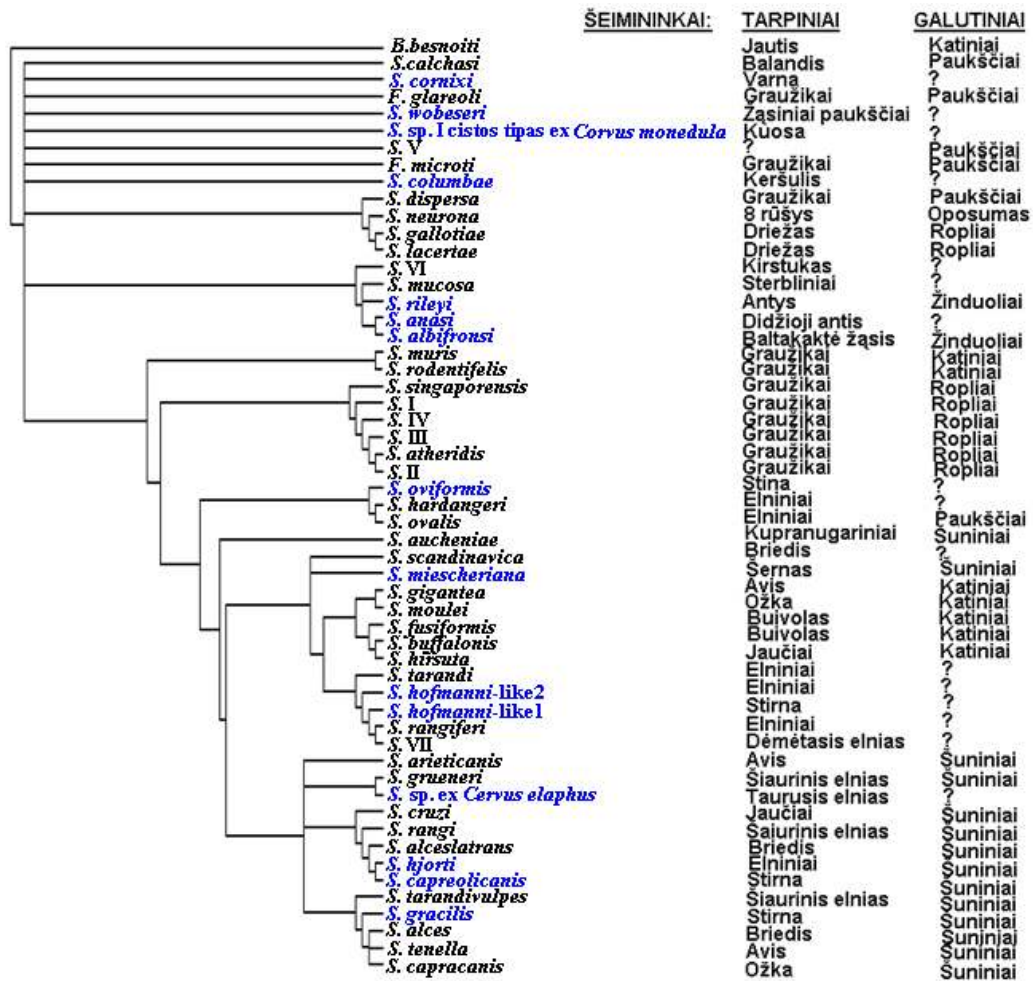
suporuojamos *Frenkelia* genties abejos rūšys, *S. cornixi* su *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *S. calchasi* su *S. wobeseri*, *S. columbae* su *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*. Pažymėtina, kad *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *F. glareoli*, *F. microti* galutiniai šeimininkai – plėšrieji paukščiai, o *S. rileyi* ir *S. albifronsi* galutiniai šeimininkai – plėšrieji žinduoliai. Paukščių sarkosporidijų rūšys filogenetiniame medyje atsiskiria į dvi grupes pagal galutinius šeimininkus, atitinkamai, paukščius ar žinduolius. Taip pat pastebėtas kitų *Sarcocystis* rūšių grupavimasis filogenetiniame medyje pagal parazito gyvybinį ciklą. *S. singaporensis*, *S. zamani* patenka į 18S rRNR geno sekų filogramoje išskirtą III grupę, kuriai būdingas „graužikai–gyvatės“ gyvybinis ciklas; *S. muris* patenka į 18S rRNR geno sekų filogramoje išskirtą II grupę, kuriai būdingas „graužikai–katinių šeimos plėšrūnai“ gyvybinis ciklas; *S. gigantea*, *S. moulei* patenka į 18S rRNR geno sekų filogramoje išskirtą IVB grupę, kurios gyvybinis ciklas – „porakanopiai žinduoliai–katinių šeimos plėšrūnai“; *S. cruzi*, *S. capracanis*, *S. arieticanis*, *S. tenella* patenka į 18S rRNR geno sekų filogramoje išskirtą IVC grupę, kurios gyvybinis ciklas – „porakanopiai žinduoliai–šuninių šeimos plėšrūnai“. *S. miescheriana* formavo atskirą šaką filogramoje bei patikimai nesigrupavo su *S. gigantea*, *S. moulei* ir *S. cruzi*, *S. capracanis*, *S. arieticanis*, *S. tenella* klasteriais.

ITS–1 regiono paukščių *Sarcocystis* rūšių bei joms giminingiausių rūšių filogenetiniame medyje atsiskleidžia ne tik tarprūšiniai, bet ir vidurūšiniai skirtumai (22 pav.). Gautus duomenis reikėtų vertinti atsargiai, nes tiriamosios grupės skirtingų rūšių sekos labai skyrėsi viena nuo kitos, dėl to šių sekų sulyginimo tikslumas abejotinas, tačiau buvo aptikti tam tikri dėsningumai. *S. wobeseri*, *S. columbae*, *S. cornixi*, *S. rileyi*, *S. albifronsi*, *S. neurona* vidurūšinė įvairovė buvo nežymi ir mažesnė, lyginant su *S. falcatula*. Nustatyta tam tikra genetinė struktūra *S. falcatula* rūšies viduje – pirmą klasterį sudaro AF098242, AY082638, AY082639 sekos, o antrasis klasteris apjungia AF098243–AF098246 sekas. Nepaisant pastebimos *S. falcatula* genetinės įvairovės rūšies viduje, analizuojant ITS–1 regiono sekas, skirtingi šios rūšies izoliatai patikimai susigrupavo. *S. anasi*, *S. albifronsi* ir *S. rileyi* apsijungė su per

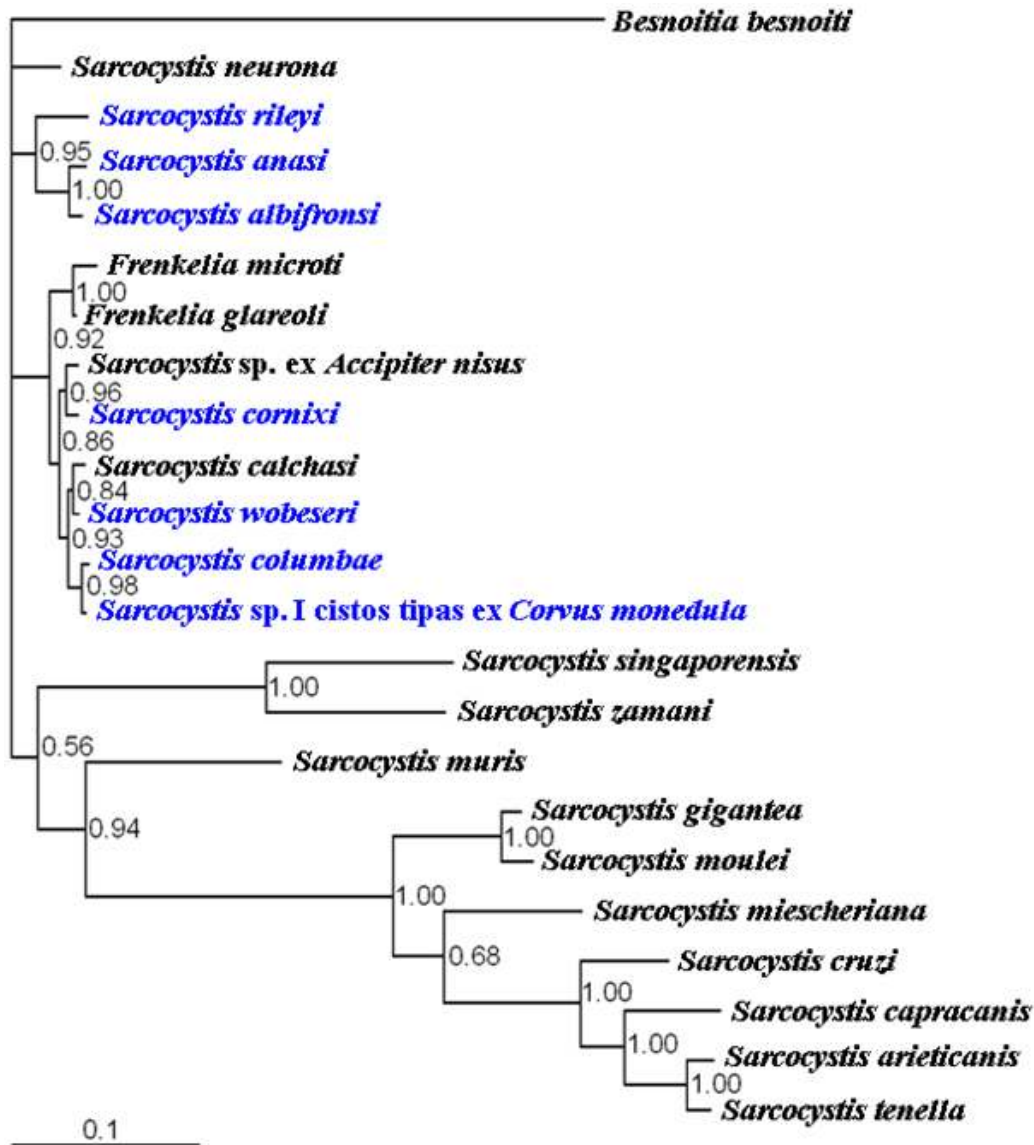
oposumą, kaip galutinį šeimininką, plintančiomis *S. lindsayi* Dubey, Rosenthal, Speer, 2001, *S. neurona*, *S. falcatula* rūšimis. Evoliuciškai tolimiausia nagrinėjamos rūšims buvo *S. lindsayi*. Analogiškai, kaip ir 28S rRNR geno sekų filogenetiniame medyje, ITS–1 regiono filogramoje nustatytos tos pačios šakų susigrupavimo poros: *S. calchasi* ir *S. wobeseri*, *S. cornixi* ir *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *S. columbae* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*. Išvardintos rūšys buvo artimai giminingos *S. kalvikus* Dubey, Reichard, Torretti, Garvon, Sundar, Grigg, 2010, *S. canis*, *S. felis* grupės rūšims, kurios sudaro sarkocistas plėšriuosiuose žinduoliuose, tačiau jų bendras grupavimasis nebuvo paremtas aukštomis šakų grupavimosi vertėmis.



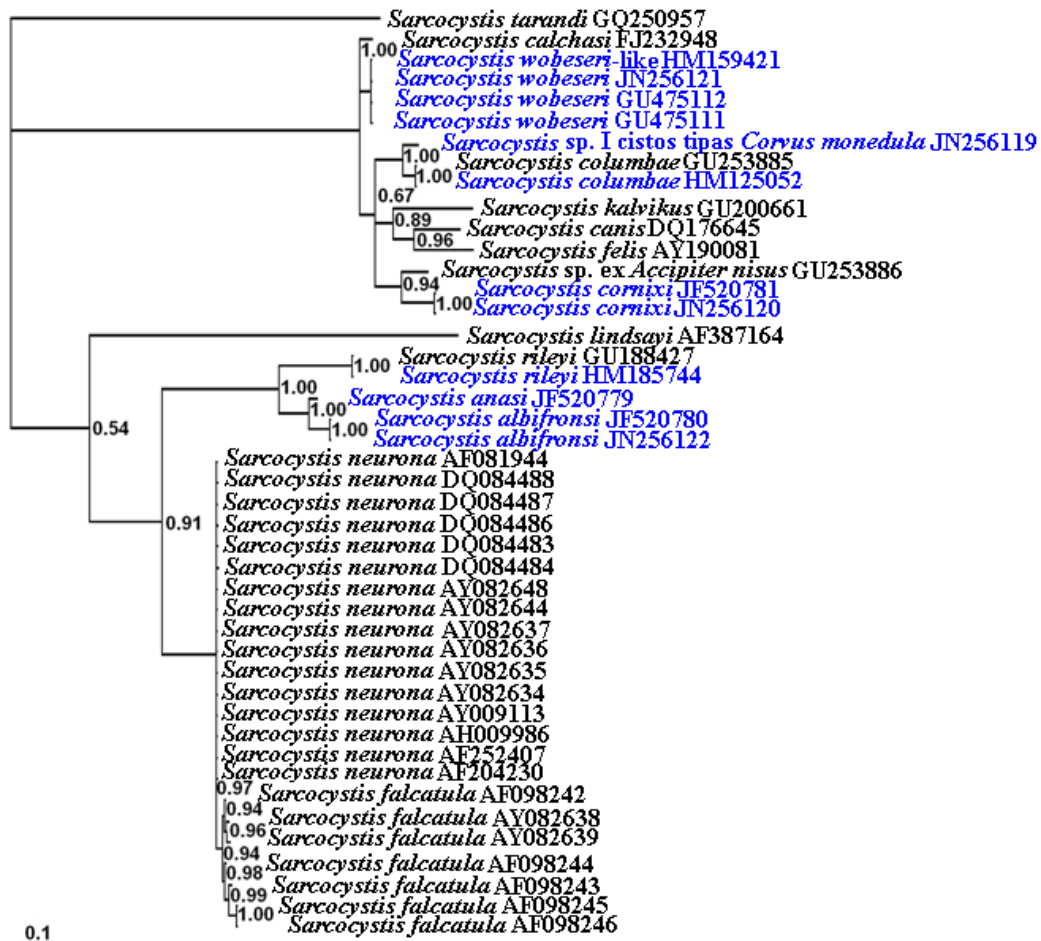
19 pav. 18S rRNR geno *Sarcocystis* genties rūšių filograma. Filogenetinis medis sukonstruotas naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *Besnoitia besnoiti*. Šakų ilgiai proporcingi evoliuciniam sekų nukleotidų pakitimų mastui. Skaičiai parodo tikimybinės vertes, paremiančias atitinkamą šakų susigrupavimą. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys. Filogramoje išskirtos keturios filogenetinės grupės (I-IV), ketvirtoji suskaidyta į tris smulkesnes (IVA, IVB, IVC).



