

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

NAGLIS GUDIŠKIS

**Netipinių *Sarcocystis* rūšių nustatymas Lietuvoje auginamose naminėse avyse
(*Ovis aries*)**

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Petras Prakas

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRAUKA.....	3
SUMMARY.....	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. <i>Sarcocystis</i> genties parazitų charakteristika.....	7
1.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų gyvybinis ciklas.....	7
1.3. <i>Sarcocystis</i> spp. morfologija	10
1.4. Šuninių šeimos plėšrūnų vaidmuo platinant <i>Sarcocystis</i> parazitus.....	11
1.5. <i>Sarcocystis</i> parazitų identifikavimo metodai	12
1.6. Avyse aptinkamų <i>Sarcocystis</i> rūšių įvairovė	14
1.7. <i>Sarcocystis</i> parazitų patogeniškumas ir prevencija.....	16
1.8. Tipinių ir netipinių <i>Sarcocystis</i> rūšių avyse tyrimai pasaulyje	19
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	21
2.1. Tyrimo objektas.....	21
2.2. Medžiagos	21
2.3. Metodai.....	23
2.3.1. <i>Sarcocystis</i> rūšių nustatymas avių raumeniniuose audiniuose.....	23
2.3.2. Sarkocistų identifikavimas molekuliniais metodais.....	26
2.3.3. <i>Sarcocystis</i> rūšių identifikavimas galutiniuose šeiminkuose	27
2.3.4. Genetinė analizė	27
2.3.5. Statistinė analizė.....	28
3. REZULTATAI	29
3.1. <i>Sarcocystis</i> rūšinė įvairovė Lietuvoje auginamų avių raumeniniuose audiniuose.....	29
3.2. <i>Sarcocystis</i> parazitų identifikavimas dažytuose pavyzdžiuose	36
3.3. <i>Sarcocystis</i> rūšių, parazituojančių naminėse avyse, paplitimas Lietuvoje.....	38
4. REZULTATŲ APTARIMAS	40
IŠVADOS	44
ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS	45
PADĖKA	46
LITERATŪROS SĄRAŠAS	47
PRIEDAI.....	58

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Naglis Gudiškis

Netipinių *Sarcocystis* rūšių nustatymas Lietuvoje auginamose naminėse avyse (*Ovis aries*)

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Sarcocystis parazitai infekuodami roplius, paukščius, žinduolius, įskaitant žmogų, gali sukelti didelių ekonominių nuostolių bei problemas gyvulininkystės sektoriuje. Iki šiol manyta, jog žemės ūkio gyvūliuose parazituojančios *Sarcocystis* rūšys pasižymi specifiskumu tarpiniam šeimininkui, tačiau naujais duomenimis verčia abejoti šia teorija. Žinoma, jog naminė avis gali būti šešių *Sarcocystis* rūšių tarpiniu šeimininku: *S. arieticanis*, *S. tenella*, *S. gigantea*, *S. medusifformis*, *S. microps* ir *S. mihoensis*.

Šio darbo metu buvo siekta identifikuoti netipinių *Sarcocystis* rūšių įvairovę Lietuvoje auginamų avių raumeniniuose audiniuose (diafragmoje, stemplėje ir širdyje), naudojant *cox1* geno analizę. Šiam tikslui pasiekti buvo iškelti trys uždaviniai: identifikuoti netipines *Sarcocystis* rūšis avių audiniuose, išbandyti ir optimizuoti gDNR skyrimą iš izoliuotų sarkocistų dažytose raumeninėse iškarpose, bei nustatyti kaip Lietuvoje sutinkami šuniniai plėšrūnai prisideda prie darbo metu nustatytų rūšių platinimo.

Rytinėje Lietuvos dalyje augintų 47 naminių avių raumeniniai pavyzdžiai buvo surinkti iš licenzijuotos skerdyklos, o šių audinių analizė atlikta Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijoje. Darbo metu pirmą kartą pasaulio mastu identifikuotos netipinės naminėms avims *S. capracanis* ir *S. morae* rūšys. Išbandžius ir optimizavus gDNR skyrimo iš izoliuotų pavienių sarkocistų metodiką, aptiktos tik itin dažnai avyse parazituojančių *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių sarkocistos. Identifikuojant trijų Lietuvoje aptinkamų šuninių šeimos atstovų vaidmenį *Sarcocystis* parazitų platinime, dokumentuoti nauji avyse kaip tarpiniuose šeimininkuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių galutiniai šeimininkai. Pirmą kartą pasaulio mastu nustatyta, jog rudoji lapė gali būti *S. arieticanis* ir *S. morae* rūšių, o pilkasis vilkas *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių galutiniais šeimininkais. Taip pat pirmą kartą pasaulyje nustatyta, jog usūrinis šuo gali platinti *S. morae* ir *S. tenella* rūšies parazitus.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Naglis Gudiškis

