

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**  
**GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS**  
**AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA**



**Petras Prakas**

**Paukščiuose aptinkamų neapibūdintų *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinių  
ryšių tyrimas naudojant dalines 18S ir 28S rRNR genų sekas**

**Magistro darbas**

**(Mikrobiologija)**

**Mokslinis vadovas:**

**dr. Dalius Butkauskas**

**Darbas atliktas:**

**Vilniaus Universiteto Ekologijos Institute**

**VILNIUS, 2007**

# TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS .....	3
ĮVADAS .....	4
TIKSLAS IR UŽDAVINIAI .....	5
LITERATŪROS APŽVALGA .....	6
1. <i>Sarcocystis</i> sistematika ir taksonomija .....	6
1.1. <i>Sarcocystis</i> genties sisteminė padėtis .....	6
1.2. <i>Sarcocystis</i> genties taksonominis skirstymas Sarcocystidae šeimoje.....	6
2. Įvadas į <i>Sarcocystis</i> gentį .....	7
2.1. <i>Sarcocystis</i> genties istoriniai aspektai .....	7
2.2. <i>Sarcocystis</i> genties pagrindiniai bruožai .....	8
3. <i>Sarcocystis</i> biologijos pagrindinės ypatybės .....	8
3.1. <i>Sarcocystis</i> cistos sandara.....	8
3.2. <i>Sarcocystis</i> gyvybinis ciklas .....	9
3.3. <i>Sarcocystis</i> geografinis pasiskirstymas .....	11
3.4. <i>Sarcocystis</i> transmisija .....	11
4. <i>Sarcocystis</i> patogenezė .....	12
4.1. <i>Sarcocystis</i> sukeltos ligos .....	12
4.2. <i>Sarcocystis</i> patogeniškumas tarpiniuose šeimininkuose .....	13
4.3. <i>Sarcocystis</i> patogeniškumas galutiniuose šeimininkuose .....	14
4.4. Sarkocistozės ekonominė žala.....	14
4.5. <i>Sarcocystis</i> epidemiologija .....	15
4.6. <i>Sarcocystis</i> kontrolė.....	16
5. <i>Sarcocystis</i> įvairiose organizmų grupėse.....	16
5.1. <i>Sarcocystis</i> žmonėse .....	16
5.2. Raumeninio audinio sarkocistozė žmonėse.....	17
5.3. Žarnyno sarkosporidiozė žmonėse .....	18
5.4. <i>Sarcocystis</i> žinduoliuose.....	18
5.5. <i>Sarcocystis</i> paukščiuose .....	20
6. <i>Sarcocystis</i> identifikacija, klasifikacija ir filogenezė .....	21
6.1. <i>Sarcocystis</i> fenetinė analizė.....	21
6.2. <i>Sarcocystis</i> šeimininkų specifiškumas .....	23
6.3. Molekuliniai žymenys, naudojami <i>Sarcocystis</i> genties filogenetinėje analizėje.....	23
6.4. <i>Sarcocystis</i> ir <i>Frenkelia</i> genčių filogenetiniai ryšiai .....	25
6.5. <i>Sarcocystis</i> filogenetiniai tyrimai .....	26
MEDŽIAGA IR METODAI .....	28
1. Medžiagos paėmimas .....	28
2. Mikroskopinė sarkocistų analizė .....	28
3. DNR išskyrimas.....	29
4. DNR švarumo ir kiekio nustatymas spektrofotometru .....	29
5. Polimerazės grandininė reakcija.....	30
6. DNR elektroforezė agarozės gelyje .....	30
7. Pavyzdžių paruošimas sekvenavimui .....	31
8. Molekulinių duomenų analizė .....	31
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	33
IŠVADOS .....	44
LITERATŪRA .....	45
PADĖKA .....	51
SUMMARY .....	52
SANTRAUKA .....	53

## SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

A, C, G, T – adeninas, citozinas, guaninas, timinas;

AFLP – amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *amplified fragment length polymorphisms*);

bp – bazių pora;

D – optinis tankis;

DNR – deoksiribonukleorūgštis;

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – deoksiribonukleotidas;

EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;

EPM – arklių protozoininis mieloencefalitas (ang. *equine protozoal myeloencephalitis*);

ITS – vidinis transkribuojamas tarpiklis ITS1 (angl. *internal transcribed spacer*);

ITS1 – tarp 18S rRNR ir 28S rRNR esantis ITS;

LD<sub>50</sub> – letali dozė, kuriai esant žūsta 50% tiriamųjų;

mg – miligramai;

ml – mililitrai;

mM – milimoliai;

ng – nanogramai;

nm – nanometrai;

nt – nukleotidas;

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;

RAPD – atsitiktinai amplifikuota polimorfinė DNR (angl. *random amplified polymorphic DNA*);

rDNR – ribosominės RNR genas;

RFLP – restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl. *restriction fragment length polymorphism*);

RNR – ribonukleorūgštis;

rRNR – ribosominė RNR;

S – sedimentacijos koeficientas;

TAE – tris - acetatinis EDTA buferis;

Tris – tris(hidroksimetil) aminometanas;

V – voltai;

μl – mikrolitrai;

μg – mikrogramai.

## IVADAS

*Sarcocystis* genties atstovai yra protozoiniai viduląsteliniai parazitai, kuriems būdingas obligatinis vystymasis dviejuose šeimininkuose. Nelytinė parazito dauginimosi fazė vyksta tarpiniame šeimininke, kurio raumenyse ar centrinėje nervų sistemoje susiformuoja sarkocistos, o lytinės stadijos oocistos sporuliuoja galutinių šeimininkų žarnyne. *Sarcocystis* rūšių šeimininkų spektras platus: žinduoliai, paukščiai, šaltakraujai gyvūnai. Keletas *Sarcocystis* rūšių yra svarbūs žmogaus bei naminių gyvūnų patogenai.

Sarkosporidijų infekcijos daugiausia pasireiškia jų tarpiniuose šeimininkuose, o patogeniškumas priklauso nuo rūšies bei dozės. Žmonių sarkosporidiozės atvejai nėra dažni ir daugiausiai fiksuojami Pietryčių Azijoje. Žmonių sarkocistozei būdingi raumenų skausmai, karščiavimas, išbėrimai, bronchospazmai, kardiomiopatija, patinimai, diarėja, pykinimas, vėmimas. Naminių gyvūnų tarpe nustatytas didelis sarkosporidijų epidemiologijos mastas. Naminiuose gyvūnuose *Sarcocystis* genties rūšys sukelia neurologinius sutrikimus, sisteminės ligas, abortus. Sarkocistoze gyvulininkystėje sąlygoja didžiulius ekonominius nuostolius dėl prekybos mažiau tinkamos mėsos, sumažėjusio pieno, vilnos, mėsos produktyvumo, klinikinių ligų, kartais pasibaigiančių mirtimi ar vaisiaus žūtimi. Paprastai paukščiuose klinikiškai atžvilgiu sarkocistoze nėra sunki, tačiau kartais *Sarcocystis* infekcijos sukelia paukščių žūtį. Dėl sunkių *Sarcocystis* infekcijų paukščius lengviau sumedžioja plėšrūnai.

Pasigendama tyrimų, kuriuose analizuojamos paukščiuose, kaip tarpiniuose šeimininkuose, parazituojančios *Sarcocystis* rūšys. Dažniausiai nagrinėjama paukščių *Sarcocystis* rūšių gyvybiniai ciklai, morfologija, patogenezė, paplitimo laipsnis. Išaiškintas tik dviejų *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas, kurių tarpiniai šeimininkai – paukščiai. Didžiausias dėmesys buvo sutelktas Anseriformes būrio atstovams. Identifikuota keletas *Sarcocystis* cistų tipų žąsiniuose paukščiuose, tačiau nustatytas tik *Sarcocystis rileyi* galutinis šeimininkas.

*Sarcocystis* gentis priklauso Sarcocystidae šeimai. Sarcocystidae šeima išskiriama iš kitų kokcidinių pagal dviejų šeimininkų vystymosi ciklą, jų sugebėjimą formuoti cistas tarpinių šeimininkų įvairių tipų audiniuose ir oocistų morfologiją. *Sarcocystis* ir *Frenkelia* suklasifikuotos į Sarcocystinae pošeimį, dėl jų vystymosi tik šeimininkų viduje ir obligatinio vystymosi dviejuose šeimininkuose. Sarcocystidae šeimos klasifikacija ir taksonomija yra problematiška, daugiausiai pagrįsta fenotipiniais požymiais.

Šiame darbe panaudojant kompleksinę fenotipinę ir genetinę analizę siekiama palyginti skirtingose paukščių rūšyse parazituojančias *Sarcocystis* rūšis, nustatyti jų taksonominę padėtį bei atskleisti filogenetinius ryšius Sarcocystidae šeimoje. Įgyvendinant šį tikslą atlikta sarkocistų morfologijos bei dalinių 18S ir 28S rDNR sekų analizė.

## TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** Skirtingose paukščių rūšyse, kaip tarpiniuose šeimininkuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių palyginimas bei taksonominės padėties Sarcocystidae šeimoje nustatymas.

### **Darbo uždaviniai**

- ✓ Skirtinguose šeimininkuose aptiktų cistų palyginimas;
- ✓ Iš baltakaktės žąsies (*Anser albifrons*), pilkosios žąsies (*Anser anser*), didžiosios anties (*Anas platyrhynchos*) ir varnos (*Corvus cornix*) išskirtų sarcocistų dalinių 18S ir 28S rDNR sekų lyginamoji analizė;
- ✓ *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių paukščiuose hostalinio specifiškumo patvirtinimas arba paneigimas;
- ✓ *Sarcocystis* genties rūšių koevoliucijos su jų galutiniais šeimininkais įvertinimas.

# LITERATŪROS APŽVALGA

## 1. *Sarcocystis* sistematika ir taksonomija

### 1.1. *Sarcocystis* genties sisteminė padėtis

Domenas. Eukariotai (Eukaryota)

Karalystė. Gyvūnai (Animalia)

Subkaralystė. Vienaląsčiai (Protozoa)

Tipas. Sporagyviai (Apicomplexa)

Klasė. Kokcidiniai (Coccidia)

Būrys. Tikrieji kokcidiniai (Eucoccidiorida)

Pobūris. Eimerijos (Eimeriorina)

Šeima. Sarkosporidijos (Sarcocystidae)

Pošeimis. (Sarcocystinae)

Gentis. (*Sarcocystis*) (Odening 1998)

### 1.2. *Sarcocystis* genties taksonominis skirstymas Sarcocystidae šeimoje

Heterogeninė *Sarcocystis* gentis yra pati gausiausia iš šešių Sarcocystidae šeimos genčių. *Sarcocystis* gentis priskiriama per 200 rūšių, randamų žinduoliuose, paukščiuose, ropliuose, žuvyse. *Sarcocystis* genties rūšims būdingas sudėtingas vystymosi ciklas ir tik maždaug pusei šios genties rūšių jų gyvybinis ciklas yra tiksliai išaiškintas bei aprašytas (Odening 1998).

Sarcocystidae šeima priklauso sporagyvių (Apicomplexa) tipui. Tai vienaląsčiai du šeimininkus savo vystymosi cikle turintys obligatiniai arba fakultatyviniai kokcidiniai parazitai. Sarcocystidae šeima išskiriama iš kitų kokcidinių pagal dviejų šeimininkų vystymosi ciklą, jų sugebėjimą formuoti cistas tarpinių šeimininkų įvairių tipų audiniuose ir oocistų morfologiją (disporinės ir tetrazoinės oocitos) (Dubey 1993). Jų lytinė fazė pasiekama galutinių šeimininkų žarnyne, o cistas formuoja tarpinių šeimininkų įvairių tipų audiniuose. Dviejų šeimininkų gyvybinis ciklas paremtas grobuonio-aukos santykiais. Sarcocystidae šeima suskirstyta į septynias cistas formuojančių kokcidinių gentis: *Sarcocystis*, *Frenkelia*, *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Hyaloklossia*, *Besnoitia* ir *Neospora*. Sarcocystidae šeima pagal fenotipines savybes padalyta į du pošeimius. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Hyaloklossia*, *Besnoitia* ir *Neospora* gentys suklasifikuotos į Toxoplasmatinae pošeimį, o *Sarcocystis* bei *Frenkelia* priskirtos

Sarcocystinae pošeimiui. Sarcocystinae pošeimiui būdingas vystymasis tik šeimininkų viduje ir obligatinis vystymasis dviejuose šeimininkuose. Toxoplasmatinae pošeimis skiriasi nuo Sarcocystinae, nes jis pasižymi papildomomis bei skirtingomis nelytinio dauginimosi fazėmis, o sporogonija vyksta aplinkoje, tuo tarpu Sarcocystinae pošeimio rūšys formuoja oocistas bei sporuliuoja galutinių šeimininkų žarnyne (Levine 1988; Linsay ir Todd 1993).

Kai kurie autoriai išskiria dar trečią Cystoisosporinae pošeimį, pagal *Cystoisospora* genties monozoinių cistų formavimą fakultatyviniuose tarpiniuose šeimininkuose. Tačiau beveik visuotinai priimta *Cystoisospora* gentį laikyti *Isospora* genties sinonimu. *Isospora* gentis priskirta kitai kokcidinių šeimai – Eimeridae (Frenkel 1977).

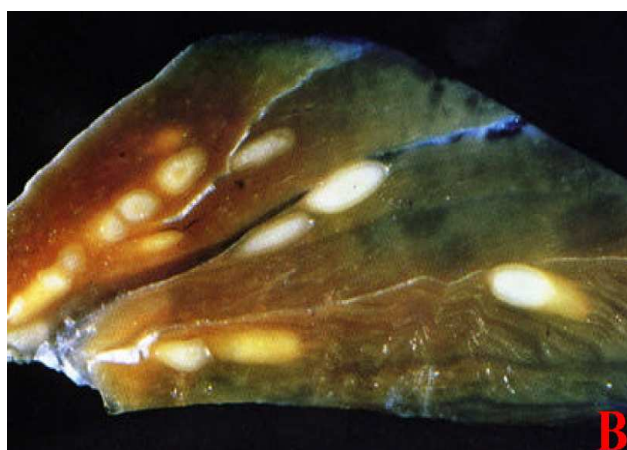
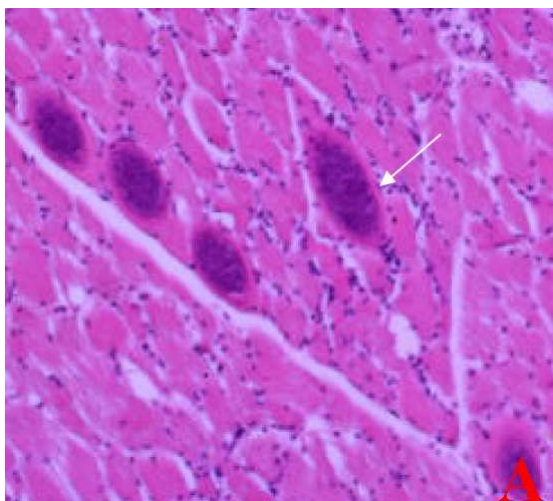
## 2. Įvadas į *Sarcocystis* gentį

### 2.1. *Sarcocystis* genties istoriniai aspektai

*Sarcocystis* pirmas aprašė Miescher 1843 Šveicarijoje kaip „pieno baltumo siūlus“ naminės pelės (*Mus musculus*) skeleto raumenyse. Per sekančius dvidešimt metų parazitas buvo žinomas kaip Mišerio vamzdeliai. 1865 Kühn atrado panašų parazitą kiaulėje ir pavadino jį *Synchytrium mieschieriana*. Kadangi šios genties pavadinimas jau buvo užimtas, Labbe pakeitė *Synchytrium mieschieriana* į *Sarcocystis mieschieriana*. Taigi, parazitas *Sarcocystis mieschieriana* (Kühn, 1865) Labbe 1899 tapo tipine genties rūšimi, o parazitas Miescher atrastas pelėje pervadintas į *Sarcocystis muris*. Vėliau *Sarcocystis* rūšių pavadinimai buvo suteikiami pagal šeimininkus, kurių raumenyse šios cistos buvo aptinkamos. Ilgą laiką mokslininkai ginčijosi, kam priskirti *Sarcocystis* rūšis – vienaląščiams ar grybams. 1967 metais elektroniniu mikroskopu aptikti sarkocistų verpstės ar pusemėnulinės formos bradizoitai, kurie buvo panašūs į kitų sporagyvių organeles. *Sarcocystis* gyvybinis ciklas buvo nežinomas iki 1970, kai sarkocistų bradizoitai iš paukščių raumenų inokuliuoti į stuburinių ląstelių kultūrą išsivystė į lytinės stadijos oocistas. Lytinės stadijos nustatymas paspartino naujų rūšių atradimą, bei pakoregavo kai kurių anksčiau nustatytų rūšių pavadinimus. Heydorn pasiūlė naujus pavadinimus trimis rūšims, kurių tarpiniai šeimininkai galvijai ir dviems rūšims, kurių tarpinis šeimininkas avys, kombinuodamas tarpinių šeimininkų ir galutinių šeimininkų pavadinimus. Vadovaujantis Tarptautiniu Zoologinės Nomenklatūros Kodeksu, toks naujų rūšių sudarymo principas buvo atmestas ir pasiliko senieji *Sarcocystis* rūšių pavadinimai. Remiantis naujaisiais molekuliniais tyrimais, koreguojamas kai kurių *Sarcocystidae* šeimos rūšių taksonominis statusas, bei sisteminė padėtis (Dubey ir kt 1989; Fayer 2004).

## 2.2. *Sarcocystis* genties pagrindiniai bruožai

*Sarcocystis* cistos randamos homoterminių ir poikiloterminių gyvūnų raumenyse ir centrinėje nervų sistemoje. Parazito pagrindinės savybės: obligatinis vystymasis dviejuose šeimininkuose, nelytinis dauginimasis tarpiniame šeimininke, kurio raumenyse ar centrinėje nervų sistemoje formuojamos cistos, lytinė stadija galutinių šeimininkų žarnyne, endogeninė oocistų sporuliacija (Dubey ir kt 1989).



1.Paveikslėlis. Sarkocistos audiniuose. A. Mikroskopinės sarkocistos B. Makroskopinės sarkocistos.