20 pav. 18S rRNR geno *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinių ryšių dendrograma su nurodytais parazitinio taksono tarpiniais ir galutiniais šeiminkais. Filogenetinė analizė atlikta naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *Besnoitia besnoiti*. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys.



21 pav. 28S rRNR geno *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinis medis. Filogenetinis medis nubraižytas naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *Besnoitia besnoiti*. Šakų ilgai proporcingi evoliuciniam sekų nukleotidų pakitimų mastui. Skaičiai parodo tikimybinės vertės, paremiančias atitinkamą šakų susigrupavimą. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys.



22 pav. ITS–1 regiono *Sarcocystis* rūšių filogenetinis medis. Filogenetinis medis nubraižytas naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *S. tarandi*. Šakų ilgiai proporcingi evoliuciniam sekų nukleotidų pakeitimų mastui. Skaičiai parodo tikimybinės vertės, paremiančias atitinkamą šakų susigrupavimą. Po rūšies pavadinimu pateikti Genų banko identifikavimo numeriai. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys.

4.7. Rezultatų apibendrinimas

Lietuvoje sarkosporidijų infekcijos tyrimai paukščiuose iki šiol buvo labai fragmentiški (Grikienienė, Iezhova, 1998), o išsamiausiai tirti tik žąsinių būrio paukščiai, sarkocistos aptiktos penkiolikoje šio būrio paukščių rūšių (Kutkienė, Sruoga, 2004). Šiame darbe, ieškant *Sarcocystis* parazitų cistų, analizuoti 22 rūšių paukščių kaklo, kojos ir krūtinės raumenų pavyzdžiai. Iš tirtųjų rūšių 14 priklauso žąsiniams paukščiams, šešios – varniniams, po vieną rūšį – sėjikiniams ir karveliniams paukščiams. Sarkocistos pirmą kartą Lietuvoje aptiktos varniniuose, karveliniuose ir sėjikiniuose paukščiuose (kove, kuosoje, varnoje, kėkšte, keršulyje, sidabriniam kire), bei dvejose žąsinių paukščių rūšyse – baltaskruostėje berniklėje ir pilkojoje žąsyje. Sarkocistų nerasta aštuoniose paukščių rūšyse, kurių tirta tik po kelis individus. Nustatytas vidutinis 27,6% *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas paukščiuose, tačiau kai kuriose rūšyse sarkocistų greičiausiai neaptikta dėl nepakankamos imties. Apibendrinant galima teigti, kad tirtų medžiojamų paukščių grupėje sarkosporidijų infekcija yra neatsitiktinis reiškinys.

Vertinant *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo parametrus varnoje, baltakaktėje žąsyje ir didžiojoje antyje, patikimai mažesnis ekstensyvumas nustatytas didžiojoje antyje, bei apskaičiuotas patikimai mažesnis intensyvumas, didžiąją antį lyginant su varna. Makroskopinės sarkocistos dažniausiai aptinkamos krūtinės raumenyse (Chabreck ir kt., 1965), o šiame darbe analizuoti tik 20 didžiųjų ančių lavonėlių, kitais 110 atvejų tirti kaklo ar kojos raumenys, dėl to sarkocistos kai kuriais atvejais galėjo būti neaptiktos dėl metodinių tyrimo ypatumų. Didžiosiose antyse neaptiktos makrocistos galėjo būti mažesnio infekcijos ekstensyvumo, lyginant su fiksuotu varnose ir baltakaktėse žąsyse, priežastimi. Siekiant įvertinti ančių užsikrėtimo lygį *S. rileyi* Lietuvoje bei visoje Europoje, reikalingi plataus masto tyrimai skirtinguose žemyno regionuose apžiūrint paukščių krūtinės raumenis ir diferencijuojant paukščius pagal amžių, nes jaunikliuose užsikrėtimas sarkocistomis diagnozuojamas patikimai rečiau (Hoppe, 1976).

Drouin ir Mahrt (1979) teigia, jog *Sarcocystis* parazitų ekstensyvumo ir intensyvumo skirtumai atskirose rūšyse nėra atsitiktiniai ir priklauso nuo paukščio amžiaus, fiziologinių, elgsenos savybių, geografinių, ekologinių sąlygų, galutinių šeiminių gausumo. Kadangi daugeliu atvejų informacija apie paukščio amžių, lytį, geografinę padėtį buvo nepilna, priežastys, lėmusios *Sarcocystis* parazitų infekcijos parametrų skirtumus tirtose paukščių rūšyse detaliau nenagrinėjamos.

Literatūrinuose šaltiniuose, kuriuose minimos tos pačios paukščių rūšys kaip ir šiame darbe, daugeliu atvejų nurodomas 40% neviršijantis sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas tam tikroje paukščių rūšyje (Dylko, 1962; Chabreck ir kt., 1965; Hoppe, 1976; Drouin, Mahrt, 1979; Canaris ir kt., 1981; Pak, Eshtokina, 1984; Fedynich, Pense, 1992; Kutkienė, Sruoga, 2004). Šiame darbe fiksuotas 43,2% baltakakčių žasų sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas, varnų sarkosporidijų infekcijos ekstensyvumas siekė 35,9%, o didžiųjų ančių šis rodiklis siekė 20,0%. Gauti rezultatai yra panašūs į kitų autorių duomenimis.

Lietuvoje laukiniuose porakanopiuose anksčiau nustatytas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas svyravo nuo 80 iki 90%: 81 užsikrėtusių iš 101 tirtų, 80,2% (Kutkienė, Baleišis, 2001); 138 užsikrėtusių iš 160 tirtų, 86,3% (Malakauskas ir kt., 2001); 212 užsikrėtusių iš 243 tirtų 87,2% (Malakauskas, Grikienienė, 2002); 248 užsikrėtusių iš 275 tirtų, 90,2% (Grikienienė ir kt., 2001). Šiame darbe tirtuose medžiojamuosiuose žvėryse (briedžiuose, stirnose, šernuose, tauriuosiuose elniuose) registruotas 89,8% (159 užsikrėtusių iš 177 tirtų) *Sarcocystis* parazitais infekcijos ekstensyvumas. Šio tyrimo metu užfiksuotas labai panašus ekstensyvumas, lyginant su ankstesnių darbų rezultatais, o nedideli skirtumai galėjo atsirasti dėl nevienodos tam tikros rūšies proporcijos, imties skirtumų pagal amžių, lytį ir kitus veiksnius.

Nustatyti statistiškai patikimai didesni infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo rodikliai stirnose, lyginant su šernais ir tauriaisiais elniais. Ankstesniuose tyrimuose Lietuvoje taip pat buvo nustatytas patikimai

aukštesnis sarkosporidijų infekcijos intensyvumas stirnose negu briedžiuose, tauriuosiuose elniuose, dėmėtuose elniuose, šernuose (Grikienienė ir kt., 2001; Malakauskas ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002). Stirnų *Sarcocystis* parazitų infekcijos didelį intensyvumą galėjo sąlygoti šios rūšies didesnis gausumas lyginant su kitais laukiniais porakanopiais bei santykinai dažnesnis stirnų lankymas arti žmonių buveinių, kur didelė rizika užsikrėsti per šunų fekalijas paskleistomis sarkosporidijų oocistomis ir sporocistomis. Lyginant su ankstesniais tyrimais Lietuvoje, kai intensyvi sarkosporidijų infekcija stirnose nesiekė 30% (Malakauskas ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002), šiame tyrime nustatyta reikšmingai daugiau intensyvios *Sarcocystis* parazitų infekcijos atvejų, kurie sudarė net 75,6% nuo bendro tirtų gyvūnų skaičiaus. Kol kas sunku būtų pateikti pagrįstas prielaidas aiškinančias šį reiškinį. Pasigendama išsamių tyrimų, siekiant įvertinti sarkocistomis masiškai užkrėstos medžiojamų stambių žinduolių mėsos tinkamumą maistui. Dėl galimo pavojaus sunegaluoti, esant intensyviai *Sarcocystis* parazitų infekcijai, rekomenduotina valgyti tik termiškai apdorotą sumedžiotą žvėrieną (Schultze, 1988).

Užfiksuotas *Sarcocystis* parazitų 97,6% infekcijos ekstensyvumas stirnose, 88,2% – šernuose, 80,6% tauriuosiuose elniuose – vertintinas kaip labai aukštas. Europoje ir Šiaurės Amerikoje, daugeliu atvejų stirnose, šernuose ir tauriuosiuose elniuose taip pat nustatomas panašiai labai aukštas sarkosporidijų paplitimo mastas. Kai kuriais atvejais registruotas gerokai mažesnis infekcijos ekstensyvumas šernuose (24%, 48%) ir tauriuosiuose elniuose (65%) Vengrijoje, Ispanijoje, Lenkijoje (Navarette ir kt., 1978; Collins ir kt., 1980; Tropilo ir kt., 2001). *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo rodiklių skirtumus galėjo lemti naudoti skirtingi ekstensyvumo vertinimo metodai, tirtų gyvūnų variacija pagal amžių, raumenų grupę, tarpinių ir galutinių šeimininkų gausumą ir kitus veiksnius.

Reziumuojant, galima teigti, kad sarkosporidijų rūšys yra plačiai paplitusios Lietuvoje mėsai medžiojamuose paukščiuose ir žvėryse. Termiškai neapdorotos sumedžiotos mėsos nedavimas šunims ar kitiems naminiams

mėsėdžiams, galintiems platinti sarkosporidjas, yra pagrindinis nereikalaujantis didelių išlaidų prevencinis veiksmas sarkosporidijų infekcijos sumažinimui. Todėl rekomenduojama medžiotojams išsamiai susipažinti su *Sarcocystis* rūšių biologija, bei jų plitimo keliais. Pavyzdžiui, Lietuvos medžiotojams trūksta žinių apie makroskopines cistas didžiųjų ančių raumenyse ir dažniausiai sumedžiotos antys ruošiamos maistui nenulupus paukščių odos bei nepatikrinus ar mėsoje nėra plika akimi matomų sarkocistų.

Kutkienė ir Sruoga (2004), tirdami šviesiniu mikroskopu, žąsiniuose paukščiuose išskyrė keturis mikrocistų tipus. Autoriai konstatavo, jog I ir IV cistos tipų atskyrimas yra sudėtingas, tuo tarpu II ir III tipų cistos sienelės morfologijos ir cistozoitų formos skirtumai yra ryškūs. I tipo sarkocistos turėjo lygią cistos sienelę, o IV tipo sarkocistos pasižymėjo banguota cistos sienele, be to I ir IV cistos tipų cistozoitai forma ir dydžiu buvo labai panašūs. Šviesinės mikroskopijos rezultatai gali šiek tiek skirtis nuo elektroninės mikroskopijos rezultatų. Pavyzdžiui, šviesiniu mikroskopu sarkocistos, išskirtos iš klykuolės raumeninio audinio, sienelė atrodė lygi, o analizuojant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė buvo banguota (Kutkienė ir kt., 2008). Pagal šio tyrimo rezultatus, analizuojant elektroniniu mikroskopu buvo nustatyta, kad sarkocistų, išskirtų iš didžiosios anties ir baltaskruostės berniškės, sienelės vienuose fragmentuose atrodė beveik lygios, o kituose fragmentuose pasižymėjo smulkiais pasibangavimais, kai tuo tarpu tiriant šviesiniu mikroskopu sarkocistos, išskirtos iš baltaskruostės berniškės sienelė pasirodė esanti lygi, o sarkocistos sienelė iš didžiosios anties – banguota. Pagal Dubey (1989) *Sarcocystis* parazitų cistų sienelių ultrastruktūros klasifikacijos sistemą, I cistos sienelės tipui priklausančių sarkocistų sienelės pasižymi paviršutiniškais ar gilesniais pasibangavimais. Priklausomai nuo preparato kokybės pirmam cistos sienelės tipui priklausančių sarkocistų sienelė šviesiniu mikroskopu gali atrodyti lygi ar šiek tiek banguota. Šiame šviesiniu mikroskopu atliktame tyrime, dėl minėtų priežasčių, sarkocistos atrodančios kaip turinčios lygų ar truputį banguotą paviršių buvo priskiriamos I sarkocistų tipui.

Analizuotose paukščių rūšyse šviesiniu mikroskopu identifikuoti keturi *Sarcocystis* parazitų mikrocistų tipai (I, II, III, V). Vertinant morfologinius požymius, mikrocistos priklausė mažiausiai keturioms skirtingoms *Sarcocystis* rūšimis. Toje pačioje šeimininkų rūšyje sarkosporidijų mikrocistų atskyrimas buvo sąlyginai nesudėtingas. II tipui priklausančios sarkocistos pasižymėjo panašiu į 9 (pagal Dubey, Odening, 2001) cistos sienelės tipu, III tipui priklausančios sarkocistos pasižymėjo 9 cistos sienelės tipu, V tipui priklausančios sarkocistos turėjo iki šiol neaprašytą cistos sienelės tipą, I sarkocistų tipui priklausančios sarkocistos, išskirtos iš baltaskruostės berniklės, didžiosios anties, keršulio, sidabrinio kiro pasižymėjo tuo pačiu 1 cistos sienelės tipu. 1 cistos sienelės tipas nustatytas daugiau kaip 20 *Sarcocystis* rūšių, kurių šeimininkai priklauso įvairioms sistematinėms grupėms (Odening, 1998). *S. calchasi*, parazituojančios naminiame karvelyje ir *S. columbae*, randamos keršulyje cistų sienelės irgi priskirtinos 1 cistų sienelių tipui (Olias ir kt., 2010b; 2010c). Elektroninės mikroskopijos analizės duomenys dar kartą parodė, jog morfologinių rezultatų nepakanka, siekiant atsakyti į klausimą, ar paukščių sarkosporidijos, pasižyminčios vienoda cistos sienelės ultrastruktūra, priklauso tai pačiai, ar skirtingoms rūšims.