Confirmation of atypical *Sarcocystis* species in Lithuanian domestic sheep (*Ovis aries*)

Master thesis

SUMMARY

Sarcocystis parasites can cause significant economic losses and livestock problems by infecting reptiles, birds, mammals, or humans. Until recently, *Sarcocystis* species were believed to be very highly specific to the intermediate host. However, recent data has raised uncertainties regarding this assumption. It is known that the domestic sheep can act as an intermediate host for six *Sarcocystis* species: *S. arieticanis*, *S. tenella*, *S. gigantea*, *S. medusiformis*, *S. microps*, and *S. mihoensis*.

This work aimed to identify the distribution of atypical *Sarcocystis* species in the muscle tissues (diaphragm, oesophagus, and heart) of sheep reared in Lithuania using nucleotide sequence analysis of the *cox1* gene. To achieve this goal, three objectives were set: to identify atypical *Sarcocystis* species in sheep tissues, to test and optimize gDNA extraction from isolated sarcocysts in stained muscle sections, and to determine the contribution of canine predators in Lithuania to the distribution of the species identified in the present study.

Muscle samples from 47 domestic sheep reared in the eastern part of Lithuania were collected from a licensed slaughterhouse and analyzed in the Molecular Ecology Laboratory of the Nature Research Centre. This work led to the first global identification of the atypical domestic sheep species *S. capracanis* and *S. morae*. After testing and optimizing the gDNA extraction method from isolated single sarcocysts, only sarcocysts of the widespread sheep-specific species *S. arieticanis* and *S. tenella* were detected. By identifying the role of the three Canidae members found in Lithuania in distribution *Sarcocystis* parasites, new definitive hosts have been documented for *Sarcocystis* species parasitising sheep as intermediate hosts. For the first time, it has been established that the red fox can be the definitive host of *S. arieticanis* and *S. morae*, and the grey wolf is the definitive host of *S. arieticanis* and *S. tenella*. It is also the first documentation in the world that the raccoon dog can spread *S. morae* and *S. tenella* parasites.

IVADAS

Infekuodami paukščius, roplius ar žinduolius Apicomplexa tipui priklausantys *Sarcocystis* genties pirmuonys gali sukelti parazitinį susirgimą – sarkocistozę. Ligos intesyvumas priklauso nuo aplinkos veiksnių, *Sarcocystis* rūšies bei šeimininko imunologinės būklės (Dubey et al., 2015a). Šių parazitų išgyvenimui yra reikalingas dviejų šeimininkų (aukos–plėšrūno) gyvybinis ciklas (Marandykina-Prakienė et al., 2022). Tarpinis šeimininkas parazitais gali užsikrėsti vartodamas sporocistomis užkrėstą maistą ar vandenį, o galutinis šeimininkas – per infekuotą tarpinio šeimininko raumeninį ar nervinį audinį (Fayer et al., 2015). Sarkocistožė yra pavojinga ir žmonėms, nes yra nustatyta, jog žmogus yra mažiausiai trijų *Sarcocystis* rūšių (*S. hominis*, *S. heydorni* ir *S. sui hominis*) galutinis šeimininkas (Rosenthal, 2021).

Naminė avis (*Ovis aries*) yra vienas iš daugelio *Sarcocystis* rūšių tarpinių šeimininkų, visame pasaulyje plačiai auginama dėl savo vilnos ir mėsos (Hong et al., 2016). Šiuo metu žinoma, jog naminė avis gali būti mažiausiai šešių skirtingų *Sarcocystis* rūšių šeimininku (Marandykina-Prakienė et al., 2022). Per katinių šeimos atstovus perduodamos makroskopines cistas avyse formuojančios *S. gigantea* ir *S. medusifformis* yra nepatogeniškos tarpiniam šeimininkui. Kita makroskopines sarkocistas formuojanti *S. mihoensis* ir mikroskopines cistas avyse formuojanti *S. microps* yra labai retos, o jų poveikis šeimininkui iki šiol lieka neaiškus (Dubey et al., 2015a). Tuo tarpu per šuninių šeimos atstovus plintančios mikroskopines sarkocistas formuojančios *S. arieticanis* ir *S. tenella* gali būti pavojingos avims, lemti produkcijos sumažėjimą, ūmius patologinius pakitimus ar netgi gyvūno žūtį (Elmishmishy et al., 2018).