## 3. *Sarcocystis* biologijos pagrindinės ypatybės

### 3.1. *Sarcocystis* cistos sandara

*Sarcocystis* genties svarbiausias fenotipinis diagnostinis požymis yra cistos sandara. Sarkocista (gr. mėsos pūslelė) yra galutinė nelytinio vystymosi stadija randama tarpiniuose šeimininkuose. Sarkocistų skaičius bei išsidėstymas kūne svyruoja priklausomai nuo prarytų organizmų skaičiaus, *Sarcocystis* rūšies ir šeimininko imunologinės būklės. Dauguma sarkocistų vystosi skeleto skersaruožiuose, stemplės, diafragmos, liežuvio ir širdies raumenyse, tačiau kai kurios sarkocistos aptinkamos lygiuosiuose raumenyse. Retai sarkocistos randamos centrinėje nervų sistemoje, virškinamajam trakte, širdies Purkinje ląstelėse. Sarkocistų dydis ir forma varijuoja priklausomai nuo parazito rūšies ir cistos amžiaus (1.Paveikslėlis). Mikroskopinės sarkocistos varijuoja nuo labai ilgų ir siaurų iki trumpų ir plačių. Makroskopinės sarkocistos beveik visada aptinkamos skeleto ar stemplės raumenyse ir yra siūlinės (pvz., *Sarcocystis muris*),



ryžio grūdo (pvz., *Sarcocystis rileyi*) ar rutulio (pvz., *Sarcocystis gigantea*) formos. Sarkocistos visada randamos šeimininkų ląstelės citoplazmos parazitoforinių vakuolių viduje. Daugiau negu vieną sarkocistą galima aptikti vienoje šeimininko ląstelėje. Sarkocista susideda iš cistos sienelės, kuri supa parazito metrocitus ar bradizoitus – nelytinio dauginimosi stadijas.

Cistos sienelės sandara ir storis skiriasi tarp *Sarcocystis* rūšių. Cistos sienelės struktūros ypatybės keičiasi bręstant pačiai sarkocistai. Sarkocistos sienelė histologiškai gali būti lygi, ruožuota, vingiuota, su šakotomis išaugomis. Iš sarkocistų sienelės kilusi septa gali padalyti zoitų grupes į atskiras kameras. Parazito struktūra sarkocistos viduje keičiasi priklausomai nuo sarkocistos subrendimo laipsnio. Nesubrendęs cistozoitas yra rutulio formos ir vadinama metrocitu. Po kelių dalijimusi kai kurie metrocitai produkuoja banano formos bradizoitus. Sarkocistos viduje metrocitai lokalizuoti žievėje, o bradizoitai šerdyje. Senose, didelėse sarkocistose bradizoitai kartais degeneruoja centrinėje sarkocistos dalyje ir juos pakeičia granulės arba globulės. Histologiniuose preparatuose, nudažius su hematoksilinu ir eozinu metrocitai atrodo blyškesni negu bradizoitai (Dubey ir kt 1989).

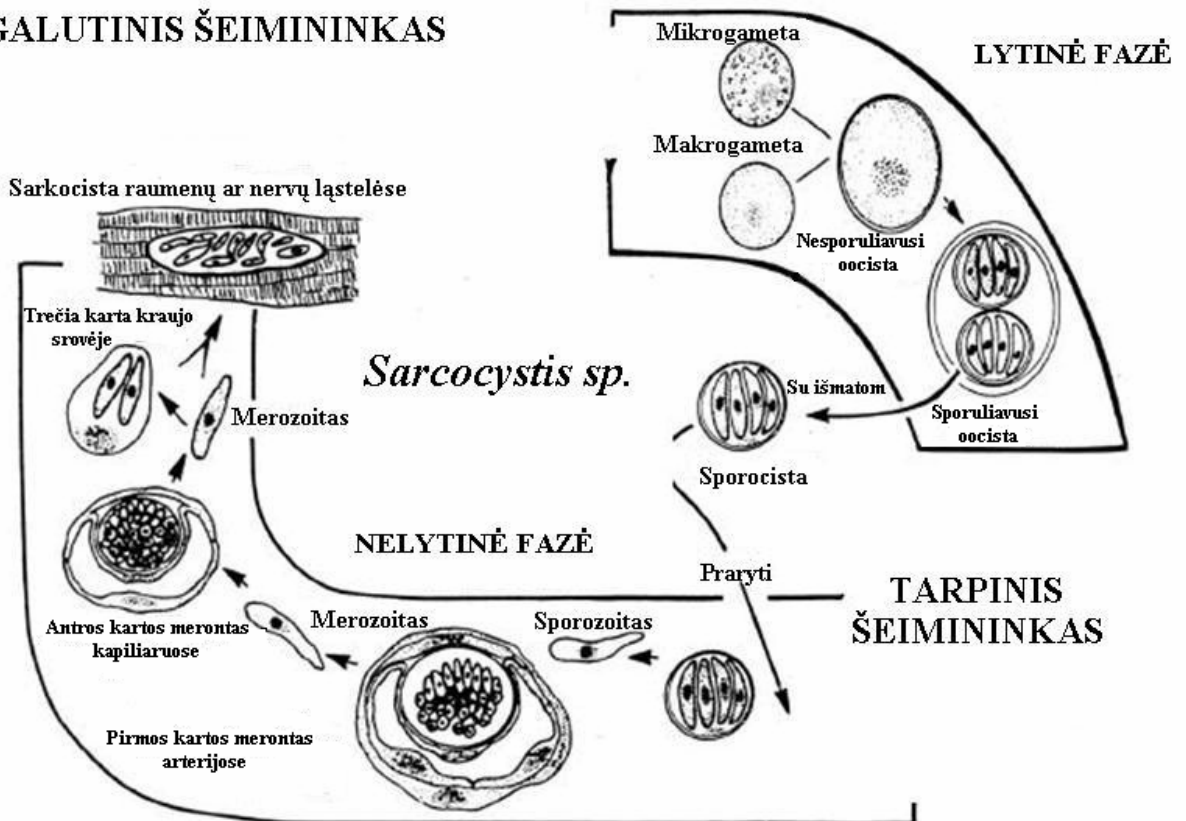
### 3.2. *Sarcocystis* gyvybinis ciklas

*Sarcocystis* genčiai būdingas obligatinis dvejų šeimininkų, aukos-grobuonio vystymosi ciklas. Nelytinės fazės vystosi tik tarpiniuose šeimininkuose – plėšrūnų aukose, o lytines fazes parazitas pereina galutiniuose šeimininkuose – mėsėdžiuose. Daugumai *Sarcocystis* rūšių būdingi specifiniai galutiniai ir tarpiniai šeimininkai. Pavyzdžiui, galvijuose aptinkamos pagrindinės trys sarkosporidijų rūšys: *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta*, *Sarcocystis hominis*. Šių rūšių galutiniai šeimininkai atitinkamai yra šuniniai, katininiai ir primatai (Dubey ir kt 1989).

*Sarcocystis* gyvybinį ciklą apibūdinsiu remdamasis *S. cruzi* rūšimi, kurios galutiniai šeimininkai gali būti kojotai, lapės, vilkai, šakalai, meškėnai, o tarpiniai šeimininkai - naminiai jaučiai ar bizonai (2.Paveikslėlis). Galutinis šeimininkas užsikrečia prarydamas raumeninius audinius su subrendusiomis sarkocistomis. Bradizoitai aktyviai judėdami transformuojasi žarnyne į vyriškus (mikro) ir moteriškus (makro) gamontus. Gamontai randami parazitoforinėse vakuolėse, o makrogamontų ir mikrogamontų santykis apytiksliai yra 95:5. Makrogamotų yra nuo kiaušiniškos iki apvalios formos, turi vieną branduolį su kompaktišku chromatinu. Mikrogamontai yra nuo kiaušiniškos iki pailgos formos ir turi vieną ar kelis branduolius. Subrendusio mikrogamonto gametos turi kompaktišką branduolį ir du žiuželius. Skirtingose rūšyse mikrogametų skaičius įvairuoja. Išsivadavusios iš mikrogamonto mikrogametos aktyviai juda į makrogamonto periferiją. Po apvaisinimo susiformuoja oocistos. Gametogamijos procesas yra asinchroninis, dėl to vienu metu galima aptikti ir oocistas ir gamontus. Oocistos sporuliacijos

metu, branduolys pasidalija tris kartus ir susiformuoja dvi sporocistos su keturiais sporozoitais. Sporuliacija vyksta asinchroniškai, todėl tuo pačiu laiku randamos nesporuliuavusios ir sporuliuavusios oocitos. Sporozoitai išsilaisvina iš sporocistų ir su fekalijomis patenka į aplinką. Daugumoje *Sarcocystis* rūšių sporuliuavusios oocitos randamos po 7-16 dienų.

## GALUTINIS ŠEIMININKAS



### 2.Paveikslėlis. *Sarcocystis* genties apibendrintas gyvybinis ciklas

Tarpinis šeimininkas užsikrečia parazitą per maistą arba vandenį. Nėra žinomas sporozoitų likimas nuo patekimo į tarpinį šeimininką iki vystymosi limfinių mazgų arterijose. Pirmos kartos merontai aptinkami endotelio ląstelėse po 7-15 dienų po užsikrėtimo. Antros kartos merontai randami daugiausia kapiliaruose, taip pat smulkiuose arterijose, faktiškai visame kūne. Pastebimi žymūs merontų dydžio ir formos skirtumai, pavyzdžiui, griaučių raumenų merontai yra ilgesni, negu kitų audinių merontai. Merontai lokalizuoti šeimininko citoplazmoje, tačiau neapsupti parazitoforine vakuole. Trečios kartos merozoitai randami kraujo ląstelėse ir aptinkami antrą mėnesį po užsikrėtimo. Merozoitų generacijų skaičius skiriasi priklausomai nuo šeimininko ląstelės tipo, *Sarcocystis* rūšies. Pavyzdžiui, stambių naminių gyvūnų *Sarcocystis* rūšys turi daugiau merozoitų kartų negu smulkių žinduolių. Paprastai merozoitų brendimo laikas yra limituotas, tačiau paukščių parazitą *Sarcocystis falcatula* vystosi kraujagyslėse net iki penkių su puse mėnesio (Dubey ir kt. 2000a). Pasibaigus merogonijai, prasideda sarkocistos

formavimasis raumeniniame arba nerviniame audinyje. Viduląstelinis zoitas apsigaubia parazitoforine vakuole ir virsta metrocitu. Po kelėtos pasidalijimų, sarkocista prisipildo bradizoitais ir galutinai subręsta. Parazito vystymasis tarpiniame šeimininke vidutiniškai trunka du su pusę mėnesio, tačiau brendimo laikas skirtingose *Sarcocystis* rūšyse varijuoja (Dubey 1982).

### **3.3. *Sarcocystis* geografinis pasiskirstymas**

*Sarcocystis* rūšys paplitusios visame pasaulyje, tačiau atskiros rūšys gali būti randamos specifiniuose geografiniuose regionuose. Pavyzdžiui, *Sarcocystis neurona* yra Šiaurės ir Pietų Amerikos endeminė rūšis. Priešingai, žmonių žarnyno sarkocistozės atvejai aprašyti įvairiuose pasaulio kontinentuose. Žmogaus raumeninių audinių sarkocistozės simptomatiniai atvejai daugiausiai aprašyti Pietryčių Azijoje, greičiausiai dėl specifinių galutinių šeimininkų paplitimo šioje teritorijoje. Taip pat Europoje ir Amerikoje autopsijos metu aptiktos sarkocistos žmogaus raumeniniame audinyje (Arness ir kt 1999; Saville ir kt 2002).

Paukščiai gali būti *Sarcocystis neurona* transportiniu šeimininku. Paukščiai praryja *Sarcocystis neurona* galutinio šeimininko oposumo infektyvias išmatas. Paukščiai per išmatas paskleidžia į aplinką infektyvias sporocistas ir dideliais geografiniais atstumais išplatina parazitą. Taip pat vabzdžiai: musės ir tarakonai gali būti natūralūs šio organizmo vektoriai (Constanzo 1990; Moorman ir kt 1991).

### **3.4. *Sarcocystis* transmisija**

Sporocistų ir oocistų nurijimas su maistu ir vandeniu iš esmės yra pagrindinis užkrato pernešimo tarpiniam šeimininkui būdas. Nors aprašyti gamtiniai placentinės infekcijos atvejai galvijuose, avyse, kai atrasti merontai abortuotuose vaisiuose, tačiau tai pasitaiko labai retai. *Sarcocystis* tik vieną kartą aptiktas trijų dienų amžiaus kumeliuke, tačiau daugiau panašių atvejų neužfiksuota. Eksperimentiškai patikrinus užsikrėtimo galimybę per pienu, laktacijos metu, neaptikta jokių transmisijos įrodymų. Subrendusių sarkocistų, turinčių bradizoitus prarijimas yra vienintelis žinomas būdas galutiniams šeimininkams įgyti infekciją (Fayer ir kt 1982).

## 4. *Sarcocystis* patogenezė

### 4.1. *Sarcocystis* sukeliama ligos

*Sarcocystis* patogeniškumas iš esmės priklauso nuo rūšies ir dozės, kuri varijuoja skirtingose *Sarcocystis* rūšyse. *Sarcocystis* genties rūšių sukeliama ligas galima suskirstyti į tris pagrindinius klinikinius sutrikimus:

- **Encefalitai**
- **Sisteminės ligos**
- **Abortai**

*Sarcocystis* infekcijos daugiausia pasireiškia jų tarpiniuose šeimininkuose. *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis canis* yra patogeniškiausios naminių bei laukinių gyvūnų rūšys. Šios rūšys sukelia aibę klinikinių simptomų: nuo žūties ir abortų iki centrinės nervų sistemos pažeidimų, anemijos, svorio netekimo, sumažėjusios pieno ar vilnos produkcijos. Daugiausia neurologinius sutrikimus sąlygoja *Sarcocystis neurona* infekcija. *Sarcocystis tenella* ir *Sarcocystis arieticanis* gali sukelti neurologines ligas avims po jauniklių atsivedimo, o *Sarcocystis cruzi* chroniškos ligos atvejais pakenkia galvijų centrinei nervų sistemai (Henderson ir kt 1997).

*Sarcocystis canis*, kurios galutinis šeimininkas nėra nustatytas sukelia hepatitis grizliuose, juoduosiuose lokiuose, šinšilose, šunyse, arkliuose, stambiuose jūrų žinduoliuose: banginiuose, jūrų liūtuose, ruoniuose, delfinuose (Dubey ir kt 2003b). Didžiulį susidomėjimą šiuo metu kelia *Sarcocystis neurona* sukelti encefalitus tarpiniuose šeimininkuose: meškėnuose, šarvuočiuose, skunkuose, ūdrose, katėse, ruoniuose. Atsitiktiniai *Sarcocystis neurona* šeimininkai – arkliai užsikrečia pavojinga liga, turinčia specialų pavadinimą – arklių protozoininis mieloencefalitas (ang. *equine protozoal myeloencephalitis* – EPM). Histopatologiniai pakitimai būdingi EPM aprašyti ir kituose *Sarcocystis neurona* tarpiniuose šeimininkuose. Arkliuose aptinkamos nelytinės fazės merontai ir merozoitai, tačiau nėra sarkocistų. *Sarcocystis neurona* infekcijos taikinytis – centinė nervų sistema, ypač smegenėlės. EPM simptomai varijuoja priklausomai nuo parazito lokalizacijos nervų sistemoje. Simptomai pasireiškia abejose gyvūno kūno pusėse nevienodai. Infekcijos židiniuose aptinkami nervų uždegimai, pabrinkimai, neuronų nekrozės (Fritz ir Dubey 2002; Saville ir kt 2002). Arkliuose pasireiškia ligos simptomai:

- ataksija (valingų judesių koordinacijos sutrikimas), silpnumas, pagrinde užpakalinių galūnių srityje, gyvūnas palaikydamas pusiausvyrą išskečia kojas ar remiasi į gardą,
- spazminė ar sustingusi eisena,

- raumenų atrofija daugiausia užpakalinėse galūnėse, taip pat veido, kaklo ar priekinių galūnių srityse,
- veido nervų paralyžius, galvos pakrypimas, sunkumai kramtant ar praryjant maistą, knarkimas, nukritęs akies vokas ar lūpa, nenormalūs akių judesiai,
- nugaros skausmai dėl asimetrinio užpakalinių galūnių naudojimo,
- pozos pokyčiai,
- judėjimas ratu,
- dažnas gulėjimas, gali staiga atsigulti ar užmigti
- priepuoliai,
- išsekimas, mirtis.

Sisteminė sarkocistozė pasireiškia nusilpimu, anemija, kūno riebalų netekimu, karščiavimu, diarėja, raumenų trūkčiojimu, raumenų atrofija, plaukų netekimu, padidintu seilėjimusi, laktacijos sumažėjimu ar laktacijos nutraukimu.

Dauguma nėščių gyvūnų, užsikrėtusių sarkocistomis be jokių pastebimų infekcijos požymių sėkmingai išnešioja vaisių, tačiau kai kurie gyvūnai patiria abortus. Eksperimentiškai infekuotų nėščių gyvūnų motinos placentoje aptiktos *Sarcocystis*, bet parazitas retai infekuoja vaisių ar vaisiaus membranas. Šiuo metu nežinoma kaip sarkocistozė veikia vaisiaus sveikatą. Kai kurie vaisiai būna infekuoti ir pažeisti, kiti – visiškai nepaveikti. Matomai *Sarcocystis* netiesiogiai įtakoja vaisiaus sveikatą, sustiprindamas poveikį klinikinių ligų, kurios žaloja vaisių tuo pačiu metu.

Merontai sukelia ląstelių ir audinių nekrozę ir jų pažeidimų laipsnis priklauso nuo *Sarcocystis* rūšies, užsikrėtimo vietos ir rūšies dauginimosi potencialo. Pavyzdžiui, *Sarcocystis falcatula* intensyviai dauginasi paukščių endotelio ląstelėse, produkuoja keletą merozoitų kartų, sukelia kraujagyslių uždegimus, kurie gali pasibaigti šeimininko žūtimi. *Sarcocystis idahoensis* infekcijos žiurkėnuose metu, merontų pasidauginimas sąlygoja hepatocitų sunaikinimą. Dideliuose gyvūnuose lokalinė audinių nekrozė nebūna pakankamai išplitusi ir todėl nesukelia sunkių ligų (Dubey ir kt 1989).

#### **4.2. *Sarcocystis* patogeniškumas tarpiniuose šeimininkuose**

Ne visos *Sarcocystis* rūšys yra patogeninės tarpiniams šeimininkams. Paprastai rūšys, kurios užkrečiamos per šuninių šeimos žinduolius yra labiau patogeninės negu rūšys, turinčios kitus galutinius šeimininkus. Sarkocistozės klinikinių požymių pasireiškimas priklauso nuo rūšies ir dozės. Šeimininko dydis, svoris neturi jokios įtakos *Sarcocystis* sukeltamų ligų

atsparumui ar imlumui. Nėštumas, laktacija, maisto trūkumas ar kitos stresinės situacijos sunkina sarkocistozės eigą. Eksperimentuose, kuriuose naminiai gyvūnai buvo užkrėsti pakankamu parazito kiekiu (sporocistų dozė LD<sub>50</sub>), pasireiškė sarkocistozės simptomai. Po mėnesio bandomuosiuose gyvūnuose išsivystė anoreksija, diarėja, pasireiškė svorio sumažėjimas, didelis seilėjimasis, karščiavimas, silpnumas, raumenų trūkčiojimas, išsekimas, anemija, audinių pažeidimai, krešėjimo disfunkcija. Patogeninės *Sarcocystis* rūšys nėščiuose gyvūnuose gali sukelti per ankstyvą gimdymą, abortus, gali gimti negyvas vaisius. Šie klinikiniai simptomai gali tęstis nuo kelių dienų iki kelėtos savaitių. Chroniškai infekcijai būdingi simptomai: lateralinis gulėjimas, eisena ratu, gyvūnai tampa pernelyg sudirgę, netenka plaukų kaklo, pasturgalio ir uodegos srityse. Kartais infekuoti gyvūnai nudvesia. Užsikrėtusiuose gyvūnuose pasireiškia žarnyno limfinių mazgų edema ir nekrozė. Hemoragijos pastebimos vidaus organuose, širdies, skeleto raumenyse, akių odenoje. Atrofuoja kūno riebalai, jie tampa mažyčiai, želatininiai. Sarkocistozės sukelti audinių ir organų pažeidimai yra daugiau uždegiminiai, negu degeneratyvūs. *Sarcocystis* patogenezei būdinga raumenų eozinofilija – specifinis uždegimas, apspręstas eozinofilų susikaupimo skersaruožuose raumenyse (Gajadhar ir Marquardt 1992; Berrocal ir Lopez 2003; Stanek ir kt 2003).