Šiame darbe paukščių *Sarcocystis* rūšys identifikuotos naudojant kompleksinę morfologinę ir DNR analizę. 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono DNR sekų analizė parodė, jog tirtuose paukščiuose egzistuoja mažiausiai trys sarkosporidijų rūšys (*S. wobeseri*, *S. columbae*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*) turinčios I cistos sienelės tipą. *S. wobeseri* rūšis, aprašyta baltaskruostėje berniklėje, rasta ir didžiojoje antyje. Taip pat *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anser albifrons* 18S rRNR ir 28S rRNR genų sekos sutapo su *S. wobeseri* sekomis, tačiau siekiant patvirtinti, jog balatakaktė žąsis yra dar vienas *S. wobeseri* tarpinis šeimininkas, reikalingi tolimesni ITS–1 regiono sekų tyrimai. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pagal tirtas morfologines ir genetines charakteristikas atitiko *S. wobeseri* rūšį. Kadangi vienos sarkosporidijų rūšies parazitavimas skirtingiems būriams priklausančiose tarpinių šeimininkų rūšyse yra labai retas reiškinys,

kol kas *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pavadinta *S. wobeseri*-like. Vėlesni kryžminiai užkrėtimo eksperimentai turėtų patvirtinti arba paneigti *S. wobeseri* parazitavimą sidabriniam kire.

Analizuotų paukščių raumenyse be mikrocistų taip pat rastos makrocistos keturiuose didžiųjų ančių individuose. Makroskopinės sarkocistos pasižymėjo unikalia žiedinio kopūsto formos cistos sienelės ultrastruktūra, kuri būdinga tik *S. rileyi* rūšiai. Lyginant 18S rRNR geno, 28S rRNR geno ir ITS–1 regiono sekas patvirtinta, jog makroskopinės didžiosios anties sarkocistos priklauso *S. rileyi* rūšiai. Europoje rastos makroskopinės sarkocistos anksčiau detaliau nebuvo tiriamos, apžiūrėjus paukčių lavonėlius buvo manoma, jog tai greičiausiai *S. rileyi* rūšis. *S. rileyi* infekcija pasauliniu mastu buvo žinoma tik Šiaurės Amerikoje. Šiame darbe cistų sienelės ultrastruktūros ir DNR analizės duomenimis įrodyta, jog didžiosios antys *S. rileyi* rūšimi užsikrėtusios ir Europoje. Užkrėtimo eksperimentais, atliktais Kanadoje ir JAV nustatyta, kad *S. rileyi* galutinis šeimininkas yra dryžuotasis skunksas (Cawthorn ir kt., 1981; Wicht, 1981). Pastarasis paplitęs išimtinai Š. Amerikoje, todėl lieka neaišku, koks gyvūnas padeda platinti šią rūšį Europoje.

Remiantis cistų sienelės ultrastruktūros ir DNR tyrimų rezultatais aprašytos keturios naujos mokslui sarkosporidijų rūšys (*S. albifronsi*, *S. wobeseri*, *S. anasi* ir *S. cornixi*). Tirtuose žąsiniuose paukščiuose nustatytos *S. rileyi*, *S. anasi*, *S. albifronsi*, *S. wobeseri*, varniniuose paukščiuose – *S. cornixi* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*, keršulyje – *S. columbae*, o sidabriniam kire – *S. wobeseri*-like. Elektroniniu mikroskopu nustatčius *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* cistų sienelės struktūrą tikimasi ateityje aprašyti dar vieną sarkosporidijų rūšį.

Šeruose identifikuota viena rūšis – *S. miescheriana*, kuri pagal sarkocistų morfologines ypatybes lengvai atskirta nuo rečiau randamos *S. suihominis* (Grikienienė, Senutaitė, 1995). Anksčiau buvo manoma, jog toje pačioje elninių rūšyje aptinkamos skirtingų rūšių sarkosporidijos gali būti atskiriamos šviesiniu mikroskopu pagal sarkocistų morfologines charakteristikas, o morfologiškai panašių *Sarcocystis* rūšių, išskirtų iš skirtingų

elninių rūšių, palyginimui reikalingi išsamesni tyrimai (Wesemeier, Sedlaczek, 1995a). Analizuojant stirnų, taurių elnių ir briedžių diafragmos raumenis, aptiktas sarkocistas galima būtų skirstyti į keturis tipus: kapsule apgaubtos kiaušinio formos sarkocistos; lygiasienės arba su nežymiomis išaugomis; sarkocistos, turinčios plauko formos išaugas; sarkocistos, pasižyminčios piršto formos išaugomis ir sudarančiomis tvorelės struktūrą.

Tiriant šviesiniu mikroskopu, Lietuvoje stirnose anksčiau identifikuotos keturių tipų sarkocistos, priskiriamos *S. gracilis*, *S. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni* ir *Sarcocystis* sp. rūšims (Kutkienė, 2001). *Sarcocystis* sp. cistos sienelė apibūdinta kaip lygi, o *S. gracilis* cistos sienelė pasižymėjo kelmo formos iki 1,3 μm ilgio ir 0,5 μm pločio išaugomis aiškiausiai matomomis apikalinėje cistos dalyje. Toks skirstymas kelia abejonių, nes autorė teigia, kad išaugų matomumo aiškumas priklauso nuo preparato šviežumo, o kai kuriose vietose cistos sienelė atrodo lygi. Kiti autoriai pažymi, jog *S. gracilis* sarkocistų išaugos matomos tik esant šviežiai medžiagai cistos viršutiniame krašte, o stebint skirtingais optiniais lygiais, išaugos matomos kaip taškai (Sedlaczek, Wesemeier, 1995; Dahlgren, Gjerde, 2009). Stebint šviesiniu mikroskopu stirnose sarkocistos lygiu sienelės paviršiumi buvo aptiktos Vokietijoje ir Italijoje (Santini ir kt., 1997; Schramlová, Blažek, 1978; Entzeroth, 1982). Tiriant elektroniniu mikroskopu, šios sarkocistos morfologiškai skyrėsi nuo *S. gracilis*, bei buvo panašios į *S. grueneri* išskirtas iš šiaurinio elnio, *S. cervicanis* Speer, Dubey, 1982 – iš tauriojo elnio, *S. wapiti* Hernández-Rodríguez, Navarrete, Martínez-Gomez, 1981 – iš elnio vapis (Cervus canadensis), *Sarcocystis* sp. – iš danieliaus (*Dama dama*), *Sarcocystis* sp. – iš briedžio. (Colwell, Mahrt, 1981; Hernández-Rodríguez ir kt., 1981; Speer, Dubey, 1982; Entzeroth ir kt., 1985; Gjerde, 1985). Minėtųjų sarkocistų sienelės pasižymi daugiasluoksne horizontalia struktūra. Kadangi Kutkienė 2001 metų tyrime sarkocistų sienelių neanalizavo elektroniniu mikroskopu, jos identifikuotų lygiasienių sarkocistų palyginimas su *Sarcocystis* sp. išskirtomis iš stirnos ir danieliaus, *S. grueneri*, *S. cervicanis*, *S. wapiti* nėra įmanomas. Šiame darbe sarkocistos, kurių paviršius atrodė lygus ar turintis neaukštas (~

1–1,5 µm) taško ar kelmo formos išaugas buvo priskiriamos *S. gracilis* rūšiai. Šio darbo metu šešių izoliatų iš skirtingų stirnų morfologiškai identifikuotų kaip *S. gracilis* priklausymą būtent šiai rūšiai patvirtino 18S rRNR geno sekų analizė. Tačiau, būtina pabrėžti, kad šviesiniu mikroskopu lygiasienių sarkocistų, aptinkamų elniniuose atskyrimas nuo *S. gracilis* yra komplikotas (Schramlová, Blažek, 1978; Colwell, Mahrt, 1981; Enteroth, 1982; Santini ir kt., 1997). Išlieka tikimybė, jog Lietuvoje stirnose parazituoja morfologiškai į *S. gracilis* panaši sarkosporidijų rūšis – *Sarcocystis* sp.

Be anksčiau Lietuvoje stirnose aptiktų *S. gracilis*, *S. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni*-like rūšių taip pat rastos kiaušinio formos sarkocistos, kurios genetiškai identifikuotos kaip *S. oviformis* rūšis. *S. hofmanni* rūšis, parazitaujanti barsuke, buvo aprašyta Vokietijoje (Odening ir kt., 1994a). Morfologiškai nuo *S. hofmanni* neatskiriamos sarkosporidijos taip pat identifikuotos elninių šeimos rūšyse: stirnoje, tauriajame elnyje, danielyje, baltasnukiame elnyje (*Cervus albirostris*), Indiniam zambare (*Cervus unicolor*) (Sedlacek, Wesemeier, 1995; Wesemeier, Sedlacek, 1995a; Wesemeier, Sedlacek, 1995b; Odening, 1997). Šios sarkosporidijos buvo įvardijamos kaip *S. cf. hofmanni* (*S. cf. hofmanni* atitinka *S. hofmanni*-like). Šio darbo metu atlikti molekuliniai tyrimai parodė, jog egzistuoja dvi rūšys, kurios, remiantis šviesinės mikroskopijos analize anksčiau buvo įvardijamos *S. hofmanni*-like pavadinimu. Remiantis šio darbo metu atlikta 18S rRNR geno sekų analize *S. hofmanni*-like išskaidyta į *S. hofmanni*-like1 ir *S. hofmanni*-like2, nesuteikiant joms atskirų rūšių pavadinimų, nes išsamūs cistų sienelių ultrastruktūros palyginimai nebuvo atlikti. Tačiau 4% 18S rRNR geno sekų skirtumas tarp *S. hofmanni*-like1 ir tarp *S. hofmanni*-like2 vertintinas kaip tarprūšinis skirtumas, nes *S. hofmanni*-like1 18S rRNR geno sekų skirtumai, lyginant su artimiausiomis *Sarcocystis* rūšimis, buvo gerokai mažesni (1–1,3%). Analizuojant šviesiniu mikroskopu buvo pastebėti morfologiniai cistos sienelės skirtumai tarp *S. hofmanni*-like1 ir *S. hofmanni*-like2, tačiau kol kas šių dvejų rūšių atskyrimas šviesiniu mikroskopu yra problematiškas. Gjerde (2011) remiantis cistų sienelės ir 18S rRNR geno sekų ypatumais aprašė naują stirnų

Sarcocystis rūšį – *S. silva*. Ši rūšis pagal morfologinius ir molekulinis diagnostinius požymius atitinka *S. hofmanni-like1*. Tikėtina, kad detalesnė morfologinė analizė leistų ir *S. hofmanni-like2* aprašyti kaip atskirą rūšį, tačiau kol šie tyrimai neatlikti, *S. hofmanni-like1* ir *S. hofmanni-like2* toliau darbe vadinamos, atitinkamai, *S. silva* ir *S. hofmanni-like*.

Tiriant šviesiniu mikroskopu briedžių diafragmos raumenyse rastos vieno morfologinio tipo sarkocistos, turinčios plauko formos išaugas ir vertinant morfologinius požymius nustatyta, kad iš briedžio išskirtos sarkocistos buvo panašios į *S. capreolicanis* bei į *S. hjorti* rūšis. Deja, detalesnis morfologinis palyginimas šiame darbe atrastos *Sarcocystis* sp., išskirtos iš briedžio, su *S. hjorti* praktiškai negalimas, nes *S. hjorti* cistos sienelės paviršiaus struktūra tirta skenuojančiu, o ne transmisiniu elektroniniu mikroskopu. Molekuliniai rezultatai parodė, jog plauko formos išaugas formuojančios sarkocistos priklauso *S. hjorti* rūšiai. Šiame tyrime pirmą kartą Lietuvoje aptikta *S. hjorti* rūšis morfologiškai ryškiai skyrėsi nuo iki šiol briedžiuose identifikuotų *Sarcocystis* spp. (Grikienienė ir kt., 2001; Kutkienė, 2002).

Vokietijoje tauriuosiuose elniuose naudojant morfologinius požymius buvo identifikuotos trys *Sarcocystis* rūšys: *S. cf. grueneri* (anksčiau įvardinta kaip *S. cervicanis*), *S. cf. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni* (Wesemeier, Sedlaczek, 1995a). Autorių nuomone šios sarkosporidijos yra anksčiau elniniuose aprašytų rūšių sinonimai. Ankstesnių tyrimų metu Lietuvoje tauriuosiuose elniuose buvo nustatytos tos pačios trys *Sarcocystis* spp. (Kutkienė, 2003). Šiame darbe tauriuosiuose elniuose aptikti morfologiniai sarkocistų tipai sutapo su anksčiau nustatytaisiais. Norvegijoje, naudojant morfologinę ir genetinę analizę, tauriuosiuose elniuose charakterizuotos penkios sarkosporidijų rūšys: *S. tarandi*, *S. rangiferi*, *S. hjorti*, *S. hardangeri*, *S. ovalis* (Dahlgren, Gjerde, 2010). Šiame tyrime pagal 18S rRNR geno sekas tauriuosiuose elniuose identifikuotos *S. hofmanni-like*, *S. hjorti*, *S. sp. ex Cervus elaphus*. Lygiasienes sarkocistas sudaranti *S. sp. ex Cervus elaphus*, vertinant šviesiniu mikroskopu, buvo panaši į *S. cervicanis*, aprašytą

tauriuosiuose elniuose, tačiau reikalingi tolimesni cistų sienelių elektroninės mikroskopijos tyrimai, siekiant išsiaiškinti ar šios rūšys yra sinonimai. *S. silva* ir *S. hofmanni*-like sarkocistos tiriant šviesiniu mikroskopu yra labai panašios į *S. tarandi*, *S. rangiferi* sarkocistas. Minėtųjų rūšių sarkocistos pasižymi piršto formos išaugomis, formuojančiomis tvorelės struktūrą. Šiame darbe tik iš vieno tauriojo elnio izoliuotos tokio morfologinio tipo sarkocistos identifikuotos kaip *S. hofmanni*-like. Neatmestina tikimybė, jog *S. tarandi*, *S. rangiferi* rūšys Lietuvoje anksčiau galėjo būti neteisingai identifikuojamos kaip *S. hofmanni*-like. Norint išsiaiškinti, kiek sarkosporidijų rūšių, formuojančių sarkocistas, kurių paviršius primena tvorelės struktūrą, aptinkama Lietuvoje tauriuosiuose elniuose, reikalingi išsamesni tyrimai, naudojant elektroninės mikroskopijos analizę bei genetiškai analizuojant keliolika *Sarcocystis* spp. izoliatų iš skirtingų šeimininko individų. Paaiškėjo, jog briedžiuose, stirnose, elniuose aptinkamos plauko formos išaugas turinčios sarkocistos priklauso dviem rūšims – tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose parazituoja *S. hjorti*, o stirnose – *S. capreolicanis*. Tiriant šviesiniu mikroskopu šių rūšių atskyrimas pagal morfologinius požymius nėra galimas.