Ilgą laiką buvo manoma, jog žemės ūkio gyvuliuose aptinkamos *Sarcocystis* spp. pasižymi griežtu tarpinio šeimininko specifiškumu. Tačiau pastaruoju metu literatūroje vis dažniau yra pastebima, jog *Sarcocystis* rūšys yra aptinkamos netipiniuose šeimininkuose. Pavyzdžiui, ožkose parazituojančios *S. moulei* rūšies sarkocistos buvo aptiktos Azijiniuose buivoluose (*Bubalus bubalis*), o laukinėse ožkose (*Capra aegagrus*) aptikta avims specifinė *S. tenella* rūšis (Kalantari et al., 2016; Dakhil et al., 2017). Nepaisant šių atradimų, kai kurių tyrimų rezultatai yra vis dar diskutuoti mokslininkų tarpe, todėl yra reikalingi papildomi *Sarcocystis* parazitų morfologiniai ir molekuliniai tyrimai.

Nors anksčiau Lietuvoje atliktų tyrimų metu naminių avių audiniuose identifikuotos tik patogeniškos *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių sarkocistos, iki šiol nebuvo ieškota kitų, avims netipinių *Sarcocystis* rūšių (Marandykina-Prakienė et al., 2022). Daugėjant duomenų apie netipinių *Sarcocystis* rūšių aptikimą anksčiau neaprašytuose šeimininkuose, pastebimas išsamesnių tyrimų poreikis šioje srityje. Dėl šių priežasčių, darbo metu netipinių avims *Sarcocystis* parazitų rūšių

įvairovė tirta Lietuvoje auginamų naminių avių raumeniniuose audiniuose (diafragmos, stemplės ir širdies) naudojant *cox1* molekulinį žymenį.

Darbo tikslas – nustatyti Lietuvoje auginamose naminėse avyse iki šiol neaptiktą *Sarcocystis* parazitų rūšinę įvairovę skirtinguose raumeniniuose audiniuose, naudojant *cox1* genetinį žymenį.

Darbo uždaviniai

1. Nustatyti *Sarcocystis* parazitų rūšis avių pavyzdžiuose naudojant PGR.
2. Identifikuoti *Sarcocystis* rūšis naudojant gDNR, išskirtą iš metileno mėliu dažytų sarkocistų.
3. Įvertinti Lietuvos šuninių plėšrūnų vaidmenį pernešant *Sarcocystis* rūšis, kurių tarpiniai šeimininkai yra avys.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Sarcocystis* genties parazitų charakteristika

Apicomplexa tipui priklauso daugiau nei 5000 filogenetiškai giminingų protistų rūšių, kurių sukeltos ligos yra pasaulinė sveikatos priežiūros problema (Wasmuth et al., 2009). *Sarcocystis* genčiai priklausantys parazitai ne tik atskleidžia mikroorganizmų pasaulio sudėtingumą, bet ir yra aktualūs pasauliniu mastu dėl keliamų nuostolių gyvulininkystėje. Pirmasis *Sarcocystis* parazitus aprašė šveicarų mokslininkas F. Miescher, aptikęs baltus į siūlus panašios struktūros darinius skersaruožiuose naminės pelės raumenyse (Dubey et al., 2015a). Praėjus 20 metų nuo pirmojo aptikimo, 1865 m. panašios struktūros buvo rastos tiriant kiaulių raumenų pavyzdžius (Fayer, 2004). Kurį laiką vieni mokslininkai manė, jog šie dariniai yra grybai dėl parazito gyvybinio ciklo informacijos stokos. Kiti teigė, jog šie dariniai gali būti protistai, tačiau tyrimų trūkumas neleido patvirtinti šių spekuliacijų. Hipotezė, jog *Sarcocystis* gali būti grybai atsirado dėl eksperimentų, kurių metu sarkocistos buvo patalpintos į skirtingas mitybines terpes. Po kelių dienų mėginiuose buvo rasta hifų, tačiau dabar yra pripažįstama, jog tai buvo tiesiog užterštumo rezultatas. Tik 1967 m., pasinaudojant elektroniniu mikroskopu, šiuose baltos spalvos dariniuose pastebėtos organelės, panašios į kitų Apicomplexa tipo protistų (Fayer et al., 2015). Dar po kelių metų iš paukščių raumenyse aptiktų sarkocistų buvo išskirti bradizoitai ir patalpinti į kultūrinės žinduolių ląsteles. Tokiu būdu buvo pastebėtos lytinės parazito stadijos, taip atrandant pagrindines *Sarcocystis* parazitų gyvybinio ciklo stadijas (Dubey et al., 2015a).