#### **4.3. *Sarcocystis* patogeniškumas galutiniuose šeimininkuose**

*Sarcocystis* paprastai nesukelia ligų galutiniuose šeimininkuose. Šunims, katėms, lapėms, meškėnams, kojotams, pelėdoms, gyvatėms sumaitinus skirtingomis *Sarcocystis* rūšimis infekuotus audinius, šių plėšrūnų žarnyne nustatytos sporocistos, tačiau nepastebėta jokių klinikinių požymių. Kai kurie eksperimentiniai šunys, kojotai vieną-dvi dienas po infekcijos vėmė, neteko svorio, tačiau tokius simptomus greičiausiai įtakoję maisto pasikeitimas nuo laboratorinio ėdalo į žalią mėsą. Tačiau žmonėms savanoriams, suvalgius *Sarcocystis hominis* ir *Sarcocystis suihominis* infekuotą žalią mėsą, pasireiškė vėmimo, diarėjos, sunkaus kvėpavimo simptomai. Šių požymių ryškesnė ekspresija nustatyta pas savanorius, kurie valgė *Sarcocystis suihominis* užkrėstą kiaulienos mėsą (Fayer 2004).

#### **4.4. Sarkocistozės ekonominė žala**

*Sarcocystis* genčiai priskiriama keletas svarbių žmogaus patogenų, tačiau didžiausia ekonominį nuostolį patiria žemės ūkio gyvulininkystės šaka. Aprašyti *Sarcocystis* užsikrėtimo atvejai, sąlygoję kai kurių naminių gyvulių žūtį. Kiekvienais metais prarandami milijonai dėl

prekybai mažiau tinkamos mėsos, su aiškiai matomomis sarkocistomis. Sunku įvertinti dėl sarkocistozės patirtus ekonominius nuostolius nes:

- 1) infekuoti beveik šimtas procentų galvijų bei avių, todėl sunku atskirti ligos pakenktus gyvūnus, nuo nepakenktų;
- 2) neįmanoma nustatyti piniginės žalos vertės, sąlygotos mažo šėrimo efektyvumo, sumažėjusio augimo greičio, sumenkusios pieno ar vilnos produkcijos, reprodukcinių problemų ir galiausiai akivaizdžiai pastebimų klinikinių ligų;
- 3) sunku diagnozuoti ligą natūraliomis sąlygomis, nustatyta santykinai nedaug infekcijos protrūkių gyvuliuose.

Taigi, dėl plataus patogeninių *Sarcocystis* rūšių paplitimo naminiuose gyvūnuose, reikalingi tobulesni diagnostiniai testai bei kontrolės mechanizmai (Dubey ir kt 1989).

#### 4.5. *Sarcocystis* epidemiologija

*Sarcocystis* infekcija paplitusi po visą pasaulį ir randama daugumoje gyvūnų rūšių. Nustatytas labai didelis sarkosporidijų užsikrėtimo lygis naminiuose gyvūnuose. Tokį milžinišką paplitimą nulemia keletas sąlygų:

- ✓ Šeimininkas gali užsikrėsti bet kuria iš jam būdingų *Sarcocystis* rūšių. Tarkime, avyse aptinkamos keturios, o galvijuose keturios *Sarcocystis* rūšys.
- ✓ Gali dalyvauti keletas skirtingų galutinių šeimininkų, perduodančių *Sarcocystis* infekciją. Galvijų sarkocistozės transmisiją atlieka šuniniai, katininiai, primatai.
- ✓ Laukiniai plėšrūnai, ieškodami maisto kiekvieną dieną įveikia nemažą distanciją, tokiu būdu parazitas išplatintas dideliais atstumais.
- ✓ Sarkosporidijų oocistos ir sporocistos vystosi galutinių šeimininkų žarnyne bei paskleidžiami aplinkoje per keletą mėnesių.
- ✓ Sporocistos ir oocistos aplinkoje išlieka ilgą laiką gyvybingos.
- ✓ *Sarcocystis* produkuoja didelius sporocistų kiekius. Pavyzdžiui, šunims, surijusiems 250 gramų infekuotos jautienos, viename grame jų išmatų randama nuo 100 iki 6000 sporocistų. Taigi, per dieną užsikrėtęs šuo paskleidžia į aplinką nuo 250000 iki dviejų milijonų sporocistų.

Ne visos *Sarcocystis* rūšys yra plačiai paplitusios. Dauguma *Sarcocystis* rūšių, perduodamų per katinių šeimos žinduolius randamos rečiau negu tos, kurių infekciją platina šuniniai. Tai nulemia keletas priežasčių. Kačių šeimos žinduoliai menkai produkuoja *Sarcocystis* sporocistas. Kai kurios per kates plintančios sarkosporidijų rūšys, tokios kaip *Sarcocystis gigantea* ir *Sarcocystis medusiformis* tampa infektyviomis tik po kelių mėnesių ar metų ir todėl

negali užbaigti gyvybinio ciklo jaunuose gyvūnuose. Kai kurios šeimininkų rūšys natūraliai jautriau reaguoja į tam tikrus infekcinius agentus, lyginant su kitomis rūšimis. Pavyzdžiui, retai aptinkamos sarkosporidijomis užsikrėtusios antilopės. Kai kurios pelių linijos labiau linkusios į *Sarcocystis* infekciją negu kitos linijos (Dubey ir kt 1989).

#### **4.6. *Sarcocystis* kontrolė**

Kol kas dar nesukurtos vakcinės apsaugančios naminius gyvūnus nuo klinikinės sarkocistozės. Eksperimentiniai duomenys parodė, kad galvijų, avių, ožkų, kiaulių, arklių imunizacija gyvų sporocistų mažomis dozėmis duoda teigiamų rezultatų. Tačiau ateityje tikimasi sukurti vakciną nuo sarkocistozės. Siekiant užkirsti kelią sarkocistozei vertėtų taikyti šias priemones (Dubey ir kt 1989):

1. Plėšrūnai neturėtų patekti į gyvulių laikymo, maitinimo ir girdymo vietas.
2. Negalima maitinti mėsėdžius nevirta mėsa ar dvėseną. Šaldymas radikaliai sumažina mėsoje esančių sarkocistų infektyvumą. Inkubuojant 20 minučių 55°C ir aukštesnėje temperatūroje sunaikinamos sarkocistos.
3. Negyvus naminius gyvūnus vertėtų užkasti ar sudeginti, o ne palikti laukuose plėšrūnams.
4. Galima naudoti antikokcidinius cheminius preparatus profilaktiškai, norint susilpninti užkrėstų gyvūnų klinikinių požymių pasireiškimą arba siekiant išvengti žūtis.

### **5. *Sarcocystis* įvairiose organizmų grupėse**

#### **5.1. *Sarcocystis* žmonėse**

Žmonės gali būti *Sarcocystis* rūšių tarpiniai arba galutiniai šeimininkai. Žmonės įgyja *Sarcocystis hominis* arba *Sarcocystis suihominis* valgydami nevirtą jautieną arba atitinkamai kiaulieną. Tik lytinis šių rūšių dauginimasis tyrinėtas žmogaus žarnyne. Žmonės gali tapti keleto *Sarcocystis* rūšių atsitiktiniais tarpiniais šeimininkais. Nežinomas gyvybinis ciklas ir galutinis šeimininkas jokios *Sarcocystis* rūšies, kuri formuoja sarkocistas žmonėse. Raumeninių audinių sarkocistozės yra atsitiktinės ir daugiausiai aptiktos Pietryčių Azijoje. Žmonės gali būti atsitiktiniai tarpiniai šeimininkai *Sarcocystis* rūšies, kurios įprasti šeimininkai yra beždžionės (Fayer 2004).



## 5.2. Raumeninio audinio sarkocistozė žmonėse

Buvo pasiūlytas *Sarcocystis lindemanni* pavadinimas visoms žmogaus raumenyse randamoms sarkocistoms, tačiau morfologiniai cistų skirtumai įrodo, kad greičiausiai keletas *Sarcocystis* rūšių dalyvauja žmonių infekcijose, todėl toks pavadinimas daugiau nebevertojamas. Nuo 25 iki 72 amžiaus žmonėms identifikuota sarkocistozė. Daugumoje atvejų infekcija aptikta tropiniuose arba subtropiniuose regionuose. Iki 1990 metų pranešta apie 46 sarkocistozinius susirgimus, iš kurių daugiausia buvo iš Pietryčių Azijos. Remiantis histologiniais duomenimis, iki 2004 metų nustatyti dar 46 atvejai, iš kurių 13 Pietryčių Azijoje, 11 Indijoje, 5 Centinėje ir Pietų Amerikoje, po 4 Afrikoje, Europoje ir JAV, likę iš kitų regionų (Fayer 2004). Skaitlingiausias ligos protrūkis įvyko Malaizijoje, kai sarkocistozė užsikrėtė septyni žmonės iš penkiolikos karinio personalo. Serologiniai tyrimai vakarų Malaizijoje parodė, kad 19.7% iš 243 tirtų žmonių turi antikūnus prieš *Sarcocystis* antigenus. Aukščiausi titrai nustatyti tarp aborigenų, toliau malajų, indų ir kinų, greičiausiai toks pasiskirstymas atspindi valgymo įpročius bei aplinkos sanitarines sąlygas. Aukštas infekcijos paplitimo laipsnis Malaizijos populiacijoje parodo, kad sarkocistozė yra dažna, retai identifikuojama infekcija Malaizijoje (Thomas ir Dissanaika 1978).

Dažniausiai užsikrėtusiuose žmonėse nepasireiškėdavo jokie sarkocistozės simptomai, nepastebėta uždegiminio atsako. Tačiau dešimtyje atvejų pastebėtas kraujagyslių uždegimas ir/arba raumeninio audinio uždegimas. Vienam keturiasdešimtmečiui amerikiečiui keturis metus keliavusiam po Aziją liemens srityje, alkūnėse, keliuose aptikti 1-2 centimetrų skausmingi patinimai. Histologiškai ištyrus biopsiją, nustatyta arterijų, venų ir kapiliarų uždegimai, kuriuos kaip manoma sukėlė *Sarcocystis*. Malaizijoje septyniems kariškiams, užsikrėtusiems *Sarcocystis* pasireiškė raumenų skausmai, limfmazgių uždegimas, eozinofilija, branchiospazmai, pakilo kūno temperatūra, išbėrė kūną. Taip pat Olandijoje pacientui, užsikrėtusiam *Sarcocystis* pakilo temperatūra, nustatyta eozinofilija, chroniškas raumenų uždegimas (Pampllett R. ir O'Donoghue 1990; Van den Enden ir kt 1995; Arness ir kt 1999).

Šiuo metu gamtoje nėra plėšrūnų, reguliariai mintančių žmonių, todėl žmonės greičiausiai užsikrečia valgydami maistą arba gerdami vandenį užterštą plėšrūno, medžiojančio primatus. Taigi, žmogus tokiu būdu yra atsitiktinis *Sarcocystis* šeimininkas. Kokia *Sarcocystis* rūšis arba rūšys žmonių raumenyse formuoja sarkocistas, nėra žinoma. Malaizijoje, kur dažniausiai pasireiškia žmonių sarkocistozė, primatų plėšrūnai gali būti pitonai arba šuninių, katinių šeimų grobuonys. Tropiniuose regionuose ištyrus penkiolika primatų rūšių, *Sarcocystis* paplitimas jose buvo 21%, o tuo tarpu nei vienoje laboratorijoje užaugintoje beždžionėje sarkosporidijų nerasta (Andress ir kt 1999, Yang ir kt 2001).

### 5.3. Žarnyno sarkosporidiozė žmonėse

Dėl ribotų tyrimų galimybių žmonių žarnyno sarkocistozė žymiai dažniau nustatoma Europoje, lyginant su kitais žemynais. Žmonės užsikrečia *Sarcocystis hominis* suvalgydami termiškai neapdorotą jautieną arba *Sarcocystis sui hominis* – kiaulieną. Manoma, kad žmonių žarnyno sarkosporidiozę gali sukelti ir kitos, kol kas dar nenustatytos *Sarcocystis* rūšys. Lenkijoje ir Vokietijoje ištyrus vaikų fekalijas, atitinkamai 10.3% ir 7.3% mėginių atrasta sarkosporidijų. Savanoriams, kurie suvalgydavo sarkocistomis užkrėstą kiaulieną ar jautieną pasireiškė vandeningas viduriavimas arba atvirkščiai vidurių užkietėjimas, pilvo skausmai, išsipūtimas, pykinimas, vėmimas, apetito sumažėjimas, sunkus kvėpavimas, greitas pulsas, dusulys, šie simptomai pasireiškė iki dvejų dienų. Pirmoje lentelėje pateikiamas apibendrintas *Sarcocystis* sukeltų ligų pasireiškimas žmonėse (Fayer 2004).

#### 1.Lentelė. *Sarcocystis* ligų pasireiškimas žmonėse.

Savybės	Raumenų infekcija	Žarnyno infekcija
Infekcijos šaltiniai	Maistas arba vanduo užterštas nežinomo mėsėdžio ar visaėdžio išmatomis	Žalia arba nevirta mėsa
Laikas nuo maisto nurijimo iki simptomų pasireiškimo ir simptomų pasireiškimo trukmė	Savaitės, mėnesiai, simptomai pasireiškia kelis mėnesius ar metus	3-6 valandos, simptomai pasireiškia 36 valandas
Simptomai	Raumenų skausmai, karščiavimas, išbėrimai, bronchospazmai, kardiomiopatija, patinimai	Pykinimas, vėmimas, apetito netekimas, diarėja, pilvo pūtimas, dusulys
Terapija	Antikokcidiniai preparatai, furazolidonas, albendazolas	Nėra

### 5.4. *Sarcocystis* žinduoliuose

Naminiuose gyvūnuose užsikrėtimo laipsnis *Sarcocystis* rūšimis svyruoja nuo 10% iki 100%. Žemės ūkio sektoriuje patiriami didžiuliai ekonominiai nuostoliai dėl sarkocistozės. Patogeninės *Sarcocystis* rūšys gali sukelti sistemines ligas, pasibaigiančias mirtimi, sumažėja

mėsos, pieno ar vilnos produktyvumas, kartais sarkocistozės padarinys – vaisiaus žūtis (Dubey ir kt 1989).

Galvijuose parazituoja mažiausiai keturios *Sarcocystis* rūšys, iš kurių labiausiai patogeninė yra *Sarcocystis cruzi*. Šis parazitas sukelia anemiją, karščiavimą, svorio sumažėjimą, plaukų netekimą tam tikrose kūno srityse, silpnumą, raumenų traukulius, abortus, sumažėjusį pieno produktyvumą, per didelį seilėjimąsi, neurologinius sutrikimus ir net žūtį. Klinikinių simptomų pasireiškimas priklauso nuo izoliato ir prarytų sporocistų skaičiaus. Eksperimentiniuose bandymuose nepriklausomai nuo dozės infekcija pasireiškia ketvirtą savaitę nuo užkrėtimo. Praėjus keliems mėnesiams po infekcijos pradžios, kai kuriems gyvūnams išsivysto centrinės nervų sistemos sutrikimai, tokie kaip nistagmas (nevalingas akies obuolio trūkčiojimas), opistotonusas (nugaros raumenų mėšlungis), šoninė gulimoji padėtis. Visi galvijai, kuriems pasireiškė centrinės nervų sistemos pažeidimai, žuvo. Pirmas natūralios *Sarcocystis* infekcijos atvejis aprašytas 1961 metais Kanadoje. Iš dvidešimt penkių užkrėtų karvių, nudvėse septyniolika. Karvėms pasireiškė trumpalaikis karščiavimas, anoreksija, diarėja, uodegos srityje plaukų praradimas, per didelis seilėjimas, hemoraginis vaginitas (makšties uždegimas) ir kiti sarkocistozei būdingi simptomai. Iš dešimties veršingų karvių tik viena išgyveno. Vėliau natūralios sarkocistozės atvejai galvijuose aprašyti Didžiojoje Britanijoje, Airijoje, Norvegijoje, Australijoje, JAV, Japonijoje, Kuboje ir kitose šalyse (Dubey ir kt 1989; Houg ir kt 1997; Wee ir kt 2001).

Nustatytos keturios *Sarcocystis* rūšys, parazituojančios avyse, iš kurių patogeniškiausia yra *Sarcocystis tenella*. *Sarcocystis tenella* sukelia anoreksiją, kūno svorio netekimą, karščiavimą, anemiją, abortus, vilnos sumažėjimą, nervinius pažeidimus, raumenų uždegimus ir kartais žūtį. Kadangi beveik šimtas procentų subrendusių avių yra užsikrėtusios sarkocistomis, sunku įvertinti sarkocistozės poveikį avyse (Henderson ir kt 1997). Ožkose aptinkamos *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis hiricanis* ir *Sarcocystis moulei*. Ožkų sarkocistozės būdingi požymiai: karščiavimas, nusilpimas, anoreksija, drebulys, irzlumas, abortai ir kartais liga pasibaigia mirtimi. Po sarkocistozės pasveikusios ožkos išlieka silpnos, vangios, linkusios į kitas infekcijas. Kiaulėse randamos *Sarcocystis mieschieriana*, *Sarcocystis suihominis*, *Sarcocystis porcifelis*, sukeliančios kūno svorio netekimą, raudonas dėmes odoje, ypač ausyse ir sėdmenyse, dusulį, raumenų drebulį, abortus ir žūtį. *Sarcocystis* paplitimas kiaulėse yra santykinai žemas ir siekia dvidešimt procentų. Kol kas nepasitaikė natūralios klinikinės sarkocistozės atvejų kiaulėse (Dubey ir kt 1989). Keturios arkluose parazituojančios *Sarcocystis* rūšys pasižymi silpnu patogeniškumu. Eksperimentiškai užkrėtus arklius sporocistomis, jie tapo apatiški, greit pavargdavo, išsivystė anoreksija, neteko plaukų daugiausia galvos ir kaklo srityse. Arklai taip pat

tampa atsitiktiniais tarpiniais *Sarcocystis neurona* šeimininkais ir suserga labai pavojinga centrinės nervų sistemos liga – arklių protozoininiu mieloencefalitu (Fayer ir Dubey 1982).