S. hardangeri, *S. ovalis*, *S. oviformis* rūšių kiaušinio formos sarkocistos Norvegijoje aptiktos 18 iš 37 (49%) tirtų tauriųjų elnių, 16 iš 35 (46%) tirtų briedžių ir vienoje iš šešių tirtų stirnų (Dahlgren, Gjerde 2008; 2009; 2010). Infekcijos ekstensyvumo duomenys parodė, jog briedžių ir tauriųjų elnių užsikrėtimas šio morfologinio tipo sarkocistomis yra dažnas reiškinys Norvegijoje. Šiame darbe ištyrus 169 žvėris, priskiriamus elninių šeimai, *S. oviformis* nustatyta tik vienoje stirnoje, o anksčiau Lietuvoje tokio tipo sarkocistų elninių rūšyse nebuvo atrasta. Kiaušinio formos sarkocistos, aiškiai matomos dažytuose raumenų preparatuose, yra lengvai atskiriamos nuo kitų tipų sarkocistų, todėl tikimybė, jog jos buvo nepastebėtos yra menka. Daroma prielaida, jog kiaušinio formos sarkocistos Lietuvos elniniuose yra labai retas arba atsitiktinis reiškinys.

Norvegijoje registruotas vienintelis atvejis, kai vienoje elninių rūšyje buvo aptiktos dvi morfologiškai neatskiriamos *Sarcocystis* rūšys – *S. ovalis* ir

S. hardangeri, parazituojančios tauriuosiuose elniuose (Dahlgren, Gjerde, 2010a). Tačiau šios dvi sarkosporidijų rūšys buvo identifikuotos dvejose skirtingose, geografiniais barjeriais atskirtose elnių populiacijose.

Lietuvoje sumedžiotuose elniniuose buvo aprašyti mišrios sarkosporidijų infekcijos atvejai, kai viename individe nustatoma daugiau negu viena *Sarcocystis* rūšis (Kutkienė, 2001; 2002; 2003). Šiame darbe stirnose ir tauriuosiuose elniuose taip pat fiksuoti mišrios *Sarcocystis* infekcijos atvejai.

Mišrios infekcijos galimybė bei morfologiškai panašiai atrodančios sarkocistos apsunkina skirtingų *Sarcocystis* rūšių atskyrimą toje pačioje elninių rūšyje naudojant tik šviesinės mikroskopijos analizę. Šiame tyrime DNR išskirta iš kelių vieną morfologinį tipą atitinkančių sarkocistų, kurių kiekvienos morfologinės savybės buvo įvertintos natyviniuose preparatuose. Padauginus tam tikros *Sarcocystis* sp. DNR fragmentą ir vertinant pirminę jo seką, analizuotos tik tokios sekų chromatogramos, kuriose aiškiai buvo matyti viengubi nukleotidų pikai. Dvigubų pikų priežastimi gali būti mišri *Sarcocystis* parazitų infekcija. Nepaisant visų atsargumo priemonių, kurių imtasi siekiant išvengti dvigubos sarkosporidijų infekcijos viename pavyzdyje, tolimesniuose elninių sarkosporidijų tyrimuose rekomenduotina naudoti DNR, išskirtą tik iš vienos cistos. *Sarcocystis* parazitų cistos sienelės ultrastruktūra anksčiau buvo beveik išimtinai nustatoma transsmisiniu elektroniniu mikroskopu (Dubey ir kt., 1989). Skenuojančiu elektroniniu mikroskopu kol kas tyrinėtos šiaurinių elnių, briedžių, stirnų, taurių elnių *Sarcocystis* rūšių sarkocistos. Nepažeidžiant sarkocistos struktūros, skenuojančiu elektroniniu mikroskopu galima įvertinti sarkocistos paviršiaus morfologines charakteristikas ir tą pačią cistą panaudoti vėlesnėms molekulinėms manipuliacijoms (Dahlgren, Gjerde, 2008). Autoriaus nuomone, toks elninių sarkocistų morfologinių, genetinių savybių tyrimo metodas yra metodologiškai teisingusias.

Dauguma *Sarcocystis* rūšių aptinkamos tik vienoje tarpinių šeimininkų rūšyje (Dubey ir kt., 1989). Kartais morfologiškai panašios sarkocistos randamos taksonomiškai artimose tarpinių šeimininkų rūšyse (Odening, 1998). Šiame darbe molekuliniais tyrimais parodyta, jog *S. wobeseri* tarpiniais

šeimininkais tarnauja mažiausiai dvi žąsinių paukščių rūšys (didžioji antis ir baltaskruostė berniklė). Remiantis 18S rRNR geno sekų analize pirmą kartą nustatyta, kad *S. silva* sudaro sarkocistas stirnose ir briedžiuose (Dahlgren, Gjerde, 2008 įvardinta kaip *Sarcocystis* sp. TypeD), o *S. hofmanni*-like sudaro sarkocistas stirnose ir tauriuosiuose elniuose, taip pat dar kartą pavirtinta, jog *S. hjorti* sudaro sarkocistas tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose. Pažymėtina, kad sarkosporidijų, parazituojančių šiauriniuose elniuose, tauriuosiuose elniuose, dėmėtuose elniuose, stirnose ir briedžiuose 18S rRNR geno sekas nustatė dvi mokslininkų grupės per pastarųjų penkerių metų laikotarpį (Dahlgren, Gjerde 2007; 2008; 2009; 2010; Narisawa ir kt., 2008). Apjungus kitų tyrėjų bei šio tiriamojo darbo rezultatus nustatyta, kad dvejose elninių šeimos rūšyse aptinkamos septynios *Sarcocystis* rūšys, o *S. gracilis*, *S. capreolicanis* – tik strinose, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* – tik tauriuosiuose elniuose, *S. scandinavica*, *S. alces*, *S. alceslatrans* – tik briedžiuose, *S. rangi*, *S. grueneri*, *S. tarandivulpes* – tik šiauriniuose elniuose, *Sarcocystis* sp. – tik dėmėtuose elniuose. Iš esamų rezultatų kol kas negalima spręsti apie priežastis, lėmusias kai kurių sarkosporidijų rūšių adaptavimąsi parazituoti mažiausiai dvejose elninių rūšyse, kai kitos sarkosporidijų rūšys specializavosi ir prisitaikė gyventi vienoje šeimininko rūšyje. Tolimesni *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių elninių šeimos žinduolių raumenyse, molekuliniai tyrimai būtų labai svarbūs gilinant žinias apie sarkosporidijų gyvybinius ciklus, parazito-šeimininko evoliucinius ryšius. Autorius taip pat iškelia hipotezę, kad didėjant sarkosporidijų tyrimų skaičiui bus nustatytas mažesnis *Sarcocystis* rūšių specifiškumas tarpiniam šeimininkui.

Naudojant molekulinę analizę šio tiriamojo darbo metu nustatyta, jog tirtosios paukščių sarkosporidijų rūšys yra artimai giminingos patogeninėms *S. calchasi*, *S. falcatula*, *S. neurona* rūšims. Pažymėtina, kad neseniai identifikuota *S. calchasi*, sukianti centrinės nervinės sistemos sutrikimus naminiuose karveliuose, gali įtakoti paukščių žūtį. *S. calchasi* pagal 18S rRNR, 28S rRNR genus ir ITS–1 regioną, filogenetiškai artimiausia šiame darbe aprašytai *S. wobeseri* rūšiai. Iš visų sarkosporidijų rūšių didžiausią

susidomėjimą mokslininkams kelia labai patogeninė *S. neurona* rūšis, kurios transmisija gali vykti per keletą taksonomiškai tolimų gyvūnų. Kol kas nežinoma galima pirmoji rūšis, tarnavusi *S. neurona* tarpiniu šeimininku, svarstoma, jog tai galėjo būti paukščių rūšis. Šią hipotezę patvirtina naujausių tyrimų rezultatai. Eksperimentiškai nustatyta, jog paukščių rūšis rudagalvis karviaganis taip pat gali būti *S. neurona* tarpiniu šeimininku (Mansfield ir kt., 2008). Be to, molekuliniiais tyrimais nustatyta, kad *S. neurona* giminingiausia kitai patogeniškumu pasižyminčiai paukščių sarkosporidijų rūšiai *S. falcatula* (Marsh ir kt., 1999). Pagal ITS–1 regiono filogramą, *S. neurona* taip pat artimai gimininga žąsinuose paukščiuose aptinkamoms *S. rileyi*, *S. anasi*, *S. albifronsi* rūšims.

Lyginant su naujausiais *Sarcocystis* genties rūšių filogenetiniiais tyrimais, kurių metu buvo naudojamos 18S rRNR geno sekos, bendra sukonstruoto filogenetinio medžio topologija nepasikeitė po to, kai pirmą kartą į analizę buvo įtrauktos *S. anasi*, *S. albifronsi*, *S. capreolicanis*, *S. cornixi*, *S. silva*, *hofmanni-like*, *S. miescheriana*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* rūšių DNR sekos (Morrison ir kt., 2004; Dahlgren, Gjerde, 2010). Lyginant su literatūros duomenimis, papildomai buvo išskirta *S. muris*, *S. rodentifelis* filogenetinė grupė, nors ir ši grupė susideda tik iš dvejų narių, tačiau jos atsiskyrimą nuo kitų stambių šakų paremia aukšta tikimybinė vertė. *S. muris* ir *S. rodentifelis* pasižymi unikaliu „graužikai–katinių šeimos plėšrūnai“ gyvybiniu ciklu, kuris nebūdingas kitoms filogramoje analizuojamoms *Sarcocystis* rūšims. 28S rRNR geno *Sarcocystis* rūšių filogenetinėje analizėje pirmą kartą panaudotos *S. anasi*, *S. albifronsi*, *S. cornixi*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* rūšių sekos. Pagrindinių 28S rRNR geno filogenetinio medžio stambiausių šakų susigrupavimas nepasikeitė, kai buvo įtrauktos penkios paukščių sarkosporidijų rūšys (Dubey ir kt., 2010). 18S rRNR ir 28S rRNR genų filogramų topologija buvo labai panaši, o skirtumai atsirado dėl nevienodo skaičiaus rūšių panaudotų atitinkamų genų filogenetiniuose tyrimuose. Filogenetinio medžio,

sukonstruoto pagal 28S rRNR geno sekas šakų susigrupavimas buvo paremtas aukštesnėmis tikimybinėmis reikšmėmis, lyginant su 18S rRNR geno filogenetiniu medžiu. Naudojant 28S rRNR geno sekas nustatyti filogenetiniai ryšiai tarp sarkosporidijų, kurių tarpiniai šeimininkai paukščiai, tuo tarpu paukščių *Sarcocystis* rūšių filogenetinė padėtis 18S rRNR filogramoje nebuvo aiški. Lyginant Sarcocystidae šeimos rūšis, 28S rRNR genas pasižymi didesniu kintamumu už 18S rRNR geną, todėl 28S rRNR turi savyje daugiau filogenetinės informacijos, bei yra tinkamesnis Sarcocystidae šeimos filogenetiniuose tyrimuose (Mugridge ir kt., 2000).

18S rRNR geno filogenetiniame medyje pagal stambiausių šakų grupavimąsi buvo išskirtos keturios pagrindinės grupės. Atskirų rūšių filogenetinis susigrupavimas I grupėje buvo neaiškus. Šiame darbe tirtų aštuonių iš porakanopių išskirtų *Sarcocystis* rūšių (*S. miescheriana*, *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *S. silva*, *S. hofmanni-like*, *S. oviformis*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*) filogenetiniai ryšiai nustatyti naudojant 18S rRNR geno sekas. Analizuotos aštuonios rūšys buvo apjungtos IVA, IVB ir IVC grupėse. Šioms rūšims nenustatytos 28S rRNR geno sekos dėl menkos palyginimo galimybės su giminingomis rūšimis. 28S rRNR geno sekos iš porakanopių sarkosporidijų kol kas Genų banke prieinamos tik *S. arieticanis*, *S. capracanis*, *S. cruzi*, *S. gigantea*, *S. moulei* ir *S. tenella* rūšims. Filogenetiniai kai kurių *Sarcocystis* rūšių ryšiai IVB ir IVC grupėse vis dėlto abejotini. Žvelgiant iš ateities perspektyvos, didėjant *Sarcocystis* rūšių 18S rRNR geno duomenų bazei, kils naujų sunkumų nustatant tam tikros *Sarcocystis* rūšies filogenetinius ryšius. Autorius palaiko anksčiau išsakytą nuomonę, jog atskirai taikomas 18S rRNR žymuo yra nepakankamas Sarcocystidae šeimos filogenetiniuose tyrimuose (Morrison ir kt., 2004). Todėl analizuojant *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinius ryšius verta naudoti ir 18S rRNR, ir 28S rRNR geno sekas (Šlapeta ir kt., 2003; Olias ir kt., 2010c).

18S rRNR geno ir 28S rRNR geno filogramose šakų ilgiai tarp *Sarcocystis* rūšių, kurių tarpiniai šeimininkai paukščiai yra reikšmingai trumpesni, lyginant su sarkosporidijų rūšimis, kurių tarpiniai šeimininkai –

žinduoliai ar ropliai. Manoma, jog paukščių sarkosporidijos yra jaunos, neseniai atsiskyrusios rūšys. Daugeliu atveju fiksuoti nedideli (iki 1%) tarprūšiniai skirtumai lyginant paukščių sarkosporidijų 18S rRNR ir 28S rRNR genų sekas. Pastebėta, jog kai kurių žinduolių ir roplių *Sarcocystis* rūšių vidurūšinė įvairovė yra didesnė lyginant su paukščių sarkosporidijų tarprūšine įvairove (Šlapeta ir kt., 2002a; Dahlgren, Gjerde, 2010). Dėl minėtų priežasčių identifikuojant paukščių sarkosporidijas naudotas ITS–1 regionas. Paukščių *Sarcocystis* rūšių genetiniam atskyrimui kiti autoriai taip pat taikė ITS–1 regiono sekų analizę (Marsh ir kt., 1999; Dubey ir kt., 2001a, 2006, 2010; Olias ir kt., 2009, 2010c). Šiame darbe gauta ITS–1 regiono filograma vertintina nevienareikšmiškai, dėl sunkiai sulyginamų filogenetiškai mažiau giminingų rūšių sekų. Tačiau ITS–1 regiono filogenetiniame medyje paukščių sarkosporidijos buvo išskaidytos į du klasterius ir smulkesnis grupavimas šiuose klasteriuose atitiko paukščių sarkosporidijų jungimąsi 28S rRNR geno filogenetiniame medyje. Remiantis šio darbo ir ankstesnių tyrimų rezultatais, *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinei analizei labiausiai tinka 18S rRNR ir 28S rRNR žymenys, o artimai giminingų sarkosporidijų palyginimui labiausiai tinkamas ITS–1 regionas. Paukščių sarkosporidijų, kaip labai giminingų rūšių identifikacijai ir genetiniam palyginimui rekomenduotina naudoti ITS–1 regiono sekų analizę.