Šiuo metu yra ne tik aprašyta daugiau nei 200 skirtingų *Sarcocystis* rūšių, bet ir yra žinoma, jog šiems protistams yra reikalingas dviejų šeimininkų gyvybinis ciklas. Nepaisant to, mažiau nei pusės iš žinomų *Sarcocystis* rūšių, yra pilnai aprašytas gyvybinis ciklas, t.y. tiek tarpinis, tiek ir galutinis šeimininkai (Bezerra et al., 2023). Modernesni prietaisai ir didėjanti genetinių *Sarcocystis* duomenų bazė leidžia lengviau identifikuoti ne tik rūšis, bet ir parazitų šeimininkus. Svarbu pabrėžti, jog 2015 metais buvo pilnai nuskaitytas *S. neurona* rūšies genomas (127 Mbp), kuris daugiau nei du kartus didesnis už kitų kokcidijų genomus. Šis atradimas tik įrodo, jog *Sarcocystis* genties parazitai yra itin sudėtingi mikroorganizmai, reikalaujantys tolimesnių išsamių tyrimų (Blazewski et al., 2015).

1.2. *Sarcocystis* parazitų gyvybinis ciklas

Sarcocystis pasižymi dviejų šeimininkų (aukos-plėšrūno) gyvybiniu ciklu (1.1 pav.). Prie *Sarcocystis* parazitų plitimo gamtoje gali prisidėti ir vabzdžiai ar įvairūs paukščiai, pernešdami skirtingas *Sarcocystis* pirmuonių formas iš vienos vietos į kitą (Fukuyo et al., 2002). Nors įprastai tiek tarpinis, tiek ir galutinis *Sarcocystis* parazitų šeimininkas yra skirtingas, tačiau yra tam tikrų *Sarcocystis* rūšių, kurios savo gyvybinį ciklą gali pradėti ir užbaigti toje pačioje gyvūnų rūšyje.

Viena iš tokių rūšių parazituoja driežuose, kurie gali būti *S. gallotiae* rūšies tarpiniu ir galutiniu šeimininku (Matuschka & Bennert, 1987). *Sarcocystis gallotiae* savo gyvybinį ciklą pradeda ir užbaigia tame pačiame šeimininke – kanariniame drieže (*Gallotia galloti*). Subrendusios *S. gallotiae* rūšies sarkocistos yra aptinkamos šeimininko uodegoje. Roplių gentyje yra paplitęs kanibalizmas, todėl infektyvios sporocistos sugeba susiformuoti driežų žarnyne, šioms prarijus kitų driežų uodegas, tokiu būdu užbaigiant parazito gyvybinį ciklą (Šlapeta et al., 2001; Mateo & Pleguezuelos et al., 2015). Kitų dviejų rūšių – *S. cymruensis* (syn. *S. rodentifelis*) ir *S. muris* – tarpiniu ir galutiniu šeimininku gali būti pilkoji žiurkė (*Rattus norvegicus*) (Grikienienė & Kutkienė, 1998; Hu et al., 2011).