Mėsėdžiai žinduoliai yra galutiniai sarkosporidijų šeimininkai. Laukiniuose žinduoliuose *Sarcocystis* rūšių paplitimas svyruoja. Pavyzdžiui, Lietuvoje ištyrus kanopinių sarkocistozinės infekcijos mastą nustatyta, kad užsikrėtimo ekstensyvumas svyravo nuo 83.0% (briedžio) iki 92.7% (dėmėtojo elnio) (Malakauskas ir Grikienienė 2002).

### 5.5. *Sarcocystis* paukščiuose

Sarcocystidae šeimoje paukščiai gali būti tarpiniais ar galutiniais parazito šeimininkais. *Frenkelia* gentis pasižymi labai dideliu morfologiniu bei filogenetiniu panašumu su *Sarcocystis* gentimi, todėl kai kurie autoriai mano, kad *Frenkelia* genties statusas turėtų būti panaikintas, o šios genties atstovai įtraukti į *Sarcocystis* gentį. *Frenkelia* genties atstovų: *Frenkelia glareoli* ir *Frenkelia microti* galutiniais šeimininkais tarnauja suopių genties plėšrieji paukščiai. *Sarcocystis dispersa*, *Sarcocystis cernae*, *Sarcocystis rauschorum* galutiniai šeimininkai yra plėšrieji paukščiai, o tarpiniai šeimininkai priklauso pelinių šeimai (Dubey ir kt 1989).

Dauguma paukščiuose parazituojančių sarkosporidijų neturi patvirtinto rūšies pavadinimo ir yra įvardijamos kaip neapibūdintos, nepavadintos rūšys. Žinomas tik dvejų *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas, kurios naudoja paukščius kaip tarpinius šeimininkus. *Sarcocystis rileyi* antys ir skunsas atitinkamai yra tarpiniai ir galutiniai šeimininkai. *Sarcocystis rileyi* formuoja paukščių raumenyse ryžio grūdo formos sarkocistas, o sarkocistos sienelė turi būdingas žiedinio kopūsto formos išaugas. Ši rūšis pasižymi tik švelniu patogeniškumu. Eksperimentiškai užkrėtus antys, nepastebėta jokių klinikinių simptomų, o natūraliai infekuotuose antyse aptikta raumeninio audinio granuloma (Dubey ir kt 2003a). Į *Sarcocystis falcatula* gyvybinį ciklą įeina žvirblių, papūginių, karvelinių būrio paukščiai ir oposumas. *Sarcocystis falcatula* formuoja mikroskopines cistas, o sienelė priklauso vienuoliktam tipui. *Sarcocystis falcatula* būdinga daug merozoitų kartų, tačiau nepaisant to visi merozoitai struktūriškai yra panašūs. *Sarcocystis falcatula* merozoitų vystymasis kraujyje tęsiasi iki penkių su puse mėnesio, kas lemia šio parazito stiprų patogeniškumą paukščiams. *Sarcocystis falcatula* mirtinas ligas sukelia, kai merogonijos stadijos praeinamos plaučių ar širdies kapiliarų endotelyje. Dauguma eksperimentiškai užkrėstų papūgų žuvo pagrinde dėl plaučių nepakankamumo (Spalding ir kt 1994; Dubey ir kt 2000b; Goldova ir kt 2006).

Sarkosporidijomis infekuoti paukščiai gali būti randami ištisus metus, tačiau dažniausiai aptinkami medžioklės sezono metu. Paprastai paukščiuose nepastebima parazito sukeltų klinikinių simptomų, tačiau kartais *Sarcocystis* infekcijos pasibaigia paukščių žūtimi.

Sarkosporidiozės paukščiuose gali sukelti plaučių edemą, kongestiją (kraujo priplūdimą), kepenų padidėjimą, miokarditą (širdies raumens uždegimą), splenitą (blužnies uždegimą), hepatitą (kepenų uždegimą), raumenų eozinofiliją. *Sarcocystis* užsikrėtusiems paukščiams būdingas silpnumas, raumeninio audinio sumažėjimas, to pasekmė luošumas, retais atvejais paralyžius. Sarkosporidijų sukelti encefalitų atvejai aprašyti kilniajame erelyje, padūkėlyje, kurtinyje, vištvanagyje, vištose ir žvirbliniuose paukščiuose. Dėl sunkių *Sarcocystis* infekcijų paukščiai lengviau tampa plėšrūnų aukomis (Spalding ir kt 2002).

Pasigendama tyrimų, kuriuose analizuojamos paukščiuose, kaip tarpiniuose šeimininkuose, parazituojančios *Sarcocystis* rūšys. Daugiausia dėmesio skiriama morfologijai, patogenezei ir gyvybinių ciklų išaiškinimui. Paukščiuose gausiausiai sarkosporidijos aptinkamos žąsinių paukščių būryje. Vandens paukščių sarkosporidijos yra ganėtinai dažnai aptinkamos Šiaurės Amerikoje. Europoje aprašyti tik keli sarkosporidiozės atvejai antyse bei žąsyse. Žąsiniuose paukščiuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių galutiniais šeimininkais gali būti skunkas, oposumas, kartais lapė, šuo, katė. Vandens paukščių sarkocistos publikacijose priskiriamos *Sarcocystis rileyi* arba tiksliai nenustatyto *Sarcocystis* rūšims (Kalisinska ir kt 2003; Kutkienė ir Sruoga 2004; Kutkienė ir kt 2006).

## **6. *Sarcocystis* identifikacija, klasifikacija ir filogenezė**

### **6.1. *Sarcocystis* fenetinė analizė**

*Sarcocystis* genties rūšių identifikavimui ir suklasifikavimui tradiciškai dažniausiai naudojami morfologiniai, ypatingai sarkocistoms, bei kitų *Sarcocystis* gyvenimo stadijų požymiai. Taip pat didžiulę reikšmę *Sarcocystis* rūšies nustatymui turi gyvybinio ciklo atskleidimas bei tarpinių ir galutinių šeimininkų įvardijimas. Taigi, šiuo metu sarkocistos sandara yra pagrindinis patikimiausias kriterijus aprašant *Sarcocystis* rūšį tam tikrame šeimininke.

Iš daugelio sarkocistos morfologinių savybių pati reikšmingiausia yra sienelės sandara. *Sarcocystis* rūšys (bent jau to paties tarpinio šeimininko rūšyse) dažniausiai gali būti identifikuotos šviesiniu mikroskopu, jeigu iškyla abejonių ar prieštaravimų, reikalinga atlikti analizę su elektroniniu mikroskopu. *Sarcocystis* rūšių cistų ultrastruktūros tyrimai parodė, kad *Sarcocystis* gentyje randamos įvairios sarkocistų ląstelės sienelės ir jų struktūra gali varijuoti nuo paprastų iki labai sudėtingų formų. Dubey ir Odening (2001) išskyrė trisdešimt septynis sarkocistų sienelės tipus, tačiau manoma, kad papildomi tipai dar bus atrasti. Pirminė sarkocistos sienelė susideda iš parazitoforinės vakuolės membranos ir elektronams tankaus sluoksnio,

esančio žemiau parazitoforinės vakuolės. Grūdėtasis sluoksnis yra žemiau pirminės sarkocistos sienelės. Iš grūdėtojo sluoksnio susiformuoja septa, atskirianti sarkocistą į kameras, kuriose aptinkami bradizoitai ir metrocitai. 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 išsikišimus, atstumai tarp išaugų varijuoja, kartais priminėse išaugose pastebimi antriniai tam tikros formos išsikišimai. Dažnai tame pačiame tarpiniame šeimininke parazituojančios keletas *Sarcocystis* rūšių pasižymi skirtingais sarkocistų sienelės tipais. Pavyzdžiui, visos keturios avių *Sarcocystis* rūšys (*Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis gigantea*, *Sarcocystis medusifformis*, *Sarcocystis arieticanis*) turi morfologiškai skirtingus sienelių tipus, nepaisant to, kad *Sarcocystis tenella* ląstelės sienelė panaši į ožkoje parazituojančios *Sarcocystis capracanis* ląstelės sienelę. Cistos sienelės sandara dažnai atspindi filogenetinius ryšius. Pirmo tipo sarkocistų sienelės dažniausiai aptinkamos smulkiuose artimai gimininguose žinduoliuose, penkiolikto tipo – tik elninių šeimos žinduoliuose, keturiolikto tipo – avyse ir ožkose.

Sarkocistos forma ir dydis varijuoja bręstant sarkocistai, priklauso nuo šeimininko ląstelės tipo ir išskyrimo ar fiksavimo metodo. Tos pačios rūšies sarkocistos širdies raumenyse ar centrinėje nervų sistemoje visada yra mažesnės negu tos, kurios randamos skeleto raumenyse. Sarkocistos forma irgi priklauso nuo lokalizacijos. Pavyzdžiui, *Sarcocystis gigantea* stemplėje yra rutulio ar kriaušės formos, o diafragmoje – plona ir ištįsusi. Sarkocistos visada yra smulkesnės fiksuotuose pavyzdžiuose lyginant su natūraliais pavyzdžiais. Kadangi sarkocistos dažnai aptinkamos susitraukiančiuose raumenyse, dėl to jų dydis varijuoja priklausomai nuo to, kokioje būsenoje fiksavimo metu buvo šeimininko ląstelė, ar susitraukusi, ar atsipalaidavusi. Kai kurios *Sarcocystis* rūšys auga keletą metų jau po to, kai tapo injektyviomis. Atsižvelgiant į aukščiau aptartus teiginius, identifikuojant *Sarcocystis* rūšis reikia atsargiai vertinti sarkocistos formą ir dydį.

Metrocitų struktūra nėra naudingas kriterijus nustatant *Sarcocystis* rūšį, nes metrocitai dažnai yra netaisyklingos formos, o jų dydis ypatingai greitai keičiasi kiekviename dalijimosi etape. Bradizoitų sandara irgi varijuoja. Vienų *Sarcocystis* rūšių bradizoitai kompaktiškai susipakuoja sarkocistoje, kitose rūšyse bradizoitai randami išsisklaidę. Bradizoitai dažniausiai yra banano formos, o jų išlinkimai labai varijuoja, todėl sunku tiksliai juos įvertinti, tačiau kai kurios *Sarcocystis* rūšys turi tik joms būdingos formos bradizoitus. Merozoitų struktūra pasižymi ribota taksonomine verte, 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.

Nežiūrint į nežymią sarkocistų ir oocistų įvairovę, jos yra struktūriškai panašios, o jų dimensijos skirtinguose šeimininkuose persidengia (Dubey ir kt 1989).

## **6.2. *Sarcocystis* šeimininkų specifiškumas**

*Sarcocystis* gentyje tarpinis ir galutinis šeimininkas yra labai svarbus rūšies diagnostinis požymis. Daugumai *Sarcocystis* rūšių būdingi specifiniai tarpiniai ir galutiniai šeimininkai. *Sarcocystis* rūšys pasižymi didesniu specifiškumu tarpiniams šeimininkams, negu galutiniams šeimininkams. Pavyzdžiui, jautis ir bizonas yra vieninteliai galimi tarpiniai *Sarcocystis cruzi* šeimininkai, o šunys, vilkai, kojotai, meškėnai, šakalai, lapės tarnauja kaip galutiniai šeimininkai. Kitas *Sarcocystis* rūšis, kurių tarpiniai šeimininkai yra šuninių šeimos žinduoliai, taip pat platina keletas šuninių šeimos atstovų. Nei viena *Sarcocystis* rūšis, plintanti per šuninių šeimos plėšrūnus, negali užkratą pernešti per katinių šeimos rūšį ir atvirkščiai. Vienintelė *Sarcocystis* rūšis, kuri pernešama naminės katės, *Sarcocystis muris*, turi dar vieną galutinį šeimininką, tai yra šešką. Skirtingose *Sarcocystis* rūšyse varijuoja specifiškumas tarpiniam šeimininkui. Mažesniu hostaliniu specifiškumu pasižymi smulkių žinduolių *Sarcocystis* rūšys, lyginant su didelių žinduolių *Sarcocystis* rūšimis. Itin žemas specifiškumas tarpiniam šeimininkui būdingas *Sarcocystis falcatula*, kuri aptinkama banguotosiose papūgėlėse, kanarėlėse, karveliuose, kikiliuose (Box ir kt 1984; Dubey ir kt 1989).

Kai kurių roplių *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas pagrįstas kanibalizminiu transmisijos būdu, kai lytinio ir nelytinio dauginimosi fazės vyksta skirtinguose tos pačios rūšies individuose. Toks gyvenimo ciklas vadinamas dihomokseniniu. *Sarcocystis gallotiae*, parazituojanči driebžą *Gallotia galloti* reprezentuoja tokį vystymosi ciklą (Kuodela ir kt 1999; Šlapeta ir kt 2001). *Sarcocystis rodentifelis* taip pat pasižymi dihomokseniniu vystymosi ciklu. *Sarcocystis rodentifelis* tarpiniai šeimininkai yra pelėnai ir žiurkės, o galutiniai - katės, tačiau kartais katė eliminuojama iš parazito vystymosi ciklo ir galutinio šeimininko vaidmenį atlieka žiurkė. (Grikienienė ir kt 1998).

## **6.3. Molekuliniai žymenys, naudojami *Sarcocystis* genties filogenetinėje analizėje**

Tobulėjant molekuliniais tyrimo metodams vis dažniau naudojami DNR žymenys identifikuojant *Sarcocystis* rūšis ir nustatant *Sarcocystis* genties filogenetinius ryšius. Fenotipiniais požymiais arba parazito-šeimininko santykiais pagrįsta kokcidinių taksonominė sistema tobulinama remiantis DNR tyrimais. Molekulinė analizė dažnai patikslina tam tikros

*Sarcocystis* rūšies taksonominį statusą, atskiriant rūšį į dvi arba sujungiant į vieną, pakoreguojant filogenetinę padėtį.

Dažniausiai filogenetinėje analizėje naudojami ribosominės RNR mažojo arba didžiojo subvieneto fragmentai. 18S ir 28S rRNR genai išsiskiria jų pakankamu ilgiu, visuotiniu paplitimu, konservatyvių ir variabilių fragmentų optimaliu santykiu, bei sąlyginai nesudėtingu pradmenų parinkimu. Mozaikinė ribosominės RNR struktūra suteikia filogenetiniams eksperimentams lankstų pritaikomumą, nes galima tirti artimai giminingus ir mažiau susijusius organizmus (Mugridge ir kt 2000). Svarbu tai, kad daugelio svarbiausių kokcidinių rūšių šių genų pilnos arba beveik pilnos sekos nustatytos ir prieinamos Genų banke. Ribosominės RNR genų tyrimai sėkmingai atskleidžia Sarcocystidae šeimos filogenijos klausimus (Barta ir kt 1991; Tenter ir kt 1992; Ellis ir kt 1994; Šlapeta ir kt 2003). Apicomplexa tipo Sarcocystidae šeimos ir kitų narių filogenetiniai tyrimai daugiausia paremti mažojo rRNR subvieneto geno sekomis. Populiarumą daugiausia lėmė mažesnis 18S rRNR dydis, dėl to šį fragmentą techniškai galima lengviau padauginti ir nuskaityti seką. Atskleidžiant tam tikrų giminingų organizmų ryšius, 18S rDNR analizė nebuvo pakankamai informatyvi, be to gauti prieštaraujantys vienas kitam filogenetiniai medžiai (Jeffries 1997; Tenter ir Johnson 1997; Votypka ir kt 1998). Kai kurie autoriai teigia, kad rRNR didžiojo subvieneto metodas yra patikimesnis (Mugridge ir kt 1999). Didelis informacijos kiekis duomenų masyve padeda išvengti atsitiktinių klaidų ir todėl galima suformuoti statistiškai patikimesnes išvadas. Naudojant labiau informatyvų geną galima patikimiau atskleisti filogenetinius ryšius, todėl didžiojo ribosominės RNR subvieneto genas yra tinkamesnis, nes jis yra dvigubai ilgesnis už mažojo ribosominės RNR subvieneto geną. Kartais vieno geno skiriamosios raiškos nepakanka, nustatant taksonominę ar filogenetinę padėtį, todėl kai kurių Sarcocystidae šeimos narių filogenetiniai ryšiai nenustatyti. Dėl minėtos priežasties kartais taikoma kompleksinė didžiojo ir mažojo rRNR subvienetų analizė (Šlapeta ir kt 2003).

Kai ribosominės RNR metodas neatskleidžia filogenetinių ryšių, Sarcocystidae šeimos filogenetinėje analizėje kartais naudojamas tarp 18S rRNR ir 28S rRNR esantis vidinis transkribuojamas tarpiklis ITS1 (angl. *internal transcribed spacer*), kuris splaisingo metu pašalinamas. ITS sekų analizė dažniausiai taikoma atskiriant ir identifikuojant labai giminingas Sarcocystidae rūšis ar izoliatus. Šlapeta ir kt (2002) sėkmingai pritaikė ITS analizę atskiriant Toxoplasmatinae pošeimio *Neospora* ir *Hammondia* genčių rūšis. ITS1 žymuo naudotas *Sarcocystis neurona* ir *Sarcocystis falcatula* identifikavimui (Tanhauser ir kt 1999). Dubey ir kt (2006) tyrė *Sarcocystis neurona* izoliatų iš skirtingų geografinių sričių ir iš skirtingų tarpinių šeiminių giminingumą. ITS1 yra perspektyvus diagnostinis žymuo, nes turi daug kopijų genome, pasižymi konservatyvumu, varijuoja Apicomplexa tipe, tačiau šiuo metu sukaupta nedaug ITS1 fragmento sekų informacijos, bet to ITS1 fragmentas nėra pakankamai didelis (apie



1000 bp.) Identifikuojant kai kurias *Sarcocystis* rūšis taip pat naudojami RAPD (angl. *random amplified polymorphic DNA*), AFLP (angl. *amplified fragment length polymorphisms*) ir RFLP (angl. *restriction fragment length polymorphism*) metodai (Elsheikha ir kt 2006).

#### 6.4. *Sarcocystis* ir *Frenkelia* genčių filogenetiniai ryšiai

*Frenkelia* genčiai priklauso dvi rūšys: *Frenkelia microti* ir *Frenkelia glareoli*. Jos parazituoja graužikų smegenyse, o galutinis šeimininkas yra suopių genties rūšys. *Frenkelia glareoli* formuoja rutulio formos cistas *Clethrionomys* genties pelėnuose. *Frenkelia microti* skiltelės formos cistos infekuoja eilę graužikų: peles, žiurkes, pelėnus, žiurkėnus, šinšilas, triušius, tačiau dažniausiai aptinkamos pilkajame pelėne. Šie parazitai paveikia tarpinių šeimininkų smegenis padidindami tikimybę, kad graužikus sumedžios *Frenkelia* genties galutinis šeimininkas (Modry ir kt 2004; Svobodova ir kt 2004).