Pastebėta, jog elninių *Sarcocystis* rūšių padėtis 18S rRNR geno filogenetiniame medyje priklauso nuo morfologinių sarkocistų sienelių charakteristikų. Kiaušinio formos sarkocistomis bei ištįsusios netaisyklingos liežuvio formos cistos sienelės išaugomis pasižyminčios *S. hardangeri*, *S. oviformis*, *S. ovalis* buvo apjungtos IVA grupėje. *S. tarandi*, *S. rangiferi*, *S. silva* ir *S. hofmanni*-like rūšių formuojamos sarkocistos turi piršto formos išaugas, sudrančias į tvorelę panašią struktūrą, o šios rūšys grupuojasi filogramoje tarpusavyje bei su *Sarcocystis* sp., parazituojančią dėmėtojo elnio raumenyse, tačiau, šios rūšies morfologija nenurodoma. Sarkocistos su plauko formos išaugomis būdingos elninių sarkosporidijų rūšims – *S. rangi*, *S. alceslatrans*, *S. capreoliana*, *S. hjorti*, kurios giminingiausios tarpusavyje bei

filogenetiškai artimos morfologiškai panašiai *S. cruzi* rūšiai. *S. tarandivulpes*, *S. alces*, *S. gracilis* 18S rRNR filogenetiniame medyje apjungiamos su *S. tenella*, *S. capracanis*, visų šių sarkosporidijų sarkocistų paviršius lygus su santykinai neaukštomis išaugomis. *S. grueneri* ir *Sarcocystis* sp. ex. *Cervus elaphus* grupuojasi filogramoje tarpusavyje, o jų sarkocistų sienelės, stebint šviesiniu mikroskopu, atrodo lygios (Dubey ir kt., 1989; Odening 1998; Dubey, Odening, 2001; Dahlgren, Gjerde, 2008; Narisawa ir kt., 2008; Dahlgren, Gjerde, 2009; 2010). Anksčiau buvo nustatytas ryšys tarp naminiuose gyvuliuose parazituojančių sarkosporidijų rūšių filogenetinio giminingumo ir šių rūšių fenotipinių požymių, didžiausią dėmesį kreipiant į sarkocistų sienelių išvaizdą (Holmdahl ir kt., 1999). Panašios morfologinių savybių ir filogenetinių ryšių sąsajos pastebimos ir lyginant paukščių *Sarcocystis* rūšis. *S. anasi* ir *S. albifronsi* pagal 18S rRNR ir 28S rRNR genus bei ITS–1 regioną buvo genetiškai artimiausios tarpusavyje, be to šios rūšys pasižymėjo labai panašia cistos sienelės paviršiaus išvaizda su piršto formos išaugomis, formuojančiomis tvorelės formos struktūrą. *S. wobeseri*, *S. calchasi*, *S. columbae*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* 28S rRNR geno filogramoje jungėsi į vieną klasterį, be to, šios keturios rūšys buvo labai panašios morfologiškai – pasižymėjo šiek tiek pasibangavusiomis ar lygiomis sarkocistų sienelėmis, smulkiais cistozoitais.

Remiantis filogenetinės analizės rezultatais galima teigti, jog paukščių ir elninių *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai ryšiai taip pat priklauso nuo gyvybinio ciklo, o rūšys grupuojasi labiau pagal galutinius, negu tarpinius šeiminius. Būtina pažymėti, jog ne visoms tirtosioms sarkosporidijų rūšims žinomi galutiniai šeiminkai, tad aukščiau išdėstytą teiginį vertėtų laikyti prielaida, hipoteze. Verta pabrėžti, jog ši prielaida mokslinėje literatūroje šiuo metu nėra ginčijama. Pastaruoju metu užkrėtimo eksperimentai planuojami atsižvelgiant į ekologinius bei filogenetinius duomenis, susiaurinant galimų galutinių šeiminkų ratą bei optimaliausiai pasirenkant rūšį, kuri bus užkrėsta tarpinio šeiminko mėsoje esančiomis tam tikros *Sarcocystis* rūšies cistomis. Pastaraisiais metais nustatyti *S. ovalis*, *S. hjorti*, *S. alces*, *S. calchasi* galutiniai

šeimininkai praktikoje patvirtina išdėstyta hipotezę (Gjerde, Dahlgren, 2010; Dahlgren, Gjerde, 2010b; Olias ir kt., 2010a). Šiame darbe paukščių sarkosporidijų rūšys 28S rRNR ir ITS–1 regiono filogramose padalintos į dvi grupes pagal galutinius šeimininkus. Sprendžiant iš šio tyrimo filogenetinių rezultatų, *S. cornixi*, *S. wobeseri*, *S. columbae*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* galimi galutiniai šeimininkai yra paukščiai, o *S. anasi* – žinduoliai. Tirtosios porakanopių *Sarcocystis* rūšys apjungiamos trijose išskirtose IVA, IVB ir IVC filogenetinėse grupėse, kurių atstovams būdingi galutiniai šeimininkai atitinkamai yra paukščiai, katinių šeimos plėšrūnai ir šuninių šeimos plėšrūnai. Pagal filogenetinius rezultatus, tikėtini *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai, *S. oviformis* – paukščiai. IVB grupę galima suskaidyti į du klasterius. Pirmąjį sudaro *Sarcocystis* rūšys, kurių tarpiniais šeimininkais tarnauja avys, ožkos, jaučiai, buivolai, o galutiniai šeimininkai yra katinių šeimos plėšrūnai. Antrąjį klasterį sudaro elninių *Sarcocystis* rūšys (*S. tarandi*, *S. rangiferi*, *S. silva*, *S. hofmanni-like*, *Sarcocystis* sp. išskirta iš dėmėtojo elnio), kurių galutiniai šeimininkai nenustatyti. Neatmetama tikimybė, jog minėtųjų elninių *Sarcocystis* rūšių galutiniai šeimininkai nepriklauso nei šuninių, nei katinių šeimos plėšrūnams. Verta pažymėti, kad vykdant eksperimentą *S. rangiferi* rūšimi nepavyko užkrėsti katės, taip pat žmogaus, penkių lapių bei šuns (Dahlgren ir kt., 2008).

Apibendrinant galima teigti, kad *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius atspindi morfologinės sarkocistų charakteristikos, o tai, kad *Sarcocystis* rūšys grupuojasi filogramose į bendrus klasterius priklausomai nuo galutinių šeimininkų giminingo reiškia, kad filogenetiškai artimos *Sarcocystis* rūšys parazituoja taksonomiškai artimose galutinių šeimininkų rūšyse.

Išvados

1. Aštuoniolikoje Lietuvos laukinės faunos rūšių atrastos *Sarcocystis* cistos, iš jų septyniose (baltaskruostėje berniklėje, pilkojoje žąsyje, kove, kuosoje, varnoje, kėkšte, keršulyje, sidabriniam kire) sarkocistos aptiktos pirmą kartą. Žinduoliuose, lyginant su paukščiais, nustatyti patikimai ($p < 0,05$) aukštesni infekcijos ekstensyvumo bei intensyvumo rodikliai.
2. Analizuojant *Sarcocystis* parazitų cistų sienelių ir cistozoitų morfometrines charakteristikas tirtuose paukščiuose išskirti keturi morfologiniai mikrocistų tipai, o makrocistos aptiktos tik didžiojoje antyje.
3. Europoje pirmą kartą nustatyta *S. rileyi* rūšis.
4. Remiantis sarkocistų ultrastruktūros ir DNR analizės duomenimis aprašytos keturios naujos mokslui paukščių *Sarcocystis* rūšys: *S. albifronsi*, *S. wobeseri*, *S. anasi*, *S. cornixi*.
5. Panaudojus originalų molekulinį tyrimų metodą rūšių diagnostikai, Lietuvoje pirmą kartą nustatytos *S. columbae*, *S. oviformis*, *S. hjorti*, *S. silva* rūšys, parazituojančios atitinkamai keršuliuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose bei stirnose ir briedžiuose.
6. Tirtosios medžiojamosios faunos *Sarcocystis* rūšys 18S rRNR, 28S rRNR genų filogenetiniuose medžiuose grupuojasi pagal sarkocistų morfologinių požymių panašumą bei filogenetiškai artimos *Sarcocystis* rūšys parazituoja taksonomiškai artimose galutinių šeimininkų rūšyse.
7. Molekulinį rezultatų analizė parodė, kad kai kurios paukščių ir elninių *Sarcocystis* rūšys (*S. wobeseri*, *S. hjorti*, *S. silva*, *S. hofmanni-like*) gali parazituoti daugiau negu vienoje tarpinių šeimininkų rūšyje.

Literatūros sąrašas

- Aguilar, R. F., Shaw, D. P., Dubey, J. P., Redig, P. 1991. *Sarcocystis*-associated encephalitis in an immature northern goshawk (*Accipiter gentilis atricapillus*). *J Zoo Wildl Med* 22(4): 466-469.
- Aljanabi, S. M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res* 25(22): 4692-4693.
- Arnastauskienė T. V., Kazlauskas J. J. 1984. The results of Lithuanian wild mammal investigations. Parasitocenossess of wild and domestic mammals of Belarus. *Mat. Rep. of the International conference on parasitocenossess of wild and domestic mammals, 27-28 May, 1982. Minsk, 31-33.*
- Arnastauskienė, T.V. 1989. Sarcosporidia of wild boars in the Lithuanian SSR. *Acta Parasitologica Lituanica* 23: 51-58.
- Arness, M. K., Brown, J. D., Dubey, P. J., Neafie, R. C., Granstrom, D. E. 1999. An outbreak of acute eosinophilic myositis attributed to human *Sarcocystis* parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 61(4): 548-553.
- Atkinson, C. T., Wright, S. D., Telford, S. R. Jr., McLaughlin, G. S., Forrester, D. J., Roelke, M. E., McCown, J. W. 1993. Morphology, prevalence, and distribution of *Sarcocystis* spp. in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Florida. *J Wildl Dis* 29(1): 73-84.
- Barrows, P. L., Hayes, F. A. 1977. Studies on endoparasites of the mourning dove (*Zenaida macroura*) in the Southeast United States. *J Wildl Dis* 13(1): 24-28.
- Barta, J. R., Jenkins, M. C., Danforth, H. D. 1991. Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other apicomplexan protozoa: monophyly of the Apicomplexa is supported. *Mol Biol Evol* 8(3): 345-355.
- Berrocal, A., Lopez, A. 2003. Pulmonary sarcocystosis in a puppy with canine distemper in Costa Rica. *J Vet Diagn Invest* 15(3): 292-294.

- Bogush, A. A. 1976. Swine muscle parasitoses and preventive measures against them. Minsk, Urodzhai.
- Bonesi, G. L., Yamamura, M. H., Pereira A. B. L. 1999. Frequency of occurrence and pathological alteration in horses infected with *Sarcocystis*. Rev Bras Parasitol Vet 8(1): 27-30.
- Box, E. D., Duszynski, D. W. 1978. Experimental transmission of *Sarcocystis* from icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. J Parasitol 64(4): 682-688.
- Box, E. D., Smith, J. H. 1982. The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. J Parasitol 68(4): 668-673.
- Box, E. D., Meier, J. L., Smith, J. H. 1984. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. J Protozool 31(4): 521-524.
- Britton, A. P., Dubey, J. P., Rosenthal, B. M. 2010. Rhinitis and disseminated disease in a ferret (*Mustela putorius furo*) naturally infected with *Sarcocystis neurona*. Vet Parasitol 169(1-2): 226-231.
- Butcher, M., Lakritz, J., Halaney, A., Branson, K., Gupta, G. D., Kreeger, J., Marsh, A. E. 2002. Experimental inoculation of domestic cats (*Felis domesticus*) with *Sarcocystis neurona* or *S. neurona* - like merozoites. Vet Parasitol 107(1-2): 1-14.
- Canaris, A. G., Mena, A. C. Bristol, J. R. 1981. Parasites of waterfowl, from southwest Texas: III. The green-winged teal, *Anas crecca*. J Wildl Dis 17(1): 57-64.
- Carreno, R. A., Schnitzler, B. E., Jefries, A. C., Tenter, A. M., Johnson, A. M., Barta, J. R. 1998. Phylogenetic analysis of the coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. J Euk Microbiol 45(2): 184-188.
- Cawthorn, R. J., Rainnie, D., Wobeser, G. 1981. Experimental transmission of *Sarcocystis* sp. (Protozoa: Sarcocystidae) between the shoveler (*Anas*

- clypeata*) duck and striped skunk (*Mephitis mephitis*). J Wildl Dis 17(3): 389-394.
- Cawthorn, R. J., Gajadhar, A. A., Brooks, R. J. 1984. Description of *Sarcocystis rauschorum* sp. n. (Protozoa: Sarcocystidae) with experimental cyclic transmission between varying lemming (*Dicrostonyx richardsoni*) and snowy owls (*Nyctea scandiaca*). Can J Zool 62(2): 217-225.
- Chabreck, R. H. 1965. Sarcosporidiosis in ducks in Louisiana. Transactions of the thirtieth North American wildlife conference 174-184.
- Cheadle, M. A., Tanhauser, S. M., Dame, J. B., Sellon, D. C., Hines, M., Ginn, P. E., Mackau, R. J., Greiner, E. C. 2001a. The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. Int J Parasitol 31(4):330-335.
- Cheadle, M. A., Yowell, C. A., Sellon, D. C., Hines, M., Ginn, P. E., Marsh, A. E., Mackau, R. J., Dame, J. B., Greiner, E. C. 2001b. The striped skunk (*Mephitis mephitis*) is an intermediate host for *Sarcocystis neurona*. Int J Parasitol 31(8): 843-849.
- Choque, J. M., Chávez, A. V., Pacheco A. P., Leyva, V. V., Panez, S. L., Ticona D. S. 2007. Frecuencia de *Sarcocystis* sp. en perros pastores de asociaciones alpaqueras de Marangani, Cusco. Rev Inv Vet Perú 18(1): 84-88.
- Clark, G. M. 1958. *Sarcocystis* in certain birds. J Parasitol 44(Suppl.): 41.
- Collins, G. H., Charleston, W. A., Wiens, B. G. 1980. Studies on *Sarcocystis* species VI: a comparison of three methods for the detection of *Sarcocystis* species in muscle. N Z Vet J 28(9): 173.
- Colwell, D. D., Mahrt, J. L. 1981. Ultrastructure of the cyst wall and merozoites of *Sarcocystis* from moose (*Alces alces*) in Alberta, Canada. Z Parasitenkd 65(3): 317-329.
- Conti, J. A., Forrester, D. J. 1981. Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. J Wildl Dis 17(4): 529-536.