*Frenkelia* ir *Sarcocystis* gentys jungiamos į Sarcocystinae pošeimį ir išskiriamos iš kitų Sarcocystidae šeimos narių pagal dvejų tipų zoitų (metrocitų ir bradizoitų) formavimą tarpinių šeimininkų audiniuose, oocistų brendimas ir sporuliacija vyksta galutinio šeimininko žarnyne. *Frenkelia* ir *Sarcocystis* gentys tradiciškai atskiriamos viena nuo kitos pagal cistų morfologiją ir lokalizaciją tarpiniame šeimininke. *Frenkelia* rūšys gyvybinio ciklo nelytinę fazę pereina tarpinio šeimininko kepenyse ir turi tik vieną merozoitų kartą. *Sarcocystis* nelytinis vystymasis vyksta tarpinio šeimininko įvairių organų kraujagyslių endotelio ląstelėse, be to daugumai rūšių būdinga keletas merozoitų vystymosi kartų. *Frenkelia* cistos randamos išskirtinai centrinėje nervų sistemoje, o *Sarcocystis* cistos aptinkamos širdies ar skeleto raumenyse. Tačiau fenotipinės savybės, kurios, kaip anksčiau manyta, būdingos tik *Frenkelia* genčiai, pastebėtos ir *Sarcocystis* genties rūšyse. Pavyzdžiui, kai kuriose graužikų *Sarcocystis* rūšyse: *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis dispersa*, *Sarcocystis cernae*, *Sarcocystis idahoensis*, *Sarcocystis rauschorum* merozoitų vystymasis vyksta hepatocituose. *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis arieticanis*, *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis sybillensis*, *Sarcocystis kirmsei* formuoja cistas nerviniuose audiniuose. Taigi, pastarųjų metų tyrimai parodo, kad neteisingais požymiais paremtas šių genčių atskyrimas. Kai kurie autoriai mano, jog vertėtų pagrindiniais skiriamaisiais požymiais laikyti cistozoitų dydį ir galutinio šeimininko rūšį. Filogenetinių ryšių atkūrimas remiantis fenotipiniais požymiais yra limituotas, nes neaišku, kuri fenotipinė savybė yra iš tikrųjų homologinė ir filogenetiškai informatyvi (Mugridge ir kt 1999).

Didžiojo ir mažojo ribosominės RNR subvienetų genų tyrimų rezultatai prieštarauja *Sarcocystis* ir *Frenkelia* genčių suskirstymui į Sarcocystinae pošeimį bei abejojama ar pagrįstai išskiriama *Frenkelia* gentis. 18S ir 28S rDNR analizė atskleidžia, kad *Sarcocystis* gentis yra

parafiletinė grupė, jeigu *Frenkelia* gentį laikyti galiojančią. *Frenkelia* genties rūšis pervadinus *Sarcocystis* genties rūšimis, *Sarcocystis* gentis taptų monofiletinė. Taigi, molekuliniai rezultatai, gauti analizuojant *Frenkelia* ir *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius, stipriai paremia šių genčių sinonimiškumą. Tačiau, kol abiejų genčių filogenetiniai tyrimai yra riboti, taksonominiai pakitimai atidėliojami (Votypka ir kt 1998; Mugridge ir kt 1999; Smith ir Frenkel 2003).

### 6.5. *Sarcocystis* filogenetiniai tyrimai

Filogenetiniai tyrimai Sarcocystidae šeimoje daugiausiai paremti 18S ir 28S rRNR genų sekų analize. Dažniau naudojamas 18S rDNR sekų lyginimo metodas, nes jis yra techniškai paprastesnis ir pigesnis. Filogenetinės analizės pradžia Apicomplexa tipe galima laikyti šios grupės pagrindinių atstovų mažojo ribosominės RNR subvieneto geno sekų palyginimą (Johnson ir kt 1988). Vėliau sekė kitų autorių darbai (Barta ir kt 1991; Tenter ir kt 1992, Tenter ir Johnson 1997; Holmdahl ir kt 1999; Elsheikha ir kt 2005). Didžiojo ribosominės RNR subvieneto geno sekų tyrimai pakoregavo ir patikslino filogenetinius ryšius, gautus remiantis 18S rDNR sekomis (Mugridge ir kt 2000; Šlapeta ir kt 2003). Kaupiantis 18S ir 28S rDNR sekų duomenų bazei, formavosi filogenetinių tyrimų tendencijos. Galima išskirti tris pagrindines filogenetinės analizės Sarcocystidae šeimoje ir *Sarcocystis* genityje kryptis:

- ❖ Filogenetinių ryšių rekonstravimas Sarcocystidae šeimoje;
- ❖ *Sarcocystis* monofilijos ar parafilijos įrodymai;
- ❖ *Sarcocystis* genotipinių grupių ryšių su fenotipinėmis charakteristikomis įvertinimas.

Sarcocystidae šeimos filogenetiniuose medžiuose atsiskiria Toxoplasmatinae ir Sarcocystinae pošeimiai. Sarcocystinae pošeimiui priskiriamos *Sarcocystis* ir *Frenkelia* gentys. *Frenkelia* genties vienintelės dvi rūšys: *Frenkelia glareoli* ir *Frenkelia microti* Sarcocystidae šeimos filogenetiniuose medžiuose susigrupuoja su *Sarcocystis falcatula*, *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis rodentifelis*, *Sarcocystis dispersa*. Šios rūšys pasižymi tam tikrų fenetinių charakteristikų panašumu. Taigi, Sarcocystidae šeimos dendrogramos parodo, kad *Sarcocystis* gentis turėtų būti vertinama kaip parafiletinė taksonominė grupė. Kai kurie autoriai mano, kad *Frenkelia* genties taksonominis rangas nėra teisingas, o *Frenkelia* genties atstovus vertėtų pervadinti ir įtraukti į *Sarcocystis* gentį, tačiau kol kas šis klausimas išlieka diskusijų objektu ir nėra galutinai išspręstas (Votypka ir kt 1998; Mugridge ir kt 1999; Smith ir Frenkel 2003).

Įvairiuose Sarcocystidae šeimos filogenetiniuose tyrimuose išskiriamos keturios pagrindinės monofiletinės linijos. Vienas klasteris apjungia Toxoplasmatinae pošeimio *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Hyaloklossia*, *Besnoitia* ir *Neospora* gentis, o kituose trijuose

pasiskirsto *Sarcocystis* genties rūšys, *Frenkelia* genties rūšys randamos viename klasteryje su *Sarcocystis* rūšimis (Mugridge ir kt 2000; Šlapeta ir kt 2003; Elsheikha ir kt 2005).

Kai kuriuose filogenetiniuose *Sarcocystis* genties tyrimuose nustatyta koreliacija tarp rūšių fenotipinių savybių ir genotipinių grupių. Nustatyta *Sarcocystis* genties rūšių koevuliucija su jų šeimininkais. Pastebėtas didesnis koevuliucijos laipsnis tarp parazitų ir jų galutinių šeimininkų, negu tarp parazitų ir jų tarpinių šeimininkų (Tenter ir kt 1992; Dolžel ir kt 1999; Šlapeta ir kt 2001; Elsheikha ir kt 2005). Pavyzdžiui, *Sarcocystis* rūšys, kurių tarpiniai šeimininkai yra atrajojantys žinduoliai, o galutiniai šeimininkai šuninių ar katinių šeimos plėšrūnai, pasižymi glaudžiais ryšiais tarp genotipinių grupių ir fenotipinių požymių, tokių kaip tarpiniai ir galutiniai šeimininkai, sarkocistos sienelės dydis ir tipas (Holmdahl ir kt 1999). Galutinio šeimininko ir filogenetinių grupių stipri koreliacija būdinga *Sarcocystis* genties atstovams, kurių gyvybiniame cikle dalyvauja graužikai ir gyvatės (Šlapeta ir kt 2003). Tačiau ne visoms *Sarcocystis* rūšims būdinga koevuliucija su jų galutiniais šeimininkais, ypač toms, kurios nepasižymi griežtu hostaliniu specifiškumu (Jeffries ir kt 1997; Mugridge ir kt 2000; Šlapeta ir kt 2001; Šlapeta ir kt 2003).

# MEDŽIAGA IR METODAI

## 1. Medžiagos paėmimas

2005-2007 metais Baltijos jūros pakrantėje netoli Kuršių marių buvo sumedžiotos trys baltakaktės žąsys (*Anser albifrons*) po vieną pilkąją žąsį (*Anas anas*), varną (*Corvus cornix*) ir didžiąją antį (*Anas platyrhynchos*). Šių paukščių kaklo, kojos ir krūtinės raumenys tirti ieškant *Sarcocystis* cistų.

## 2. Mikroskopinė sarkocistų analizė

Subrendusias sarkocistas gyvūno skeleto raumenyse greičiausiai ir lengviausiai galima aptikti kompresoriniu metodu. Tuo tikslu iš tiriamosios raumenų grupės išilgai raumenų skaidulų iškerpami 28 avižos grūdo dydžio raumenų gabalėliai, sudedami ant sintetinio tinklelio ir 20-30 minučių perkeliama į mėlynojo metileno dažų vandeninį tirpalą (1g. metileno 500ml H<sub>2</sub>O). Iš dažų ištrauktas tinklelis su pjūviais padedamas ant filtrinio popieriaus (sugeriamas dažų perteklius) ir nuskaidrinimui 15-20 minučių pamerkiamas į 1.5% acto rūgšties tirpalą. Ištrauktas tinklelis vėl dedamas ant filtrinio popieriaus, o po to pjūviai sudedami į stiklinį kompresorių (stiklo plokštelės suveržiamos varžtais) ir tiriama šviesiniu mikroskopu.

Sarkosporidijų rūšys apibūdinamos arba nustatomas jų cistų tipas remiantis morfologiniais kriterijais, tai yra cistų sienelės storiu, išaugų forma ir ilgiu bei cistozoitų forma ir dydžiu. Tuo tikslu kompresoriuje mikroskopuojami antriniai raumenų preparatai, kurie prieš tai 3-5 minutėm pamerkiami į fiziologinį tirpalą. Fiziologinio tirpalo prisigėrusios sarkocistos tampa tamsesnės ir natyviuose preparatuose geriau matomos. Pjūviai, kuriuose rastos sarkocistos, perkeliama ant objektyvinio stiklelio ir vėl mikroskopuojami. Aplink sarkocistas esančios miofibrilės dvejų preparavimo adatėlių pagalba atsargiai atskiriamos nuo sarkocistos ir pašalinamos. Po to atskiriamas mažas gabalėlis sarkocistos, pridengiamas dengiamuoju stikleliu ir įvertinamos cistos morfologinės ypatybės. Likusi cistos dalis su nedideliu miofibrilių kiekiu perkeliama į 70% etilo alkoholio tirpalą ir mėgintuvėlyje, šaldiklyje laikoma iki DNR išskyrimo.

Elektronio mikroskopavimo analizei, raumeninio audinio pavyzdžiai su sarkocistomis fiksuoti Kornovskio tirpale, po to fiksuoti osmio tetrokside, dehidruoti ir įlieti į epoksidinių dervų mišinį. Labai ploni pjūviai nudažyti 2% uranil acetatu ir švino citratu bei tirti elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100B.

### 3. DNR išskyrimas

Genominės sarkocistų DNR išskyrimui iš raumeninio audinio naudotas universalus DNR išskyrimo iš įvairių audinių metodas (Aljanabi ir Martinez 1997). Metodas nereikalauja brangių reagentų ir išskirtos DNR kiekis bei kokybė yra pakankama atlikti nemažai PGR reakcijų.

#### Medžiagos:

1. Homogenizuojantis buferis 23.2gNaCl (0.4MNaCl)  
1.21gTris (10mMTris-HCl)  
0.744gEDTA (2mMEDTA)  
iki 1000ml distiliuoto H<sub>2</sub>O
2. 20%SDS: 20gSDS iki 100ml H<sub>2</sub>O
3. Proteinazė K: 20mg/ml H<sub>2</sub>O
4. 6MNaCl: 17.4gNaCl 50ml H<sub>2</sub>O
5. Izopropanolis
6. 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

#### Eiga:

1. Į sterilius mėgintuvėlius sudedami 50-100 mg eritrocitų suspensijos arba audinio gabaliukai, užpilami 400μl Homogenizuojančio buferio ir jie 10-15 s trinami, pakratomi.
2. Į kiekvieną pavyzdį pridedama po 40μl 20%SDS ir 8ml Proteinazės K. Gerai išmaišoma ir inkubuojama termostate 1 valandą (ar visą naktį) 55-65°C.
3. Pridedama 300μl 6MNaCl ir 30 s purtoma. Centrifuguojama 30 min. (10000 aps/min greičiu).
4. Viršutinis sluoksnis supilamas į kitą sterilų mėgintuvėlį ir užpilamas izopropanolio spiritu (1:1). Gerai išmaišomas.
5. Inkubuojama 1 h šaldiklyje (-20°C).
6. Nuosėdos praplaunamos 100μl 70% spiritu, išdžiovinamos. Suspenduojama 100-400μl distiliuotame vandenyje.

### 4. DNR švarumo ir kiekio nustatymas spektrofotometru

DNR tirpalai sugeria 260nm ultravioletinius spindulius. Kai tirpalo sluoksnio storis yra 1 cm (kuivėtės storis), o optinis tankis  $D = 1$ , dvigrandės DNR koncentracija tirpale atitinka 50μg/ml. Svarbu nustatyti DNR ir baltymų koncentraciją tirpale. Švarių DNR tirpalų optinių

tankių santykis 260nm/280nm yra 1.7-2.0. Jei tirpale yra baltymų ar fenolio priemaišų, šis santykis bus mažesnis nei nurodyta. (Paulauskas ir kt. 2002).

## 5. Polimerazės grandininė reakcija

PGR yra nukleorūgščių sintezės *in vitro* metodas, kuriuo laboratoriniame mėgintuvėlyje gali būti specifiskai padauginėti (amplifikuoti) atskiri DNR fragmentai. PGR metodas yra labai jautrus, todėl padauginėti pasirinkta DNR atkarpa gali sudaryti netgi vieną milijoninę genomines DNR dalį. Tai reiškia, kad, naudojant PGR, galima amplifikuoti net ir vienintelę pasirinkto geno kopiją ar jo fragmentą (McPerson ir Moller 2000). 28S ribosominės RNR geno fragmentas amplifikuotas naudojant KL5a/KL2 ir KL1/KL3 pradmenų poras (Mugridge ir kt 1999), o 18S rDNR fragmentas padauginėtas naudojant 1L ir 1H pradmenų porą (Yang ir kt 2001).

### Medžiagos:

- Genominė DNR
- H<sub>2</sub>O
- 10 x PGR buferis
- 2mM dNTP
- MgCl<sub>2</sub>
- Pradmenys
- Taq polimerazė

### Eiga:

Polimerazinė grandinės reakcija atlikta galutiniam 25μl tūryje, susidedančiam iš 2.5μl 10 x PGR buferio, 2.5μl 2mMdNTP, po 0.1μM pradmenų, 0.5μl Taq polimerazės, 2.5μl MgCl<sub>2</sub>, 0.2μg genomines DNR ir likusio kiekio vandens. Amplifikacija atlikta pradėdant pirmu denatūracijos žingsniu 3 min. 94°C temperatūroje, reakcija toliau buvo vykdoma 30 amplifikacijos ciklų: 45s – 94°C, 45s – 65°C (KL5a/KL2), 45s - 44°C (KL1/KL3), 45s - 62°C (1L/1H), prailginimo žingsnis 1min. – 72°C ir viskas buvo užbaigta galutiniu prailginimo žingsniu 5min. – 72°C.

## 6. DNR elektroforezė agarozės gelyje

Elektroforezė agarozės gelyje naudota PGR padaugintų DNR fragmentų analizei. DNR elektroforezė atliekama horizontaliame 0,65 – 3,0 % agarozės gelyje, turinčiam 1μg/ml etidžio bromido. Elektroforezė vykdoma leidžiant elektros srovę per gelį, ko poveikyje DNR juda nuo katodo link teigiamo poliaus – anodo. Fragmentų judėjimo greitis gelyje priklauso nuo jų dydžio: mažesni fragmentai juda greičiau, didesni lėčiau. Atsižvelgiant į gelio dydį ir DNR fragmentų molekulinę masę, elektroforezė vykdoma 30 – 60 min., esant 70 – 110 V įtampai (Paulauskas ir kt. 2002).

**Medžiagos:**

- 50 x TAE buferis:

Ledinė acto rūgštis	57ml
Tris	242g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100ml
dist. H <sub>2</sub> O	iki 1000ml
- 0,5 M EDTA (pH 8,0):

EDTA x 2H <sub>2</sub> O	186,1 g
dist. H <sub>2</sub> O	800ml
- Agarozės milteliai
- Bromfenolio mėlio dažas
- Etidžio bromidas

**Eiga:**

Paimti reikiamą agarozės miltelių kiekį, ištirpinti jį 1 x TAE buferyje kaitinant ir maišant tol, kol tirpalas pasidaro skaidrus ir vientisos konsistencijos. Pridėti etidžio bromido. Iki 70 – 65°C atvėsinta agarozė supilama į paruoštą formą. Po to į gelį įstatomos "šukutės" ir forma paliekama 30 min. kambario temperatūroje, kad gelis sustingtų. Sustingus geliui atsargiai ištraukiamos šukutės. Prieš įvedant mėginį į susiformavusius "šulinėlius", gelį įstatyti į elektroforezės vonelę, užpildytą 1 x TAE buferiu taip, kad šis apsemtų gelį. Į kiekvieną šulinėlį įvesti po DNR mėginį sumaišytą su bromfenolio mėlio dažais, o į vieną - molekulinės masės žymeklį Gene Ruler™ 100bp. Po elektroforezės gelis stebimas UV šviesoje.

## 7. Pavyzdžių paruošimas sekvenavimui

Amplifikuotų fragmentų išgryninimui ir sekvenavimo reakcijų paruošimui naudotas egzonukleazijų rinkinys. 5µl PGR mišinys, kuriame padaugintas mus dominantis fragmentas sumaišytas su 10 vnt. egzonukleaze I (0.5µl) ir 1 vnt. CIAP egzonukleaze (1µl). Reakcija vykdyta 15 min. 37°C temperatūroje ir atitinkamai 15 min. 85°C temperatūroje. Sekos nuskaitytos Biotechnologijos Instituto Sekvenavimo centre.

## 8. Molekulinių duomenų analizė

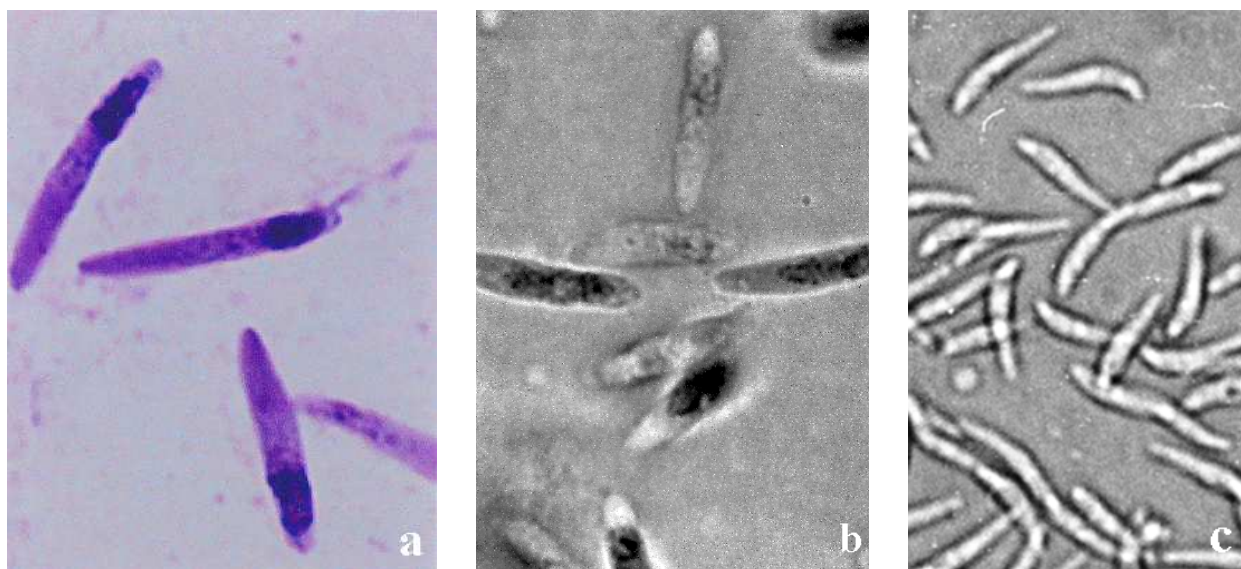
Gautų sekų specifiškumo įvertinimas atliktas BLAST programa, lyginant šiame darbe

nustatytas sekas su skelbiamomis Genų Banko sekomis, pasižyminčiomis aukščiausiu homologijos laipsniu naujai nustatytoms sekoms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Genų sekų sulyginimas su identifikuotų *Sarcocystis* rūšių homologinėmis sekomis bei filogenetinių ryšių Sarcocystidae šeimoje rekonstravimas atliktas naudojant MEGA 3.1 versiją. (Kumar ir kt 2004). Filogenetiniai medžiai sukonstruoti naudojant *Neighbor-Joining* metodą. *Neighbor-Joining* analizė atlikta pagal nukleotidų pakaitų modelį, naudojant Kimura 2 parametą. *Bootstrapping* vertės gautos atlikus 500 pakeitimų. Šiame darbe nustatytų sekų santykinio panašumo procentinės reikšmės gautos naudojant FASTA programą (<http://fasta.bioch.virginia.edu/>).



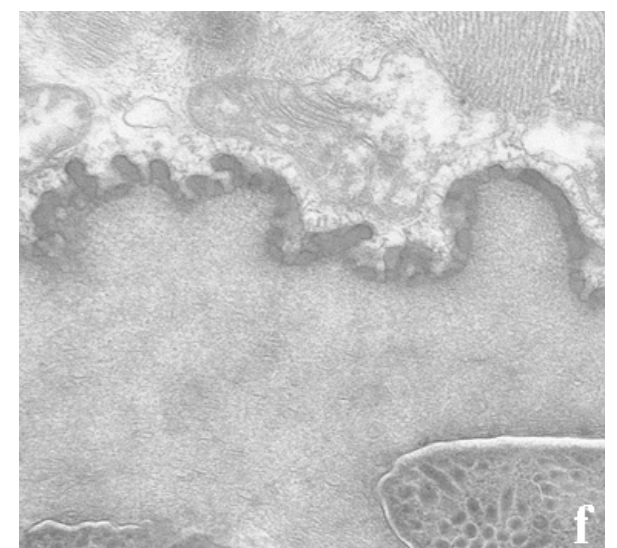
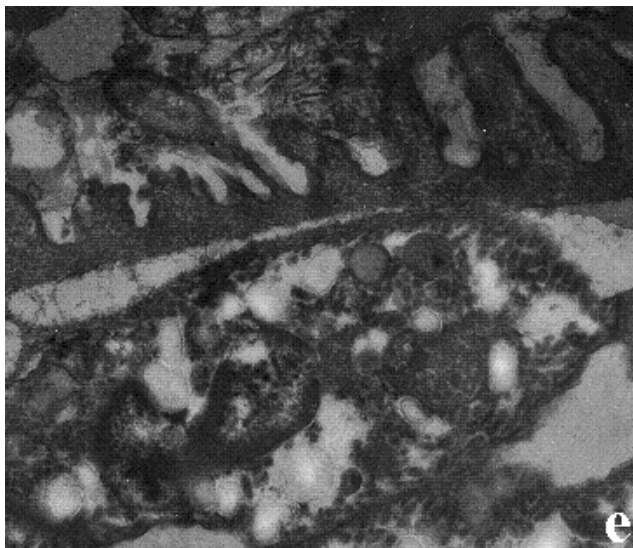
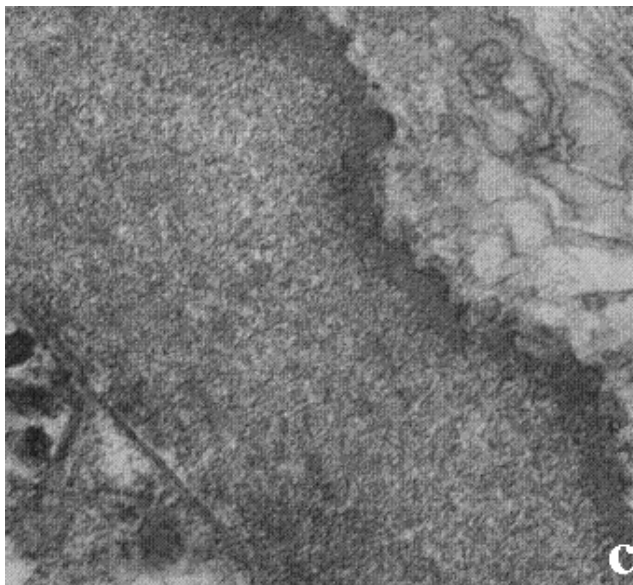
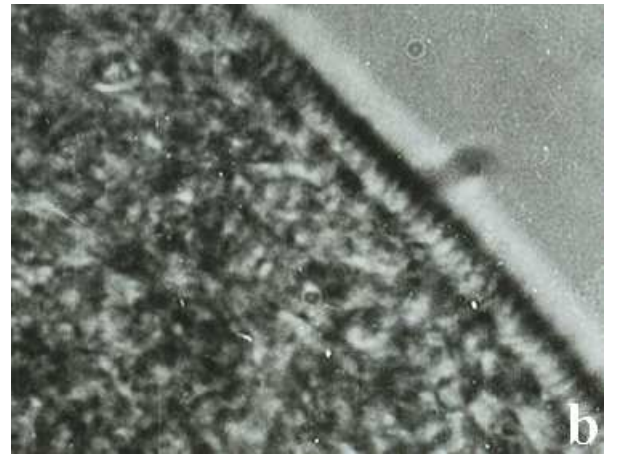
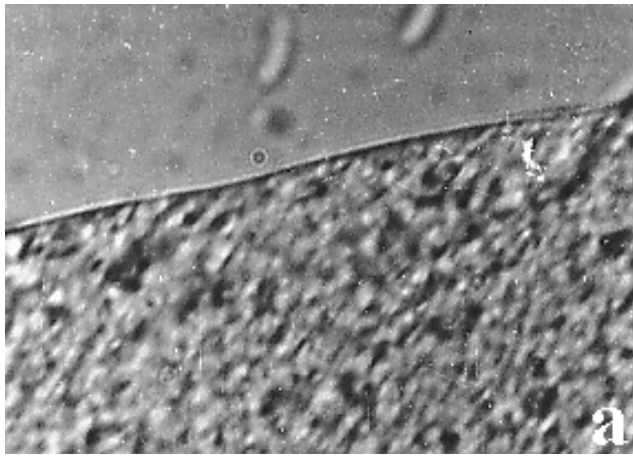
## REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Iš šešių paukščių išskirtos sarkocistos. Sarkocistų morfologinių požymių tyrimas atliktas panaudojant šviesinio ir elektroninio mikroskopavimo analizę. Šviesiniu mikroskopu preliminariai apibūdintos sarkosporidijų cistos, tačiau siekiant nustatyti cistų tipus ir identifikuoti *Sarcocystis* rūšis atlikta išsamesnė elektroninio mikroskopavimo analizė. Cistos diferencijuotos pagal sienelės storį, sienelės išaugų ilgį ir formą bei cistozoitų morfometrines ypatybes.



**3.Paveikslėlis. Sarkocistų cistozoitai. a *Sarcocystis* sp. (*Anser anser* cistos tipas III). b *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III). c *Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II).**

Pilkojoje žąsyje ir vienoje baltakaktėje žąsyje aptikti vienodos formos cistozoitai, kituose paukščiuose rasti skirtingų pavidalų cistozoitai (3. Paveikslėlis). Remiantis cistų sienelės ir cistozoitų morfologija, vienoje baltakaktėje žąsyje aptiktos I tipo sarkocistos, didžiojoje antyje rastos II tipo sarkocistos, dviejose baltakaktėse žąsyje ir pilkojoje žąsyje nustatytos III tipo sarkocistos, varnos cistos identifikuotos kaip V tipo sarkocistos. Šviesiniu mikroskopu identifikuotos pirmo tipo sarkocistos apibendrintai pavadintos lygiasienėmis, o antro, trečio, penkto tipų sarkocistos – turinčios išaugas (4. Paveikslėlis). Pirmo tipo cistų sienelės buvo lygios, antro ir trečio tipų cistų sienelėms būdingos spenelio ar piršto formos išaugos, o penkto tipo cistų sienelės turėjo tvorelės formos išaugas. Elektroninės mikroskopijos analizė parodė, kad pirmo tipo sarkocistų sienelė pasižymi smulkiu bangavimu, antro ir trečio sarkocistų tipo sienelėms būdingos piršto formos išaugos, bet skiriasi išaugų dydis ir atstumai tarp jų, penkto sarkocistų tipo sienelei charakteringos antrinės išaugos (Kutkienė ir kt., nepublikuota). Pagal



**4. Paveikslėlis. Sarkocistų sienelių fragmentų mikroskopinė analizė. a-b šviesinė mikroskopija, c-f elektroninė mikroskopija. a, c - I tipo sarkocistos, b,d - III tipo sarkocistos, e - II tipo sarkocistos, f - V tipo sarkocistos.**

Dubey ir Odening sarkocistų sienelių ultrastruktūros klasifikaciją, I tipo sarkocistos turi 1 tipo cistų sienelę, III tipo sarkocistos – 9 tipo cistų sienelę, o didžiojoje antyje ir varnoje aptiktos sarkocistos nepriskirtinos nei vienam iš trisdešimt septynių cistų sienelių tipų. Pilkosios žąsies ir baltakaktės žąsies trečiojo tipo raumeninių audinių cistos bei cistozoitai tiriant šviesiniu mikroskopu buvo morfologiškai identiški, todėl tai tikriausiai yra tos pačios *Sarcocystis* rūšies parazitavimo skirtinguose tarpiniuose šeimininkuose atvejais.

Remiantis fenotipinėmis sarkocistų savybėmis, tyrimams panaudotos sarkosporidijos atitinkamai pavadintos: *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I), *Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II) *Sarcocystis* sp. (*Anser anser* cistos tipas III), *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III), ir *Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V). Iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų, išskirtos sarkocistos pagal morfologinius požymius nebuvo priskirtos nei vienai žinomai rūšiai.

Šiame darbe gauti 1391-1393bp ilgio 18S rDNR (atitinka *Toxoplasma gondii* 18S rRNR geno 99-1471 seką), 645-649bp ir 1021-1036bp ilgio 28S rDNR fragmentai (atitinka *Toxoplasma gondii* 28S rRNR geno 266-1282 ir 2511-3167 sekas). 28S rRNR geno dalinės sekos skelbiamos Genų Banke (EF079884 EF079885 EF079886 EF079887), kitos nustatytos sekos kol kas nedeponuotos Genų Banke. *Sarcocystis* sp. (*Anser anser* cistos tipas III) rūšiai pavyko amplifikuoti ir nusekvenuoti tik 28S rDNR 645bp fragmentą, ilgesnių fragmentų amplifikacija nepasisekė dėl seno pavyzdžio ir degraduotos DNR.

*Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I) 18S rDNR fragmento 1391bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Frenkelia glareoli* atitinkama seka; 28S rDNR 1678bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Frenkelia glareoli* atitinkama seka.

*Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II) 18S rDNR fragmento 1391bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Sarcocystis mucosa* atitinkama seka; 28S rDNR 1671bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Sarcocystis neurona* atitinkama seka.

*Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III) 18S rDNR fragmento 1391bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Sarcocystis mucosa* atitinkama seka; 28S rDNR 1670bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Sarcocystis muris* atitinkama seka.

*Sarcocystis* sp. (*Anser anser* cistos tipas III) 28S rDNR 649bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Sarcocystis lindsayi* atitinkama seka.

*Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V) 18S rDNR fragmento 1393bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Frenkelia microti* atitinkama seka; 28S rDNR

fragmento 1681bp ilgio seka pasižymėjo aukščiausia homologija palyginus su *Frenkelia glareoli* atitinkama seka.

Tiriamųjų sekų santykinio panašumo procentinės vertės varijuoja nuo 95.80% iki 100% (2. Lentelė). *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I) pagal 18S rRNR ir 28S rRNR genų dalines sekas artimiausia *Frenkelia glareoli* (atitinkamai 99.50% ir 98.50%). Visais kitais atvejais naujai išskirtos sarkocistos pasižymi tarpusavio didžiausiu homologijos laipsniu.

**2.Lentelė. Tirtų *Sarcocystis* sp. rūšių sekų santykinio panašumo procentinės reikšmės. 18S rRNR geno (po diagonale), 28S rRNR geno (virš diagonalės).**

	1	2	3	4	5
1	***	95.80%	96.00%	98.40%	98.30%
2	99.30%	***	99.30%	99.30%	95.70%
3	99.20%	99.60%	***	100%	95.80%
4	-	-	-	***	98.50%
5	99.30%	98.60%	98.60%	-	***

1 – *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I), 2 – *Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II), 3 – *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III), 4 – *Sarcocystis* sp. (*Anser anser* cistos tipas III), 5 – *Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V).

*Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III) vidurūšinė dalinių 18S ir 28S rRNR genų sekų analizė neparodė jokio sekų skirtumo. Paukščiai buvo sumedžioti toje pačioje teritorijoje, kurioje *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III) galimų plėšrūnų, tai yra lapių skaičius yra ribotas ir jos nemigruoja dideliais atstumais (Kutkienė ir kt. 2006). Šios priežastys, matyt, lėmė vidurūšinės įvairovės nebuvimą tarp baltakaktės žąsies trečio tipo sarkosporidijų.

Baltakaktėje ir pilkojoje žąsyje parazituojančių bei formuojančių trečio tipo cistas sarkosporidijų, 28S rRNR geno dalinės sekos yra identiškos. Nors tirtasis fragmentas nėra pakankamai didelis (649bp), tačiau lyginant šį fragmentą kitose *Sarcocystis* rūšyse nustatyti nukleotidų sudėties skirtumai. Remiantis sekų vienodumu ir morfologiniais sarkocistų sienelės bei cistozoitų panašumais, galima teigti, kad baltakaktėje bei pilkojoje žąsyse parazituojančios III tipo sarkosporidijos gali priklausyti tai pačiai rūšiai.

Ilgą laiką sarkosporidiozės problemoje vyravo nuomonė, kad *Sarcocystis* rūšys pasižymi griežtu specifiškumu tarpiniam šeimininkui. Tačiau Box ir kt. (1984) eksperimentiniais tyrimais parodė, kad *Sarcocystis falcatula* tarpiniais šeimininkais yra Passeriformes, Psittaciformes ir Columbiformes būrių paukščiai. Šių tyrimų pagrindu formavosi nuomonė, kad kai kurios *Sarcocystis* rūšys (ypač paukščiuose) nėra griežtai specifinės tarpiniam šeimininkui. Vėlesni

tyrimai taip pat parodė, kad tokios pačios *Sarcocystis* cistų formos randamos keliose Anseriformes būrio paukščių rūšyse (Wobesser ir kt. 1981; Kutkienė ir Sruoga 2004). Taigi, rezultatai iš dalies patvirtina prielaidą, jog paukščių sarkosporidijos nepasižymi griežtu hostaliniu specifiškumu.