- Cornwell, G. 1963. New waterfowl host records for *Sarcocystis rileyi* and a review of sarcosporidiosis in birds. *Avian Dis* 7(2): 212-216.
- Costanzo, G. R. 1990. *Sarcocystis* in American black ducks wintering in New Jersey. *J Wildl Dis* 26(3): 387-389.
- Cunningham, C. C. 1973. *Sarcocysts* in the heart muscle of a foal. *Vet Rec* 92(25): 684.
- Černá, Ž. 1984. The role of birds as definitive hosts and intermediate hosts of heteroxenous coccidians. *J Protozool* 31(4): 579-581.
- Černá, Ž., Pecka, Z. 1984. Muscle Sarcocystosis in pheasants and first records of the genus *Sarcocystis* in *Phasianus colchicus* Linné, 1758 in Czechoslovakia. *Folia Parasitol* 31(1): 85-88.
- Černá, Z., Kvašňovská, Z. 1986. Life cycle involving birdbird relation in *Sarcocystis* coccidia with the description of *Sarcocystis accipitris* sp. n. *Folia Parasitol* 33: 305-309.
- Dahlgren, S. S., Gjerde, B. 2007. Genetic characterisation of six *Sarcocystis* species from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway based on the small subunit rRNA gene. *Vet Parasitol* 146(3-4): 204-213.
- Dahlgren, S. S., Gjerde, B., Skirnisson, K., Gudmundsdottir, B. 2007. Morphological and molecular identification of three species of *Sarcocystis* in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Iceland. *Vet Parasitol* 149(3-4): 191-198.
- Dahlgren, S. S., Gjerde, B. 2008. *Sarcocystis* in moose (*Alces alces*): molecular identification and phylogeny of six *Sarcocystis* species in moose, and a morphological description of three new species. *Parasitol Res* 103(1): 93-110.
- Dahlgren, S. S., Gouveia-Oliveira, R., Gjerde, B. 2008. Phylogenetic relationships between *Sarcocystis* species from reindeer and other Sarcocystidae deduced from ssu rRNA gene sequences. *Vet Parasitol* 151(1): 27-35.

- Dahlgren, S. S., Gjerde, B. 2009. *Sarcocystis* in Norwegian roe deer (*Capreolus capreolus*) molecular and morphological identification of *Sarcocystis oviformis* n. sp. and *Sarcocystis gracilis* and their phylogenetic relationships with other *Sarcocystis* species. Parasitol Res 104(5): 993-1003.
- Dahlgren SS, Gjerde B (2010a) Molecular characterization of five *Sarcocystis* species in red deer (*Cervus elaphus*), including *Sarcocystis hjorti* n. sp., reveals that these species are not intermediate host specific. Parasitology 137: 815-840.
- Dahlgren, S. S., Gjerde, B. 2010b. The red fox (*Vulpes vulpes*) and the arctic fox (*Vulpes lagopus*) are definitive hosts of *Sarcocystis alces* and *Sarcocystis hjorti* from moose (*Alces alces*). Parasitology 137(10): 1547-1557.
- Dame, J. B., R. J. Mackay, C. A. Yowell, T. J. Cutler, A. Marsh, AND E. C. Greiner. 1995. *Sarcocystis falcatula* from passerine and psittacine birds: Synonymy with *Sarcocystis neurona*, agent of equine protozoal myeloencephalitis. J Parasitol 81(6): 930-935.
- Doležel, D., Koudela, B., Jirků, M., Hypša, V., Oborník, M., Votýpka, J., Modrý, D., Šlapeta, J. R., Lukeš, J. 1999. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. Int J Parasitol 29(5):795-798.
- Drouin, T. E., Mahrt, J. L. 1979. The prevalence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in some bird species in western Canada, with notes on its life cycle. Can J Zool 57(10): 1915-1921.
- Drouin, T. E., Mahrt, J. L. 1980. The morphology of cysts of *Sarcocystis* infecting birds in western Canada. Can J Zool 58(8): 1477-1482.
- Dubey, J.P. 1980. *Sarcocystis* species in moose (*Alces alces*), bison (*Bison bison*), and pronghorn (*Antilocapra americana*) in Montana. Am J Vet Res 41(12): 2063-2065.

- Dubey, J. P., Speer, C. A. 1985. Prevalence and ultrastructure of three types of *Sarcocystis* in mule deer, *Odocoileus hemionus* (Rafinesque), in Montana. *J Wildl Dis* 21(3): 219-228.
- Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. 1989. *Sarcocystosis of animals and man*. CRC, Boca Raton, FL.
- Dubey, J. P., Davis, S. W., Speer, C. A., Bowman, D. D. de Lahunta, A., Granstrom, D. E., Topper, M. J., Hamir, A. N., Cummings, J. F., Suter M. M. 1991a. *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J Parasitol* 77(2): 212-218.
- Dubey, J. P., Porter, S. L., Hattel, A. L., Kradel, D. C., Topper, M. J., Johnson, L. 1991b. *Sarcocystis*-associated clinical encephalitis in a golden eagle (*Aquila chrysaetos*). *J Zoo Wildl Med* 22(2): 233-236.
- Dubey, J. P., Rudbäck, E., Topper, M. J. 1998. *Sarcocystosis* in capercaillie (*Tetrao urogallus*) in Finland: description of the parasite and lesions. *J Parasitol* 84(1): 104-108.
- Dubey, P. J., Quist, C. F., Fritz, D. L. 2000. Systemic sarcocystosis in a wild turkey from Georgia. *J Wildl Dis* 36(4): 755-760.
- Dubey, J. P., Odening, K. 2001. Toxoplasmosis and related infections. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA (eds) *Parasitic diseases of wild mammals*. Iowa State University Press, Ames, pp 478-519.
- Dubey, J. P., Rosenthal, B. M., Speer, C. A. 2001a. *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. *J Eukaryot Microbiol* 48(5): 595-603.
- Dubey, J. P., Rosypal, A. C., Rosenthal, B. M., Thomas, N. J., Lindsay, D. S., Stanek, J. F., Reed, S. M., Saville, W. J. 2001b. *Sarcocystis neurona* infections in sea otter (*Enhydra lutris*): evidence for natural infections with sarcocysts and transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*). *J Parasitol* 87(6): 1387-1393.

- Dubey, J. P., Saville, W. J., Stanek, J. F., Lindsay, D. S., Rosenthal, B. M., Oglesbee, M. J., Rosypal, A. C., Njoku, C. J., Stich, R. W., Kwok, O. C., Shen, S. K., Hamir, A. N., Reed, S. M. 2001c. *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. *Vet Parasitol* 100(3-4): 117-129.
- Dubey, J. P., Cawthorn, R. J., Speer, C. A., Wobeser, G. A. 2003a. Redescription of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Eukaryot Microbiol* 50(6): 476-482.
- Dubey, J. P., Zarnke, R., Thomas, N. J., Wong, S. K., Bonn, V. W., Briggs, M., Davis, J. W., Ewing, R., Mense, M., Kwok, O. C. H., Romand, S., Thulliez, P. 2003b. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol* 116(4): 275-296.
- Dubey, J. P., Chapman, J. L., Rosenthal, B. M., Mense, M., Schueler, R. L. 2006. Clinical *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* infections in dogs. *Vet Parasitol* 137(1-2): 36-49.
- Dubey, J. P., Rosenthal, B. M., Felix, T. A. 2010. Morphologic and molecular characterization of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *J Parasitol* 96(4):765-770.
- Duncan, R.B., Fox, J. H., Lindsay, D. S., Dubey, J. P, Zuccaro, M. E. 2000. Acute sarcocystosis in a captive white-tailed deer in Virginia. *J Wildl Dis* 36(2): 357-61.
- Dylko, N. I. 1962. Distribution of Sarcosporidia among wild vertebrates in Belorussia. *Dokl Akad Nauk* 6: 399-400.
- Ecco, R., Luppi, M. M., Malta, M. C., Araujo, M. R., Guedes, R. M., Shivaprasad, H. L. 2008. An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. *Avian Dis* 52(4): 706-710.

- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 19(5): 113.
- Ellis, J., Luton, K., Baverstock, P. R., Whitworth, Tenter, A. M., Johnson, A. M. 1994. Phylogenetic relationships between *Toxoplasma* and *Sarcocystis* deduced from a comparison of 18S rDNA sequences. *Parasitology* 110(5): 521-528.
- Ellis, J. T., Holmdahl, O. J. M., Ryce, C., Njenga, J. M., Harper, P. A. W., Morrison, D. A. 2000. Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist* 151(4): 329-336.
- Entzeroth, R., Chobotar, B., Scholtyseck, E., Neméseri, L. 1985. Light and electron microscope study of *Sarcocystis* sp. from the fallow deer (*Cervus dama*). *Z Parasitenkd* 71(1): 33-39.
- Elsheikha, H. M., Lacher, D. W., Mansfield, L. S. 2005. Phylogenetic relationships of *Sarcocystis neurona* of horses and opossums to other cyst-forming coccidia deduced from SSU rRNA gene sequences. *Parasitol Res* 97(5): 345-357.
- Elsheikha, H. M., Scott, H. C., Mansfield, L. S. 2006. Genetic Variation among isolates of *Sarcocystis neurona*, the gent of protozoal myeloencephalitis, as revealed by amplified fragment length polymorphism markers. *Infect Immun* 74(6): 3448-3454.
- Elsheikha, H. M. Mansfield, L. S. 2007. Molecular typing of *Sarcocystis neurona*: current status and future trends. *Vet Parasitol* 149(1-2): 43-55.
- Entzeroth, R. 1982. A comparative light and electron microscope study of the cysts of *Sarcocystis* species of roe deer (*Capreolus capreolus*). *Z Parasitenkd* 66(3): 281-292.
- Erber M., Boch J., Barth D. 1978. Drei Sarkosporidienarten des Rehwildes. *Berl Münch Tierärztl Wsch* 91(24): 482-486.
- Erickson, A. B. 1940. *Sarcocystis* in birds. *Auk* 57:514–519

- Esimov, B. K. 1990. Distribution of Sarcosporidians in wild boar (*Sus scrofa*) in Kazakhstan. From the book: abstracts of young scientists reports from the three regional conferences. Material report. 21-23 March, 1982. Ulan-Ude, 89-90.
- Espinosa, R. H., Sterner, M. C., Blixt, J. A. 1988 Description of a species of *Sarcocystis* (Apicomplexa: Sarcocystidae), a parasite of the northern saw-whet owl, *Aegolius acadicus*, and experimental transmission to deer mice *Peromyscus maniculatus*. Can J Zool 66(10): 2118-2121.
- Fayer, R. 1972. Gametogamy of *Sarcocystis* sp. in cell culture. Science 175(17): 65-67.
- Fayer, R., Leek, R. G., Lynch, G. P. 1982. Attempted transmission of *Sarcocystis bovicanis* from cows to calves via colostrum. J Parasitol 68(6): 1127-1129.
- Fayer, R. 2004. *Sarcocystis* spp. in human infections. Clin Microbiol Rev 17(4) 894-902.
- Fedynich, A., M., Pence, D. B. 1992. *Sarcocystis* in mallards on the Southern High Plains of Texas. Avian Dis 36(4): 1067-1069.
- Fenger, C. K., Granstrom, D. E., Gajadhar, A. A. Williams, N. M., McCrillis, S. A., Stamper, S., Langemeier, J. L., Dubey, J. P. 1997. Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). Vet Parasitol 68(3): 199-213.
- Foreyt, W. J., Baldwin, T. J., Lagerquist J. E. 1995 Experimental infections of *Sarcocystis* spp. in Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus*) calves. J Wildl Dis 31(4): 462-466.
- Frenkel, J. K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. J Parasitol 63(4): 611-628.
- Frenkel, J. K., Smith, D. D. 2003. Determination of the genera of cyst-forming coccidian. Parasitol Res 91(5): 384-389.

- Fritz, D. L., Dubey, J. P. 2002. Pathology of *Sarcocystis neurona* in interferon-gamma gene knockout mice. *Vet Pathol* 39(1): 137-140.
- Fukuyo, M., Battsetseg, G., Byambaa, B. 2002. Prevalence of *Sarcocystis* infection in horses in Mongolia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33(4): 718-719
- Gajadhar, A. A., Marquardt, W. C. 1992. Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Can J Vet Res* 56(1): 41-46.
- Geisel, O., Kaiser, E., Vogel, O., Krampitz, H. E. Rommel, M. 1979. Pathomorphologic findings in short-tailed voles (*Microtus agrestis*) experimentally-infected with *Frenkelia microti*. *J Wildl Dis* 15(2): 267-70.
- Gjerde, B. 1985. Ultrastructure of the cysts of *Sarcocystis grueneri* from cardiac muscle of reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Z Parasitenkd* 71(2): 189-198.
- Gjerde, B., Dahlgren, S. S. 2010. Corvid birds (Corvidae) act as definitive hosts for *Sarcocystis ovalis* in moose (*Alces alces*). *Parasitol Res* 107(6):1445-1453.
- Gjerde, B. 2011. Morphological and molecular characterization and phylogenetic placement of *Sarcocystis capreolicanis* and *Sarcocystis silva* n. sp. from roe deer (*Capreolus capreolus*) in Norway. *Parasitol Res* (DOI 10.1007/s00436-011-2619-6).
- Göbel, E., Rommel, M., Krampitz, H. E. 1978. Untersuchungen zur ungeschlechtlichen Vermehrung von *Frenkelia* in der Leber der Röteldmaus. *Z Parasitenkd* 55(1): 29-42.
- Goldová, M., Tóth, Š., Letková, V., Mojžišová, J., Ciberej, J., Konjevič, D., Kočišová, A., Slavica, A. 2008. Sarcocystosis in cloven-hoofed game in Slovak republic. *Nat Croat* 17(4): 303-309.
- Gower, C. 1938. A new host and locality record for *Sarcocystis rileyi* (Stiles, 1803). *J Parasitol* 24: 378.