### 3. Lentelė. Filogenetiniame Sarcocystidae šeimos tyrime panaudotos kokcidijų rūšys.

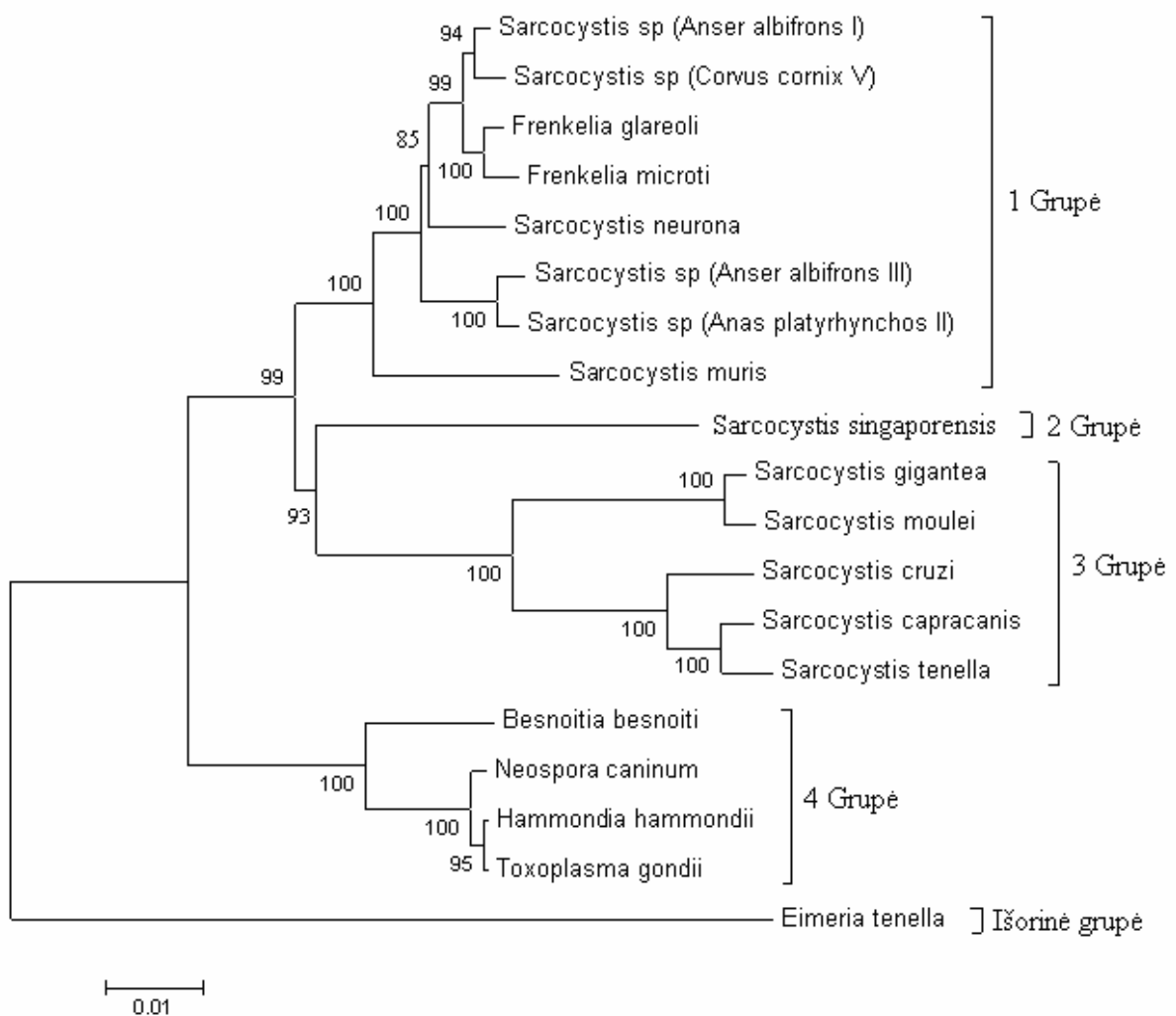
Klasifikacija	Taksonas	Tarpinis šeimininkas	Galutinis šeimininkas
Tiriamoji grupė			
Sarcocystinae			
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. sp (Anser albifrons cistos tipas I)</i>	Paukščiai	?
<i>Sarcocystis</i>	<i>Sarcocystis sp (Anas platyrhynchos cistos tipas II)</i>	Paukščiai	?
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. sp (Anser albifrons cistos tipas III)</i>	Paukščiai	Šuniniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. sp (Corvus cornix cistos tipas V)</i>	Paukščiai	?
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. neurona</i>	Arklys	Oposumas
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. muris</i>	Peliniai	Katiniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. capracanis</i>	Ožka	Šuniniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. tenella</i>	Avis	Šuniniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. gigantea</i>	Avis	Katiniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. cruzi</i>	Galvijai	Šuniniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. moulei</i>	Ožka	Katiniai
<i>Sarcocystis</i>	<i>S. singaporensis</i>	Peliniai	Gyvatė
<i>Frenkelia</i>	<i>F. glareoli</i>	Peliniai	Paukščiai
<i>Frenkelia</i>	<i>F. microti</i>	Peliniai	Paukščiai
Taxoplasmatinae			
Besnoitia	<i>B. besnoiti</i>	Galvijai	Katiniai
Hammondia	<i>H. hammondii</i>	Peliniai	Katiniai
Toxoplasma	<i>T. gondii</i>	Žinduoliai	Katiniai
Neospora	<i>N. caninum</i>	Galvijai	Šuniniai
Išorinė grupė			
Eimeridae			
<i>Eimeria</i>	<i>E. tenella</i>	Žinduoliai	Paukščiai

Naudojant BLAST sekų sulyginimo programą parodyta, kad šiame darbe nustatytos 18S ir 28S rDNR fragmentų sekos pasižymėjo didžiausia homologija Sarcocystidae šeimai priskiriamų rūšių atžvilgiu, o ypač *Sarcocystis* bei *Frenkelia* gentims. *Frenkelia* labai artima *Sarcocystis* ir jos taksonominė padėtis išlieka diskusijų objektu (Votypka ir kt. 1998; Mugridge ir kt. 1999; Smith ir Frenkel 2003). Siekiant rekonstruoti filogenetinius ryšius Sarcocystidae šeimoje bei nustatyti tiriamųjų rūšių taksonominę padėtį, lygintos homologiška artimiausios Genų Banke skelbiamos Sarcocystidae rūšys. Palyginimui pasirinktos *Sarcocystis*, *Frenkelia*, bei keturios kitų Sarcocystidae šeimų genčių svarbiausios rūšys, kurių nustatytos ir 18S rDNR, ir 28S rDNR sekos. Išorine grupe pasirinkta Sarcocystidae šeimai giminingiausios Eimeridae šeimos tipinė rūšis *Eimeria tenella* (3. Lentelė). Į Filogenetinę analizę neįtrauktos labai dideliu homologijos laipsniu, šiame darbe tiriamoms rūšims pasižyminčios *Sarcocystis cf. falcatula*, *Sarcocystis lindsayi*, nes nenustatytos jų 18S rDNR sekos, bei *Sarcocystis mucosa*, kadangi nėra jos 28S rDNR sekos duomenų. Remiantis *Neighbor-Joining* metodu, atlikta Sarcocystidae šeimos filogenetinė klasterinė analizė.

Bendroje 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų dendrogramoje išryškėja keturios grupės: pirmoji apjungia šiame darbe tiriamas rūšis su *Frenkelia microti*, *Frenkelia glareoli*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis neurona*, antroje išsiskiria *Sarcocystis singaporensis*, kurios tarpinis šeimininkas yra pelinių šeimos žinduolis, o galutinis šeimininkas gyvatė, trečioje susigrupuoja *Sarcocystis* genties rūšys, kurių gyvybiniame cikle dalyvauja tik žinduoliai, ketvirtoji apjungia Toxoplasmatinae pošeimio keturių genčių tipinius atstovus (5. Paveikslėlis). Filogenetinis Sarcocystidae šeimos medis atskiria du pošeimius: Sarcocystinae (1-3 klasteriai) ir Toxoplasmatinae (4 klasteris). Iš filogenetinio medžio matome, kad *Sarcocystis* gentis yra parafiletinė taksonominė grupė, jeigu *Frenkelia* genties statusas teisingai apibrėžtas. Kai kurie autoriai mano, kad vertėtų *Frenkelia* genties rūšis pervadinti ir įtraukti į *Sarcocystis* gentį (Votypka ir kt. 1998; Mugridge ir kt. 1999, Elsheikha ir kt. 2005).

Iš dendrogramos matome, kad *Sarcocystis* genties rūšims būdinga koevuliucija su jų šeimininkais. Filogenetinio medžio trečioji monofiletinė grupė apjungia *Sarcocystis* rūšis, kurių tarpiniai ir galutiniai šeimininkai žinduoliai. Antroji grupė išskiria specifiniu gyvenimo ciklu pasižyminčią *Sarcocystis singaporensis*. *Sarcocystis singaporensis* tarpiniu šeimininku tarnauja pelės, o galutiniu – gyvatė. Trečią dendrogramos grupę padalina dvi pagrindinės šakos: viena apjungia *Sarcocystis gigantea* ir *Sarcocystis moulei*, kita – *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis tenella*. *Sarcocystis gigantea* ir *Sarcocystis moulei* galutiniai šeimininkai yra katinių šeimos žinduoliai, o *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis tenella* galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai. Taigi, nustatytas didesnis koevuliucijos mastas tarp parazitų ir jų galutinių šeimininkų, negu tarp parazitų ir jų tarpinių šeimininkų.

Filogenetinio medžio pirmos grupės rūšims nebūdinga koevoliucija su jų galutiniais šeimininkais. Dendrogramos pirmo klasterio rūšys: *Frenkelia microti*, *Frenkelia glareoli*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis neurona* nepasižymi griežtu specifiškumu tarpiniam ar galutiniam šeimininkui. Šio darbo bei ankstesnių tyrimų rezultatai parodo, kad paukščių sarkosporidijos taip pat nepasižymi griežtu hostaliniu specifiškumu. Režiuuojant, galima teigti, jog ne visoms *Sarcocystis* rūšims būdinga koevoliucija su jų galutiniais šeimininkais, ypačiai toms, kurios nepasižymi griežtu hostaliniu specifiškumu.



**5. Paveikslėlis. Sarcocystidae šeimos filogenetinis medis sukonstruotas pagal 18S ir 28S rRNR genų dalines sekas. Šakų ilgis proporcingas evoliuciniam nukleotidų sekos pakitimų mastui, skaičiai parodo 500 pakeitimų atitinkančias bootstrapping vertes.**

*Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V) ir *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I), formuoja atskirą šaką dendrogramoje, o *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III) jungiasi su *Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II). Antro-trečio tipų sarkocistų sienelės pasižymi morfologiniu panašumu. *Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V) ir *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I) artimai giminingos *Frenkelia* genties rūšims. Tai galėtų būti susiję su tuo, jog penkto tipo varnos sarkosporidijų ir pirmo tipo baltakaktės žąsies sarkosporidijų galutiniai šeimininkai yra ne šuninių šeimos atstovai, kaip tai dalinai nustatyta trečio tipo baltakaktės žąsies sarkosporidijoms, bet plėšrieji paukščiai, kurie yra *Frenkelia* genties rūšių galutiniai šeimininkai. Šios prielaidos paneigimui ar patvirtinimui būtini išsamūs gyvybinių ciklų tyrimai. Filogenetinė *Sarcocystidae* šeimos 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų analizė atskleidė, kad filogenetinius ryšius *Sarcocystidae* šeimoje nemaža dalimi lemia sarkosporidijų gyvybinio ciklo ypatybės bei šeimininkų spektras.

Pažymėtina, jog jungtinis 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų medis yra patikimas, šakų susigrupavimą patvirtina aukštos *bootstrapping* vertės (mažiausia reikšmė 85%, o visos kitos viršija 90%). Duomenys parodo rDNR sekų, kaip molekulinį žymenų tinkamumą *Sarcocystidae* šeimos filogenetiniuose ir taksonominiuose tyrimuose.

Lyginamoji *Sarcocystidae* šeimos dalinių 18S ir 28S rRNR genų sekų analizė parodė, kad nukleotidų pakaitų skirtumai varijuoja nuo 0.1% iki 9.4% (4. Lentelė). Dendrogramos pirmos grupės rūšių nukleotidų skirtumai mažesni negu trečios grupės rūšių, atitinkamai 1.95% (0.5-3.6%) ir 4.96 % (0.6-8.3%). Tai parodo mažesnius evoliucinius skirtumus tarp pirmos grupės atstovų, kurių daugumos rūšių tarpinis ar galutinis šeimininkas – paukščiai (išskyrus *Sarcocystis neurona* ir *Sarcocystis muris*, jų šeimininkai tik žinduoliai), lyginant su trečios grupės rūšimis, kurių gyvybiniuose cikluose dominuoja žinduoliai. Pažymėtina, kad trečios *Sarcocystidae* šeimos monofiletinės grupės rūšys pasižymi griežtu specifiškumu tarpiniam šeimininkui, o pirmos grupės rūšims nebūdingas hostalinis specifiškumas. Kadangi paukščiai evoliuciniu požiūriu yra jaunesnė taksonominė grupė negu žinduoliai, tad aukštas hostalinio specifiškumo laipsnis gali būti ilgiau trunkančios parazito ir šeimininko koevoliucijos pasekmė. Tyrimo rezultatai atskleidžia aukštą parazitų ir jų šeimininkų koevoliucijos laipsnį, tai patvirtina ir *Sarcocystidae* šeimos rūšių 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų procentinių skirtumų analizė, parodanti jog paukščių sarkosporidijų rūšys evoliuciškai vėliau susiformavo, negu žinduolių sarkosporidijos. Apskaičiuotos nukleotidų pakaitų skirtumų reikšmės *Toxoplasmatinae* pošeimiui (1.42%), yra žymiai mažesnės negu *Sarcocystinae* pošeimiui (4.98%), o *Hammondia hammondii*, *Toxoplasma gondii* ir *Neospora caninum* nukleotidų skirtumai tesiekė 0.31%. *Sarcocystis* genties nariai pasižymi dideliu variabilumu 18S ir 28S rRNR genuose. Taigi, *Sarcocystis* genties rūšių atskirumui tinka minėtieji genai, priešingai *Toxoplasmatinae* pošeimio rūšių 18S ir 28S rRNR



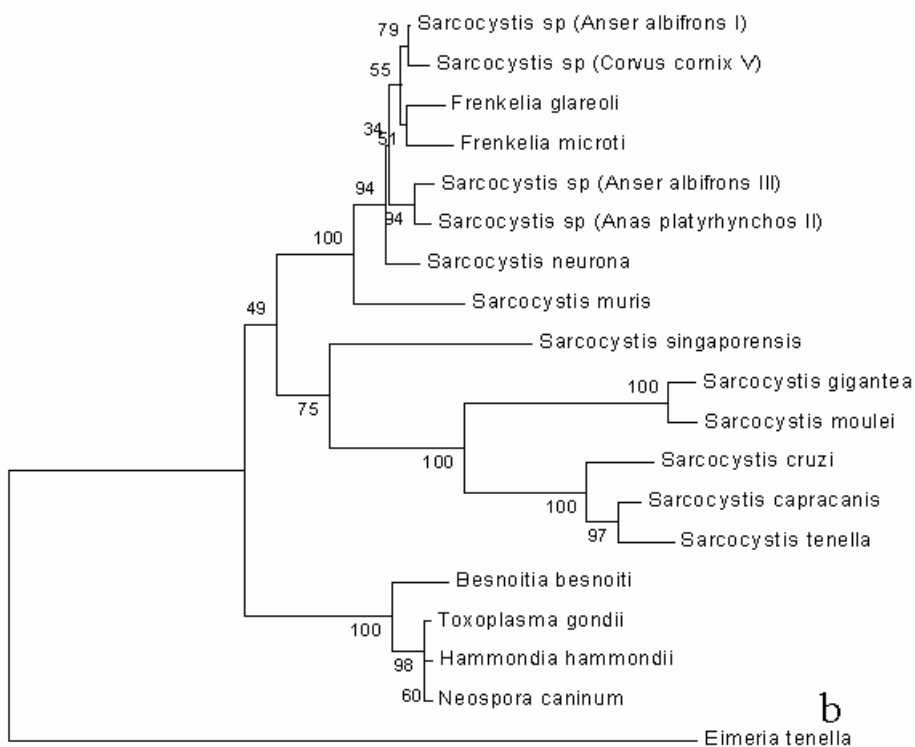
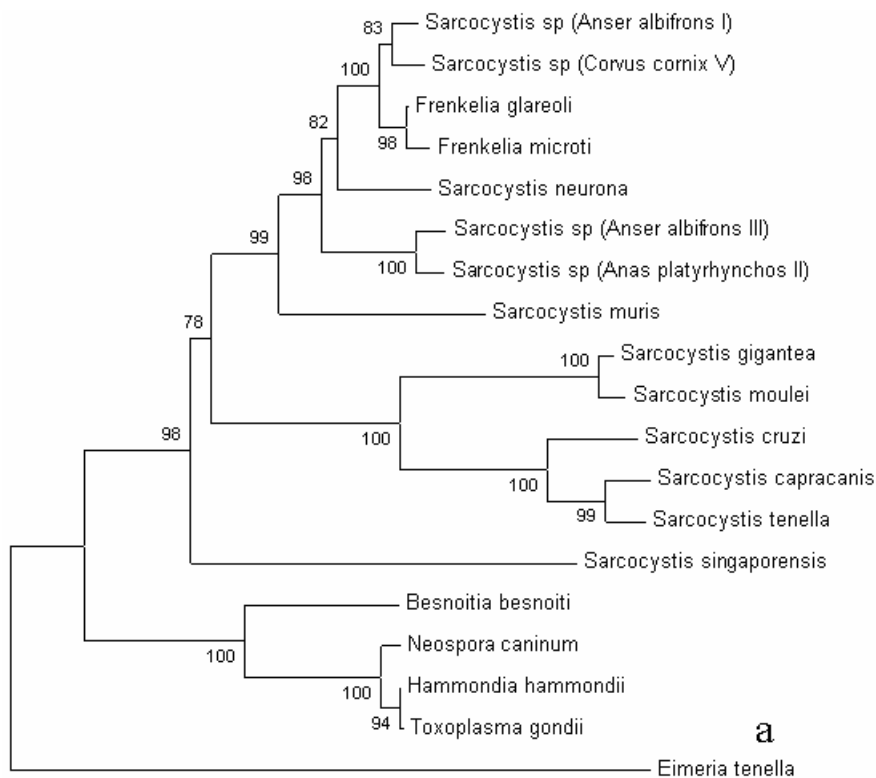
genų analizė ne visada atskleidžia šios grupės kai kurių atstovų filogenetinius ryšius (Ellis ir kt. 1999).

**4. Lentelė. Sarcocystidae šeimos rūšių santykiniai procentiniai skirtumai, remiantis 18S ir 28S rRNR genų sekų palyginimu.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	–																	
2	1.7	–																
3	1.7	0.5	–															
4	0.5	1.9	1.9	–														
5	0.7	1.9	2.0	0.9	–													
6	0.9	2.1	2.2	1.1	0.6	–												
7	1.5	1.9	1.9	1.6	1.7	1.7	–											
8	3.2	3.4	3.6	3.3	3.3	3.4	3.4	–										
9	6.9	6.7	6.7	7.0	6.8	7.0	6.9	7.0	–									
10	7.1	6.8	6.9	7.2	7.0	7.3	7.0	7.2	0.9	–								
11	6.5	6.7	6.7	6.8	6.6	6.8	6.6	7.1	4.7	4.8	–							
12	6.8	6.5	6.5	6.9	6.7	6.9	6.7	6.9	1.8	1.9	4.9	–						
13	6.6	6.7	6.7	6.9	6.7	6.9	6.8	7.2	4.8	4.9	0.6	5.0	–					
14	6.0	6.3	6.3	6.0	6.0	6.2	6.0	7.0	8.1	8.3	8.1	7.9	8.1	–				
15	5.9	6.4	6.4	6.2	5.9	6.1	6.3	6.6	9.0	9.2	9.3	9.3	9.4	8.3	–			
16	6.0	6.3	6.3	6.3	5.8	6.1	6.1	6.7	9.3	9.4	9.2	9.4	9.3	8.5	2.6	–		
17	6.0	6.3	6.4	6.4	5.9	6.1	6.1	6.7	9.3	9.4	9.2	9.4	9.4	8.5	2.5	0.1	–	
18	6.1	6.3	6.3	6.3	5.8	6.0	6.0	6.8	9.3	9.4	9.2	9.4	9.3	8.3	2.6	0.3	0.3	–

1 – *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas I), 2 – *Sarcocystis* sp. (*Anas platyrhynchos* cistos tipas II), 3 – *Sarcocystis* sp. (*Anser albifrons* cistos tipas III), 4 – *Sarcocystis* sp. (*Corvus cornix* cistos tipas V), 5 – *Frenkelia glareoli*, 6 – *Frenkelia microti*, 7 – *Sarcocystis neurona*, 8 – *Sarcocystis muris*, 9 – *Sarcocystis capracanis*, 10 – *Sarcocystis tenella*, 11 – *Sarcocystis gigantea*, 12 – *Sarcocystis cruzi*, 13 – *Sarcocystis moulei*, 14 – *Sarcocystis singaporensis*, 15 – *Besnoitia besnoiti*, 16 – *Hammondia hammondii*, 17 – *Toxoplasma gondii*, 18 – *Neospora caninum*.