- Grikienienė, J., Senutaitė, J. 1995. Sarcosporidians (*Sarcocystis*) and *Trichinella* (*Trichinella*) of wild boar in Lithuania (prevalence, species composition, epizootological and epidemiological significance). *Ekologija* 4: 28-35.
- Grikienienė, J., Iezhova, T. 1998. The prevalence of *Sarcocystis* in some wild birds and poultry in Lithuania and in neighbouring territories. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology* 8(2): 61-62.
- Grikienienė, J., Kutkienė, L. 1999. The spread and species diversity of *Sarcocystis* in some animal and bird species in Lithuania. The structurally functional state of the wildlife biological diversity in Belarus. Abstracts of the 8th scientific conference on zoology, Minsk, 379-380.
- Grikienienė, J., Malakauskas, M., Mažeikytė R., Balčiauskas, L., Senutaitė, J. 2001. Lietuvos laukinių žinduolių raumenų parazitai (*Sarcocystis*, *Trichinella*, *Alaria*). *Theriologia Lituanika* 1: 29-46.
- Gustafsson, K., Book, M., Dubey, J. P., Uggla, A. 1997. Meningoencephalitis in capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) caused by a *Sarcocystis*-like organism. *J Zoo Wildl Med* 28(3): 280-284.
- Henderson, J. M., Dies, K. H., Haines, D. M., Higgs, D. W., Ayroud, M. 1997. Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep. *Can Vet J* 38(3): 168-170.
- Hernández-Rodríguez, S., Navarrete, I., Martínez-Gómez, F. 1981. *Sarcocystis cervicanis*, nueva especie parasita del ciervo (*Cervus elaphus*). *Rev Ibér Parasitol* 41(1): 43-51.
- Heydorn, A. O., Gestrich, R., Mehlhorn, H., Rommel, M. 1975. Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. *Z Parasitenkd* 48(2): 73-82.
- Holmdahl, O. J., Morrison, D. A., Ellis, J. T., Huong, L. T. 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small subunit rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 11(1): 27-37.

- Hoppe, D. M. 1976. Prevalence of macroscopically detectable *Sarcocystis* in North Dakota ducks. *J Wildl Dis* 12(1): 27-29.
- Hvizdošová, N., Goldová, M. 2009. Monitoring of occurrence of sarcocystosis in hoofed game in eastern Slovakia. *Folia Veterinaria* 53(1): 5-7.
- Jeffries, A. C., Schnitzler, B., Heydorn, A. O., Johnson, A. M., Tenter, A. M. 1997. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis* based on 18S rDNA sequences comparison. *J Eukaryot Microbiol* 44(5): 388-392.
- Jenkins, M. C., Ellis, J. T., Liddell, S., Ryce, C., Munday, B. L., Morrison, D. A., Dubey, J. P. 1999. The relationship of *Hammondia hammondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst forming coccidian as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. *Parasitology* 119(2): 135-142.
- Johnson, A. M., Illana, S., Hakendorf, P., Baverstock, P. R. 1998. Phylogenetic relationships of the apicomplexian protist *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparison. *J Parasitol* 74(5): 847-860.
- Jehle, C., Dinkel, A., Sander, A., Morent, M., Romig, T., Luc, P. V., De, T. V., Thai, V. V., Mackenstedt, U. 2009. Diagnosis of *Sarcocystis* spp. in cattle (*Bos taurus*) and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Northern Vietnam. *Vet Parasitol* 166(3-4): 314-320.
- Jensen, R., Alexander, A. F., Dahlgren, R. R., Jolley, W. R., Marquardt, W. C., Flack, D. E., Bennett, B. W., Cox, M. F., Harris, C. W., Hoffmann, G. A. 1986. Eosinophilic myositis and muscular sarcocystosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *Am J Vet Res* 47(3): 587-93.
- Kaiser, I. A., Markus, M. B. 1983a. Species of *Sarcocystis* in wild South African birds. *Proc Electron Microscop Soc S Afr* 13: 103-104.
- Kaiser, I. A., Markus, M. B. 1983b. *Sarcocystis* infection in wild Southern African birds. *S Afr J Sci* 79: 470-471.
- Kalisińska, E., Betlejewska, K. M., Schmidt, M., Goździcka-Józefiak, A., Tomczyk, G. 2003. Protozoal macrocysts in the skeletal muscles of a

- mallard duck in Poland: the first recorded case. *Acta Parasitol* 48(1): 1-5.
- Kalyakin, V. N., Zasukhin, D. N. 1975. Distribution of *Sarcocystis* (Protozoa: Sporozoa) in vertebrates. *Folia Parasitol* 22(4): 289-307.
- Kavai, A., Sugar, L. Megfigyelesek vadállományunk Sarcosporidium-fertozöttsegerol. 1977. *Parasitol Hung* 9(9): 17-19.
- Koudela, B., Modrý D. 2000. *Sarcocystis muris* possesses both diheteroxenous and dihomoxenous characters of life cycle. *J Parasitol* 86(4) 877-879.
- Krampitz, H. E., Rommel, M., Geisel, O., Kaiser, E. 1976. Beiträge zum Lebenszyklus der Frenkelien. II. Die ungeschlechtliche Entwicklung von *Frenkelia clethrionomyobuteonis* in der Rötelmaus. *Z Parasitenkd* 51(1): 7-14.
- Krone, O., Rudolph, M., Jakob, W. 2000. Protozoa in the breast muscle of raptors in Germany. *Acta Protozool* 39(1): 35-42.
- Kutkienė, L., Griekienienė, J., Sruoga, A., Paulauskas, A. 1998. On the distribution of *Sarcocystis* in waterfowl birds in Lithuania. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology* 8(2): 69.
- Kutkienė, L. 2001. The species composition of European roe deer (*Capreolus capreolus*) *Sarcocystis* in Lithuania. *Acta Zool Lituanica* 11(1): 97-101.
- Kutkienė, L., Baleišis, R. 2001. Investigations of muscle parasites of game animals in Molėtai, Širvintos and Ukmergė districts. *Theriologia Lituanica* 1: 96-104.
- Kutkienė, L. 2002. On the investigations of *Sarcocystis* (Protista: Coccidia) fauna in moose (*Alces alces*) in Lithuania. *Acta Zool Lituanica* 12(1): 82-85.
- Kutkienė, L. 2003. Investigation of red deer (*Cervus elaphus*) *Sarcocystis* species composition in Lithuania. *Acta Zool Lituanica* 13(3): 390-395.
- Kutkienė, L., Griekienienė, J. 2003. The importance of coprophagy and transplacental transmission in spread of *Sarcocystis rodentifelis* in rats. *Acta Zool Lituanica* 13(3): 322-326.

- Kutkienė, L., Sruoga, A. 2004. *Sarcocystis* spp. in birds of the order Anseriformes. *Parasitol Res* 92(2): 171-172.
- Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2006. *Sarcocystis* sp. from white-fronted goose (*Anser albifrons*): cyst morphology and life cycle studies. *Parasitol Res* 99(5): 562-565.
- Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2008. *Sarcocystis* sp. from the goldeneye (*Bucephala clangula*) and the mallard (*Anas platyrhynchos*): cyst morphology and ribosomal DNA analysis. *Parasitol Res* 102(4): 691-696.
- Lagerquist, J. E., Foreyt, W. J. 1993. Prevalence of *Sarcocystis* in elk (*Cervus elaphus*) in Oregon. *Northwest Science* 67(3): 196-198.
- Lainson, R., Shaw, J. J. 1971. *Sarcocystis gracilis* n. sp. from the Brazilian tortoise *Kinosternon scorpioides*. *J Protozool* 18(3): 365-372.
- Levine, N. D. 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. *J Parasitol* 72(3): 372-382.
- Levine, N. D., Tadros, W. 1980. Named species and hosts of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *Syst Parasitol* 2(1): 41-59.
- Lindsay, D. S., Blagburn, B. L. 1999. Prevalence of encysted apicomplexans in muscles of raptors. *Vet Parasitol* 80(4): 341-344.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Horton, K. M., Bowman, D. D. 1999. Development of *Sarcocystis falcatula* in cell cultures demonstrates that it is different from *Sarcocystis neurona*. *Parasitology* 118(3): 227-233.
- Mahrt, J. L., Colwell, D. D. 1980. *Sarcocystis* in wild ungulates in Alberta. *J Wildl Dis* 16(4): 571-576.
- Malakauskas, M., Grikiėnienė, J., Januškevičienė, G. 2001. Mėšai mėdžiojamų žvėrių sarkocistozė. *Veterinarija ir Zootechnika* 14(36): 36-43.
- Malakauskas, M., Grikiėnienė, J. 2002. *Sarcocystis* infection in wild Ungulates in Lithuania. *Acta Zool Lithuanica* 12(4): 372-380.
- Mansfield, L. S., Mehler, S., Nelson, K., Elsheikha, H. M., Murphy, A. J., Knust, B., Tanhauser, S. M., Gearhart, P. M., Rossano, M. G., Bowman, D. D., Schott, H. C., Patterson, J. S. 2008. Brown-headed cowbirds

- (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. *Vet Parasitol* 153(1-2): 24-43.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Tell, L., Bowmann, D. D., Conrad, P. A., Ketcherside, C., Green, T. 1999. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. *J Parasitol* 85(4): 750-757.
- Matuschka, F. R. 1987. Reptiles as intermediate and/or final hosts of Sarcosporidia. *Parasitol Res* 73(1): 22-32.
- Matuschka, F. R., Bannert, B. 1987. Cannibalism and autotomy as predator-prey relationship for monoxenous Sarcosporidia. *Parasitol Res* 74(1): 88-93.
- Mehlhorn, H., Heydorn, A. O. 1978. The Sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. *Adv Parasitol* 16: 43-91.
- Miller, M. A., Sverlow, K., Crosbie, P. R., Barr, B. C., Lowenstine, L. J., Gulland, F. M., Packham, A., Conrad, P. A. 2001. Isolation and characterization of two parasitic protozoa from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) with meningoencephalomyelitis. *J Parasitol* 87(4): 816-822.
- Modrý D., Votýpka J., Svobodová M. 2004. Note on the taxonomy of *Frenkelia microti* (Findlay & Middleton, 1934) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Syst Parasitol* 58(3): 185-187.
- Moorman, T. E., Baldassarre, G. A., Richard, D. M. 1991. The frequency of *Sarcocystis* spp. and its effect on winter carcass composition of mottled ducks. *J Wildl Dis* 27(3): 491-493.
- Morrison, D. A., Bornstein, S., Thebo, P., Kernery, U., Kinne, J., Mattsson, J. G. 2004. The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). *Int J Parasitol* 34(4): 501-514.
- Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Johnson, A. M., Luton, K., Dubey, J. P., Votýpka, J., Tenter, A. M. 1999. Phylogenetic relationships of the genus *Frenkelia*: a review of its history and new knowledge gained from

- comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. *Int J Parasitol* 29(6): 957-972.
- Mugridge, N. B., Morrison, D. A., Jäkel, T., Heckerroth, A. R., Tenter, A. M., Johnson, A. M. 2000. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Mol Biol Evol* 17(12): 1842-1853.
- Munday, B. L., Hartley, W. J., Harrigan, K. E., Prezidente, P. J. A., Obendorf, D. L. 1979. *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: II. Survey findings in birds, reptiles, amphibians and fish. *J Wildl Dis* 15(1): 57-73.
- Narisawa, A., Yokoi, S., Kawai, K., Sakui, M., Sugawara, K. 2008. *Sarcocystis* spp. infection in wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). *J Jap Vet Med Ass* 61: 321-323.
- Navarette, I., Hernández, S., Calero, R., Martinez, F. 1978. The dog as a final host for *Sarcocystis* sp. from the red deer (*Cervus elaphus*). Fourth International Congress of Parasitology, Warszawa, 65-70.
- Odening, K., Stolte, M., Walter, G., Bockhardt, I. 1994a. The European badger (Carnivora: Mustelidae) as intermediate host of further three *Sarcocystis* species (Sporozoa). *Parasite* 1(1): 23-30.
- Odening, K. 1997 Die *Sarcocystis*-Infektion: Wechselbeziehungen zwischen freilebenden Wildtieren, Haustieren und Zootieren. *Der Zoologische Garten* 67: 317-340.
- Odening, K. 1998. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Syst Parasitol* 41(3): 209-233.
- O'Donoghue, P., Rommel, M. 1992. Australian-German collaborative studies on the immunology of *Sarcocystis* infections. *Angew Parasitol* 33(2) 102-119.
- Olias, P., Gruber, A. D., Heydorn, A. O., Kohls, A., Mehlhorn, H., Hafez, H. M., Lierz, M., 2009. A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. *Avian Pathol* 38(2): 121-128.

- Olias, P., Gruber, A. D., Kohls, A., Hafez, H. M., Heydorn, A. O., Mehlhorn, H., Lierz, M., 2010a. *Sarcocystis* species lethal for domestic pigeons. *Emerg Infect Dis* 16(3): 497-499.
- Olias, P., Gruber, A. D., Hafez, H. M., Heydorn, A. O., Mehlhorn, H., Lierz, M., 2010b. *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. *domestica*) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): light and electron microscopical characteristics. *Parasitol Res* 106(3): 577-585.
- Olias, P., Olias, L., Lierz, M., Mehlhorn, H., Gruber, A. D. 2010c. *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Vet Parasitol* 171(1-2): 7-14.
- Page, R. D. M. 1996. Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12(4): 357-358.
- Pampllett, R., O'Donoghue, P. 1990. *Sarcocystis* infection of human muscle. *Aust N Z J Med* 20(5): 705-707.
- Pak, S. M., Eshtokina, N. V. 1984. Sarcosporidians of birds. In: Panin VJ (ed) *Sarcosporidians of animals in Kazakhstan*. Nauka, Alma-Ata, pp 150-168.I
- Partenheimer-Hannemann, C. 1991. Untersuchung zum Vorkommen von Sarkosporidien bei Reh- und Rotwild im Raum Bitburg-Prüm (Rheinland-Pfalz). Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, Germany.
- Pellegrini, M., Manding, J., Davidson, N. 1977. Sequence arrangement of the rDNA of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 10(2): 213-214.
- Pinayeva, L. M., Pak, C. M., Kokono, L. I. 1998. *Sarcocystis* of the wild birds of Kazakhstan. *Parasitol Int* 47(Suppl.): 143.
- Poulin, R. 1993. The disparity between observed and uniform distributions: a new look at parasite aggregation. *Int J Parasitol* 23(7): 937-944.