Pažymėtina, kad tik pagal 28S rRNR geno dalines sekas sukonstruota dendrograma atitinka jungtinį 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų filogenetinį medį, tačiau nustatytos žemesnės šakų susigrupavimą patvirtinančios reikšmės (6. Paveikslėlis). *Sarcocystis neurona* filogenetinė padėtis gauta



**6. Paveikslėlis. Sarcocystidae šeimos filogenetiniai medžiai. a) pagal 18S rRNR geno dalines, b) pagal 28S rRNR geno dalines sekas. Šakų ilgis proporcingas evoliuciniam nukleotidų sekos pakitimų mastui, skaičiai parodo 500 pakeitimų atitinkančias bootstrapping vertes.**

atliekant 18S rDNR dalinių sekų analizę neatitinka lokalizacijos bendrame 18S ir 28S rDNR filogenetiniame medyje. Sarcocystidae filogenetiniams ryšiams atskleisti reikalingas pakankamai didelis fragmentas, kuriame išlaikomas tinkamas variabilių ir konservatyvių segmentų santykis; geriausia pilnas didysis arba mažasis ribosominės RNR subvienetas, arba abu subvienetai. Šiame darbe naudotos 18S rDNR dalinės sekos sudaro apytiksliai 80% viso 18S rRNR geno, o 28S rDNR dalinės sekos sudaro apytiksliai 52% viso 28S rRNR geno. Į tyrime panaudotas 28S rDNR dalinės sekas įeina ir labai informatyvus virš 300 bp turintis D2 domenas, kurio sekomis paremti filogenetiniai medžiai atspindi pagrindinį Sarcocystidae šeimos narių susigrupavimą (Mugridge ir kt. 2000). Filogenetiniai ryšiai nustatyti pagal 18S, 28S rRNR genų dalines sekas ir pagal 18S, 28S rRNR genų pilnas sekas sutampa (duomeys nepateikiami). Apibendrinant, šiame darbe panaudojus 18S ir 28S rRNR genų sekų analizę, patikimai atskleistas iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų, išskirtų sarkosporidijų taksonominis statusas ir filogenetinė padėtis.

## IŠVADOS

- Šiame darbe iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų, išskirtos sarkosporidijos aprašomos pirmą kartą ir yra neįvardintos rūšys.
- Baltakaktėje bei pilkojoje žąsyse išskirtos III tipo sarkocistos galėtų būti tos pačios sarkocistų rūšies parazitavimo skirtingų rūšių tarpiniuose šeimininkuose atvejais.
- Tiriamos rūšys filogenetiniame medyje susigrupuoja su *Frenkelia microti*, *Frenkelia glareoli*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis neurona*.
- Naudojant 18S ir 28S rDNR žymenis patikimai nustatyta šių rūšių filogenetinė bei taksonominė padėtis.
- Pagrindiniai veiksniai, įtakojantys Sarcocystidae šeimos filogenetinius ryšius, yra sarkosporidijų gyvybinio ciklo ypatybės, šeimininkų spektras bei parazitų specifiškumas šeimininkui.
- Sarcocystidae šeimos filogenetinių ryšių tyrimas atskleidė *Sarcocystis* rūšių su jų galutiniais šeimininkais koevoliucijos reiškinių.

## LITERATŪRA

1. Aljanabi M.S. and Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22): 1772-1773.
2. 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. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 548-553.
3. 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. *Molecular Biology and Evolution*, 8, 345-355.
4. Berrocal A. Lopez A. 2003. Pulmonary sarcocystosis in a puppy with canine distemper in Costa Rica. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15, 292-294.
5. Box E.D., Meier J.L., Smith J.H. 1984. Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. *Journal of Protozoology*, 31, 521-524.
6. Constanzo G.R. 1990. *Sarcocystis* in American black ducks wintering in New Jersey. *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 387-389.
7. Doležel D., Koudela B., Jirku M., Hypša V., Obornik M., Votypka J., Modry D., Šlapeta J.R., Lukeš J. 1999. Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles support the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *International Journal of Parasitology*, 29 795-798.
8. Dubey J.P. 1982. Development of ox-coyote cycle of *Sarcocystis cruzi*. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 29, 591-595.
9. Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R 1989. *Sarcocystosis of animals and man*. Boca Raton, FL: CRC Press.
10. Dubey, J.P. 1993. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other cyst-forming coccidian of humans and animals. J.P. Kreier (ed.) *Parasitic Protozoa*, 2nd edition, volume 6, San Diego: Academic Press.
11. Dubey J.P., Lindsay D.S., Rezende P.C.B., Costa A.J. 2000. Characterization of an unidentified *Sarcocystis falcatula*-like parasite from the South American opossum. *Didelphis albiventris* from Brazil. *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 47, 538-544.
12. Dubey P.J., Quist C.F., Fritz D.L. 2000. Systemic sarcocystosis in a wild turkey from Georgia. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(4), 755-760.
13. Dubey P.J., Odening K. 2001. Toxoplasmosis and related infections. In Kocan A.A., Pybus M.J., Samuel W.M. *Parasitic diseases of wild mammals*. Iowa State University Press. 478-519.

14. Dubey, J.P., Cawthorn, R.J., Speer, C.A. and Wobeser, G.A. 2003. Redescription of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: 476-482.
15. Dubey J.P., Zarnke R., Thomas N.J., Wong S.K., Bonn V.W., Briggs M., Davis J.W., Ewing R., Mense M., Kwock O.C.H., Romand S., Thulliez P. 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Veterinary Parasitology*, 116, 275–296.
16. Dubey J.P., Rosenthal B.M., Morales J.A., Alfaro A. 2006. Morfologic and genetic characterization of *Sarcocystis* sp. From the African grey parrot, *Psittacus erithacus*, from Costa Rica. *Acta Parasitologica*, 51(3) 161-168.
17. 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. *Journal of Parasitology*, 110, 521-528.
18. 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. *Parasitology Research*, 97, 345-357.
19. 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. *Infection and Imunity*, 74, 3448-3454.
20. Fayer R. 1972. Gametogamy of *Sarcocystis* sp. in cell culture 1972. *Science*, 175, 65-67.
21. Fayer R. and Dubey J.P. 1982. Development of *Sarcocystis fayeri* in the equine. *Journal Of Parasitology*, 68, 856-860.
22. Fayer R., Leek R.G., Lynch G.P. 1982. Attempted transmission of *Sarcocystis bovicanis* from cows to calves via colostrum. *Journal of Parasitology*, 68, 1127-1129.
23. Fayer R. 2004. *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 894-902.
24. Frenkel, J.K. 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of the cyst-forming isosporoid coccidia. *Journal of Parasitology* 63:611-628.
25. Fritz D.L. ir Dubey J.P. 2002. Pathology of *Sarcocystis neurona* in interferon-gamma gene knockout mice. *Veterinary Potology*, 39, 137-140.
26. Gajadhar A.A. ir Marquardt W.C. 1992. Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56, 41-46.
27. Goldova M., Paluš V., Letkova V., Kočíšova A., Čurlík J., Mojžišova J. 2006. Parasitoses in pheasants (*Phasianus colchicus*) in confined systems. *Veterinaski Arhiv*, 76, 83-89.

28. Griekienienė J., Kutkienė L. 1998. New experimental data on the laboratory rat as a definitive host of *Sarcocystis rodentifelis*. *Acta Zoologica Lituanica*, 8, 121-123.
29. Henderson J.M., Dies K.H., Haines D.M., Higgs D.W., Ayroud M. 1997. Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep. *The Canadian Veterinary Journal*, 38(3), 168-170.
30. Holmdahl O.J.M., Morrison D., Ellis J., Houg L.T.T. 1999. Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) parasites based on small subunit rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolutions*, 11, 27-37.
31. Huong L.T.T., Dubey, J.P., Nikkila T. and Uggla A. 1997. *Sarcocystis buffalonis* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Vietnam. *Journal of Parasitology*, 83, 471-474.
32. Jeffries A.C., Schnitzler B., Heydorn O., Johnson A.M., Tenter A.M. 1997. Identification of synapomorphic characters in the genus *Sarcocystis* based on 18S rDNA sequences comparison. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44, 388-392.
33. Johnson A.M., Illana S., Hakendorf P., Baverstock P.R. 1998. Phylogenetic relationships of the apicomplexan protist *Sarcocystis* as determined by small subunit ribosomal RNA comparison. *Journal of Parasitology*, 74(5), 847-860.
34. Kalisinska E., Betlejewska K.M., Schmidt M., Gozdzcka-Jozefiak A.G., Tomczyk G. 2003. Protozoal macrocysts in the skeletal muscles of a mallard duck in Poland: the first record case. *Acta Parasitologica*, 48(1), 1-5.
35. Kumar S., Tamura K. and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
36. Koudela B., Modry D., Svobodova M., Votypka J., Vavra J., Hudcovic T. 1999. The severe combined immunodeficient mouse as a definitive host for *Sarcocystis muris*. *Parasitology Research*, 85, 737-742.
37. Kutkienė L., Sruoga A. 2004. *Sarcocystis* spp. in birds of the order Anseriformes. *Parasitology Research* 92, 171-172.
38. Kutkienė L., Sruoga A. and Butkauskas, D. 2006. *Sarcocystis* sp. from white-fronted goose (*Anser albifrons*): cyst morphology and life cycle studies. *Parasitology Research*, 99, 562-565.
39. Levine, N.D. 1988. *The protozoan phylum Apicomplexa*. Volume 1. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
40. Linsay, D.S. and Todd, K.S. 1993. Coccidia of mammals. J.P. Kreier (ed.) *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., vol 4., San Diego: Academic Press.

41. Malakauskas M. Griekienienė J. 2002. Sarcocystis infection in wild Ungulates in Lithuania. *Acta Zoologica Lithuanica*, 12(4), 372-380.
42. McPherson M. J. and Moller S. G. 2000. PCR. Bios Scientific Publishers Limited.
43. Modry D., Votypka J., Svobodova M. 2004. Note on the taxonomy of *Frenkelia microti* (Findlay & Middleton, 1934) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Systematic Parasitology*, 58,185–187.
44. 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. *Journal of Wildlife Diseases*, 27, 491-493.
45. Mugridge N.B., Morrison D.A., Johnson A.M., Luton K., Dubey J.P., Votypka J. and 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. *International Journal for Parasitology*, 29, 957-972.
46. Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Jäkel, T., Heckerroth, A.R., Tenter, A.M. and Johnson, A.M. 2000. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family Sarcocystidae. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 1842-1853.
47. Odening, K. 1998. The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Systematic Parasitology*, 41, 209–233.
48. Pampllett R. ir O'Donoghue P. 1990. *Sarcocystis* infection of human muscle. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 20, 705-707.
49. Paulauskas A., Miceikienė I., Grigaliunaitė L., Malavičiūtė J., Tubelytė – Kirdienė V. 2002. Genetikos praktimumas: IV. DNR polimorfizmo tyrimo metodai (Mokymo priemonė). Kaunas: Vytauto Didžiojo universiteto leidykla.
50. Saville W.J.A., Reed S.M., Dubey J.P. 2002. Prevention of protozoal myeloencephalitis (EPM). *AAEP Proceedings*, 48, 181-185.
51. Smith D.D. and Frenkel J.K. 2003. Determination of the genera of cyst-forming coccidia. *Parasitology Research*, 91, 384-389.
52. Spalding M.G., Atkinson C.T., Carleton C.E. 1994. *Sarcocystis* spp. in wading birds (Ciconiiformes) from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(1), 29-35.
53. Spalding M.G., Yowell C.A., Lindsay D.S., Greiner E.C., Dame J.B. 2002. *Sarcocystis* meningoencephalitis in a northern gannet (*Morus bassanus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 38(2), 432-437.
54. 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 BM, 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. *Veterinary Parasitology*, 117, 239-249.
55. Svobodova M., Voriček P., Votypka J., Weidinger K. 2004. Heteroxenous Coccidia (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the populations of their final and intermediate hosts: European buzzard and small mammals. *Acta Parasitologica*, 43, 251-260.
56. Šlapeta J.R., Modry D., Votypka J., Jirku M., Koudela B., Lukeš J. 2001. Multiple origin of the dihomoxenous life cycle in sarcosporidia. *International Journal for Parasitology*, 31, 413-417.
57. Šlapeta J.R., Koudela B., Votypka J., Modry D., Horyeš R., Lukeš J. 2002. Coprodiagnosis of *Hammondia heydorni* in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary Journal*, 163, 147-154.
58. Šlapeta J.R., Modry D., Votypka J., Jirku M., Lukeš J., Koudela B. 2003. Evolutionary relationships among cyst-forming coccidian *Sarcocystis* spp. (Alveolata: Apicomplexa: Coccidea) in endemic African tree vipers and perspective for evolution of heteroxenous life cycle. *Molecular Biology and Evolution*, 27, 464-475.
59. 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*. *Journal of Parasitology*, 85, 221-228.
60. 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. *International Journal for Parasitology*, 22, 503-513.
61. Tenter A.M., Johnson A.M. 1997. Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Advances in Parasitology*, 39, 69-139.
62. Thomas V. and Dissanaikie A.S. 1978. Antibodies to *Sarcocystis* in Malaysians. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 303-306.
63. Van den Enden E.M., Praet R. J. Van Gompel A., Gigasse P. 1995. Eosinophilic myositis resulting from sarcocystosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98, 273 -276.
64. Votypka J., Hypša V., Jirku M., Flegr J., Vavra J., Lukeš J. 1998. Molecular phylogenetic relatedness of *Frenkelia* spp. (Protozoa, Apicomplexa) to *Sarcocystis falcatula* Stiles 1893: is the genus *Sarcocystis* paraphyletic? *Journal of Eucaryotic Microbiology*, 45, 137-141.

65. Wee S.H. and Shin S.S. 2001. Experimental induction of the two-host life cycle of *Sarcocystis cruzi* between dogs and Korean native calves. *The Korean Journal of Parasitology*, 39, 227-232.
66. Wobeser G., Leighton F.A. and Cawthorn R.J. 2004. Occurrence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in wild geese in Saskatchewan. *Canadian Journal of Zoology*, 59, 1621-1624.
67. Yang Z.Q., Zuo Y.Z., Ding B., Chen X.W., Luo J., Zhang Y.P. 2001. Identification of *Sarcocystis* hominis-like (Protozoa: Sarcocystidae) cyst in water buffalo (*Bubalus bubalis*) based on 18S rRNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 87(4), 934-937.

## **PADĖKA**

Dėkoju darbo vadovui dr. D.Butkauskui, dr. L.Kutkienei ir prof.habil.dr. A.Sruogai už vertingus patarimus, VU Ekologijos institutui už galimybę naudotis medžiagomis ir priemonėmis, J.Zdanevičiui už sumedžiotus paukščius, kuriuose aptiktos sarkosporidijos.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF THE PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF *SARCOCYSTIS* SPP. FOUND IN BIRDS USING 18S AND 28S rRNA GENE PARTIAL SEQUENCES

Petras Prakas

Institute of Ecology of Vilnius University, Laboratory of Population Genetics, Vilnius, Lithuania

Based on cyst morphology, *Sarcocystis* cysts type I were found in white-fronted goose (*Anser albifrons*), cysts type II in mallard (*Anas platyrhynchos*), cyst type III in one grey-lag goose (*Anser anser*) and two white-fronted geese, cyst type V in hooded crow (*Corvus cornix*). The sarcocysts isolated from the infected birds as intermediate host have not been previously described and are unnamed. Type III sarcocysts detected in white-fronted and greylag geese may illustrate the case of polyhostal nature of sarcocysts when the same-species parasites infesting intermediate hosts of different species. The obtained 18S and 28S ribosomal RNA partial gene sequences showed the highest homology for the genera *Sarcocystis* and *Frenkelia*. In the tree of phylogenetic relationships, the species involved in this study were grouped with *Frenkelia microti*, *Frenkelia glareoli*, *Sarcocystis muris* and *Sarcocystis neurona*. Results show co-evolution of *Sarcocystis* spp. with the final host. Based on data obtained it could be stated that phylogenetic relationships of Sarcocystidae family are influenced by peculiarity of life cycle, hosts spectrum and host specificity. Analysis of the partial sequences of 18S and 28S ribosomal RNA revealed the phylogenetic and taxonomic status of the investigated *Sarcocystis* spp.

## SANTRAUKA

### PAUKŠČIUOSE APTINKAMŲ NEAPIBŪDINTŲ *SARCOCYSTIS* GENTIES RŪŠIŲ FILOGENETINIŲ RYŠIŲ TYRIMAS NAUDOJANT DALINES 18S IR 28S rRNR GENUŲ SEKAS

Petras Prakas

Vilniaus Universiteto Ekologijos Institutas, Populiacinės Genetikos Laboratorija, Vilnius, Lietuva.

Pagal cistų morfologiją, baltakaktėje žąsyje (*Anser albifrons*) aptiktos I tipo sarkocistos, didžiojoje antyje (*Anas platyrhynchos*) rastos II tipo sarkocistos, dviejose baltakaktėse žąsyse ir pilkojoje žąsyje (*Anser anser*) nustatytos III tipo sarkocistos, varnoje (*Corvus cornix*) identifiikuotos V tipo sarkocistos. Iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų išskirtos sarkosporidijos aprašomos pirmą kartą bei yra neįvardintos rūšys. Baltakaktėje bei pilkojoje žąsyse išskirtos III tipo sarkocistos gali būti tos pačios sarkocistų rūšies parazitavimo skirtingų rūšių tarpiniuose šeimininkuose atvejis. Nustatytos 18S ir 28S rDNR fragmentų sekos pasižymėjo didžiausia homologija *Sarcocystis* bei *Frenkelia* gentims. Filogenetinių ryšių medyje sugrupuojamos šiame darbe tiriamos rūšys su *Frenkelia microti*, *Frenkelia glareoli*, *Sarcocystis muris*, *Sarcocystis neurona*. Rezultatai atskleidė *Sarcocystis* genties rūšių koevoliuciją su jų galutiniais šeimininkais. Remiantis tyrimo duomenimis, galima teigti, kad Sarcocystidae šeimos filogenetinius ryšius apsprendžia sarkosporidijų gyvybinio ciklo ypatybės, šeimininkų spektras bei parazitų specifiškumas šeimininkui. 18S ir 28S rRNR genų dalinių sekų analizė atskleidžia tirtų *Sarcocystis* sp. rūšių filogenetinę bei taksonominę padėtį.