- Poulin, R., Mouillot, D. 2005. Combining phylogenetic and ecological information into a new index of host specificity. *J Parasitol* 91(3): 511-514.
- Poulin, R. 2007. Evolutionary ecology of parasites. Princeton University Press, Princeton.
- Rajković-Janje, R., Sabolić, M., Bosnić, S., Auslender, V. 2004. *Sarcocystis* sp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) from northern Croatia. *Eur J Wild Res* 50: 95-96.
- Reiczigel, J. 2003. Confidence intervals for the binomial parameter: some new considerations. *Stat Med* 22(4): 611-621.
- Rommel, M., Krampitz, H. E., Geisel, O. 1977. Beiträge zum lebenszyklus der Frenkelien. III. Die sexuelle entwicklung von *F. clethrionomyobuteonis* im Mäusebussard. *Z Parasitenkd* 51(2): 139-146.
- Rommel, M. (1978). Vergleichende Darstellung der Entwicklungsbiologie der Gattungen *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Isospora*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Toxoplasma* und *Besnoitia*. *Z Parasitenkd* 57(3): 269-283.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572-1574.
- Rosenthal, B. M., Dunams, D. B., Pritt, B. 2008. Restricted genetic diversity in the ubiquitous cattle parasite, *Sarcocystis cruzi*. *Infect Genet Evol* 8(5): 588-592.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer 3 on the WWW for the general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- Rozsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *J Parasitol*, 86(2): 228-232.
- Santini, S., Mancianti, F., Nigro, M., Poli, A. 1997. Ultrastructure of the cyst wall of *Sarcocystis* sp. in roe deer. *J Wildl Dis* 33(4): 853-859.
- Saville, W. J. A., Reed, S. M., Dubey, J. P. 2002. Prevention of protozoal myeloencephalitis (EPM). *AAEP Proceedings*, 48:181-185.

- Schramlová J., Blažek K. 1978. Ultrastruktur der Cystenwand der Sarkosporidien des Rehes (*Capreolus capreolus* L.). Z Parasitenkd 55(1): 43-48.
- Schultze, K. 1988. Erkrankungen nach dem Verzehr von massiv mit Sarkosporidien befallenem Rehfleisch. Fleischwirtschaft 68(9): 1139-1140.
- Shekarforoush, S. S., Shakerian, A., Hasanpoor, M. M. 2006. Prevalence of *Sarcocystis* in slaughtered one-humped camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. Trop Anim Health Prod 38(4): 301-303.
- Sedlacek J., Wesemeier H.-H. 1995. On the diagnosis and nomenclature of *Sarcocystis* species (Sporozoa) in roe deer (*Capreolus capreolus*). Appl. Parasitol. 36(2): 73-82.
- Smith, D. D. 1981. The Sarcocystidae: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Hammondia*, and *Cystoisospora*. J Protozool 28(2): 262-266.
- Smith, J. H., Neill, Box, E. D. 1989. Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). III. Pathologic and quantitative parasitologic analysis of extrapulmonary disease. J Parasitol 75(2):270-287.
- Smith, J. H., Neill, P. J., Dillard, E. A. 3rd., Box, E. D. 1990. Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of canaries (*Serinus canaries*) and pigeons (*Columba livia*). J Parasitol 1990. 76(1): 59-68.
- Speer, C. A., Dubey, J. P. 1982. *Sarcocystis wapiti* sp. nov. from the North American wapiti (*Cervus elaphus*) Can J Zool 60(5): 881-888.
- Spickschen, C., Pohlmeier, K. 2002: Investigation on the occurrence of Sarcosporidia in roe deer, red deer and moufflon from two different natural habitats in Lower Saxony. Z Jagdwiss 48: 35-48.
- Stanek, J. F., Stich, R. W., Dubey, J. P., Reed, S. M., Njoku, C. J., Lindsay, D. S., Schmall, L. M., Johnson, G. K., LaFave, B. M., Saville, W. J. 2003. Epidemiology of *Sarcocystis neurona* infections in domestic cats (*Felis domesticus*) and its association with equine protozoal myeloencephalitis

- (EPM) case farms and feral cats from a mobile spay and neuter clinic. *Vet Parasitol*, 117, 239-249.
- Suedmeyer, W. K., Bermudez, A. J., Barr, B. C., Marsh, A. E. 2001. Acute pulmonary *Sarcocystis falcatula*-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*) housed indoors. *J Zoo Wildl Med* 32(2): 252-256.
- Šlapeta, J. R., Modrý, D., Votýpka, J., Jirků, M., Koudela, B., Lukeš, J. 2001. Multiple origin of the dihomoxenous life cycle in Sarcosporidia. *Int J Parasitol* 31(4): 413-417.
- Šlapeta, J. R., Kyselová, I., Richardson, A. O., Modrý, D., Lukeš, J. 2002a. Phylogeny and sequence variability of the *Sarcocystis singaporensis* Zaman and Colley, (1975) 1976 ssrDNA. *Parasitol Res* 88(9): 810-815.
- Šlapeta, J. R., Modrý, D., Kyselová, I., Hořejš, R., Lukeš, J., Koudela, B. 2002b. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol* 109(3-4): 157-167.
- Šlapeta, J.R., Koudela, B., Votýpka, J., Modrý, D., Hořejš, R., Lukeš, J. 2002c. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Vet J* 163(2): 147-154.
- Šlapeta, J. R., Modrý, D., Votýpka, J., Jirků, M., Lukeš, J., Koudela, B. 2003. Evolutionary relationships among cyst-forming coccidia *Sarcocystis* spp. (Alveolata: Apicomplexa: Coccidea) in endemic African tree vipers and perspective for evolution of heteroxenous life cycle. *Mol Phylogenet Evol* 27(3): 464-475.
- Tadros, W., Laarman, J. J. 1978. Apparent congenital transmission of *Frenkelia* (Coccidia: Eimeriidae): first recorded incident. *Z Parasitenkd* 58(1): 41-46.
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* (doi:10.1093/molbev/msr121).

- Tanhauser S. M., Yowell, C. A., Cutler, T. J., Greiner, E. C., Mackay, R. J., Dame, J. B. 1999. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. *J Parasitol* 85(2): 221-228.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lect Math Life Sci* 17:57-86.
- Tenter, A. M., Baverstock, P. R., Johnson, A. M. 1992. Phylogenetic relationships of *Sarcocystis* species from sheep, goats, cattle and mice based on ribosomal RNA sequences. *Int J Parasitol* 22(4): 503-513.
- Tenter, A. M. 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int J Parasitol* 25(11): 1311-1330.
- Tenter, A. M., Johnson, A. M. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasitol* 39: 69-139.
- Thomas, V., Dissanaiké, A. S. 1978. Antibodies to *Sarcocystis* in Malaysians. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72(3): 303-306.
- Tropilo, J., Katkiewicz, M. T., Wisniewski, J. 2001. *Sarcocystis* spp. infection in free-living animals: wild boar (*Sus scrofa*), deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*). *Polish Journal of Veterinary Sciences* 4: 15-18.
- Uggla, A., Buxton, D. 1990. Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *9(2)*: 441-462.
- Upton, S. J., McKown, R. D. 1992. The red-tailed hawk, *Buteo jamaicensis*, a native definitive host of *Frenkelia microti* (Apicomplexa) in North America. *J Wildl Dis* 28(1): 85-90.
- Van den Enden E. M., Praet, R. J., Van Gompel, A., Gigasse, P. 1995. Eosinophilic myositis resulting from sarcocystosis. *Am J Trop Med Hyg* 98(4): 273-276.
- Votýpka, J., Hypša, V., Jirků, M., Flegr, J., Vávra, J., Lukeš, J. 1998. Molecular phylogenetic relatedness of *Frenkelia* spp. (Protozoa,

- Apicomplexa) to *Sarcocystis falcatula* Stiles 1893: is the genus *Sarcocystis* paraphyletic? J Eukaryot Microbiol 45(1):137-141.
- Wenyon, C. M. 1926. Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists, 2 volumes. Tindall & Cox, Baillitre, London.
- Wesemeier, H-H, Sedlacek, J. 1995a. One known *Sarcocystis* species and two found for the first time in red deer and wapiti (*Cervus elaphus*) in Europe. Appl Parasitol 36(4): 245-251.
- Wesemeier, H-H., Sedlacek, J. 1995b. One known *Sarcocystis* species and one found for the first time in fallow deer (*Dama dama*). Appl Parasitol 36(4): 299-302.
- Wicht, R. J. 1981. Transmission of *Sarcocystis rileyi* to the striped skunk (*Mephitis mephitis*). J Wildl Dis 17(3): 387-388.
- Wichware, A. B. 1944. Sarcosporidiosis in a black duck. Can J Comp Med 8(1): 15-17.
- Wobeser, G., Leighton, F. A., Cawthorn, R. J. 1981. Occurrence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in wild geese in Saskatchewan. Can J Zool 59(8):1621-1624.
- Wobeser, G., Cawthorn, R. J. 1982. Granulomatous myositis in association with *Surcocystis* sp. infection in wild ducks. Avian Dis 26(2): 412-418.
- Xiang, Z., Chen, X., Yang, L., He, Y., Jiang, R., Rosenthal, B. M., Luan, P., Attwood, S. W., Zuo, Y., Zhang, Y. P., Yang, Z. 2009. Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. Parasitol Int 58(3): 293-296.
- Yabsley, M. J., Ellis, A. E., Stallknecht, D. E., Howerth, E. W. 2009. Characterization of *Sarcocystis* from four species of hawks from Georgia, USA. J Parasitol 95(1): 256-259.
- Yang, Z. Q., Zuo, Y. X., Yao, Y. G., Chen, X. W., Yang, G. C., Zhang, Y. P. 2001a. Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. Mol Biochem Parasitol 115(2): 283-288.

Yang, Z. Q., Zuo, Y. X., Ding, B., Chen, X. W., Luo, J., Zhang, Y. P. 2001b.
Identification of *Sarcocystis hominis*-like (Protozoa: Sarcocystidae) cyst
in water buffalo (*Bubalus bubalis*) based on 18S rRNA gene sequences.
J Parasitol 87(4): 934-937.

Disertacijos tema publikuoti straipsniai

1. Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkienė, L., **Prakas, P.** 2007. Investigation of the phylogenetic relationships of *Sarcocystis* spp. from greylag (*Anser anser*) and white-fronted (*Anser albifrons*) geese to other cyst forming coccidia using 18S and 28S rRNA gene sequences. Acta Zool Lituanica 17(2): 124-127.
2. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkienė, L. 2008. Genetic characterisation of *Sarcocystis* species from European roe deer (*Capreolus capreolus*) based on ssu rRNA gene partial sequences. Animal Husbandary 51: 83-91.
3. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2009. *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). Parasitol Res 104(2): 329-336.
4. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2010. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). Parasitol Res 107(4): 879-888.
5. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Identification of *Sarcocystis rileyi* from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) in Europe: cyst morphology and results of DNA analysis. Parasitol Res 108(3): 709-714.
6. **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. Parasitol Res (DOI 10.1007/s00436-011-2421-5).
7. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. Parasitol Res (DOI 10.1007/s00436-011-2588-9).

8. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A., Švažas, S., Kutkienė, L. 2011. Identification of *Sarcocystis columbae* in wood pigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika* 55(77): 33-39.

Konferencijų tezės

1. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A. 2009. *Sarcocystis* spp. in the mallards (*Anas platyrhynchos*) and in the bird family Turdidae. The 3rd Symposium of the Scandinavian Baltic Society for Parasitology: 27. Riga.
2. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A. Kutkienė, L. 2009. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. from some bird species based on ssu rRNA gene sequence analysis. 5th International Conference Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region: 108. Daugavpils.
3. **Prakas, P.** 2009. Molecular investigation of *Sarcocystis* spp. in the birds order Anseriformes. 4th International Student Conference Biodiversity and functioning of aquatic ecosystems in the Baltic sea region: 28. Dubingiai.
4. **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Investigations of *Sarcocystis* spp. in birds of the order Anseriformes. The IVth Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP): 56. Oslo.
5. Butkauskas, D., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Kutkienė, L., Švažas, S. 2011. Investigation of *Sarcocystis* in domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica) and woodpigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. The IVth Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP): 75. Oslo.
6. Švažas, S., **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Sarcocysts *Sarcocystis columbae* detected in woodpigeons *Columba*

palumbus. XXXth IUGB (International Union of Game Biologist)
Congress and Perdix XIII: 286. Barcelona.

Padėkos

Esu dėkingas darbo vadovui dr. (hb.) Daliui Butkauskui už vadovavimą, pasitikėjimą, vertingus patarimus, visokeriopą pagalbą, supratimą, optimistinį požiūrį bei ryžtingumo skatinimą; darbo konsultantui prof. habil. dr. Aniolui Sruogai už pagalbą planuojant bei organizuojant medžiagos rinkimo bei tyrimo darbus, toliaregiškus patarimus. Nuoširdžiai dėkoju dr. Liudai Kutkienei už pagalbą sarkocistų morfologiniuose tyrimuose, draugiškumą, praktines bei teorines žinias. Labai dėkoju dr. Jitender P. Dubey iš gyvūnų ir gamtinių išteklių instituto, JAV ir dr. Jan Votýpka iš Karlo universiteto, Čekija už vertingus patarimus vertinant tyrimų rezultatus. Dėkoju Irenai Žalakevičienei už pagalbą atliekant sarkocistų elektroninės mikroskopijos tyrimus. Esu dėkingas Gamtos Tyrimų Centro darbuotojui Valentinui Pabrinkiui, žvėrienos perdėbimo įmonės UAB „Viltlit“ vadovui Jonui Vyšniauskui, Nacionalinio Maisto ir Veterinarijos Rizikos vertinimo Instituto, Molekulinės Biologijos ir Genetiškai Modifikuotų organizmų tyrimų skyriaus vedėjui dr. Vaclovui Jurgelevičiui už pagalbą renkant mėginius tyrimams. Dėkoju Gamtos Tyrimų Centro Ekologijos Instituto Molekulinės Ekologijos laboratorijos kolektyvui už draugišką atmosferą ir palaikymą.

Taip pat dėkoju Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už finansinę paramą atliekant dalį tyrimų disertacijos tema.