1.1 pav. *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas (parengta pagal Dubey et al., 1989)

Gamtoje aptinkamos infektyvios *Sarcocystis* parazito formos – sporocistos – infekuoja maistą bei vandenį. Tokioje aplinkoje misdamas tarpinis šeimininkas užsikrečia *Sarcocystis* parazitais, o sporocistos patenka į organizmą ir keliauja iki plonojo žarnyno (Fayer, 2004). Šioje vietoje sporocistos sienelės sudarančios plokštelės yra suardomos, tokiu būdu išlaisvinant keturis viduje esančius infekcinius sporozoitus (Al Quraishy et al., 2014). Judrūs sporozoitai migruoja žarnyno epitelium, patenka į endotelio ląsteles smulkiosiose arterijose, išsidėsčiusiose visame organizme (Fayer, 2004). Sporozoitams pasišalinus iš žarnyno, dažniausiai mezenteriniuose limfmazgiuose įvyksta pirmoji iš kelių šizogonijos (nelytinių) kartų, kurios rezultatas daugybiniai šizontai (merontai) (Lindsay et al., 1995). Svarbu pabrėžti, jog šizogonijos kartų skaičius kiekvienai *Sarcocystis* rūšiai gali būti skirtingas (Verma et al., 2017). Antrosios kartos šizogonijos procesas

vyksta kapiliaruose arba daugelyje kūno audinių esančiose mažose arterijose (Dubey et al., 2015a). Šeimininko citoplazmoje lokalizuoti pirmųjų dviejų kartų šizontai yra vienodi tiek forma, tiek ir dydžiu, tačiau griaučių raumenyse aptinkami šizontai yra išskirtinai ilgesni nei kituose audiniuose (Lindsay et al., 1995; Fayer et al., 2015). Paskutinės kartos merozoitai išsiskyrę į kraujotaką keliauja iki širdies ir skersaruožių raumenų ląstelių (Lindsay et al., 1995). Merozoitams patekus į raumenines ląsteles, jie pradeda sarkocistos formavimą diferencijuodamiesi į vieną apvalią ląstelę, vadinamą metrocitu arba motinine ląstele (Fayer et al., 2015). Per keletą dalijimųsi susidaro metrocitų sancaupos, dėl kurių didėja ir besiformuojanti sarkocista. Lygiagrečiai šiems procesams vystosi ir sarkocistos sienelė, izoliuojanti ją nuo aplinkinių raumenų (Dubey et al., 2015a). Sarkocista laikoma subrendusia, kuomet po kelių kartų, vykstant endodiogenijos procesui, metrocitai suformuoja infekcinius pūsmėnūlio arba banano formos kūnelius – bradizoitus (Fayer, 2004). Paprastai sarkocistos tampa infektyviomis praėjus maždaug 75 dienoms nuo tarpinio šeimininko užsikrėtimo. Tačiau šių galutiniam šeimininkui infektyvių formų brendimas priklauso nuo konkrečios *Sarcocystis* rūšies, todėl gali užtrukti du mėnesius ar net ilgiau (Dubey et al., 2015a; Fayer et al., 2015).

Galutiniais *Sarcocystis* parazitų šeimininkais tampa plėšrūnai, visaėdžiai ar dvėsena mintantys gyvūnai. Subrendusios sarkocistos į galutinio šeimininko organizmą patenka jam mintant tarpinio šeimininko nerviniu arba raumeniniu audiniu (Fayer, 2004). Tarpinio šeimininko audiniams pasiekus žarnyną, virškinamojo trakto fermentai pažeidžia sarkocistos sienelę arba ši įtrūksta mechaniškai. Tokio proceso rezultatas yra judrių bradizoitų išlaisvinimas į žarnyno ertmę (Dubey et al., 2015a). Šie laisvi dariniai patenka į žarnyno gleivinės jungiamojo audinio (lot. *lamina propria*) ląsteles, kur kiekvienas viduląstelinis bradizoitas išsivysto į vyrišką arba moterišką stadiją. Vieni bradizoitai formuoja daugiabranduolinius mikrogametocitus, iš kurių išsivysto į spermatozoidus panašios mikrogametos. Kiti formuoja makrogametas, panašias į bebranduoles kiaušialąstes (Rassouli et al., 2014). Šis mikrogamontų bei makrogamontų formavimosi procesas yra greitas, trunkantis nuo 6 iki 18 valandų (Dubey et al., 2015a). Susiliejus šioms dviem skirtingoms gametoms, makrogametos citoplazma nuosekliai vystosi ir virsta subrendusia oocista, talpinančia dvi sporocistas. Oocistos patenka į žarnyno liumeną, iš kur į aplinką pasišalina kartu su išmatomis (Fayer, 2004). Nepažeistos oocistos išmatose paprastai pastebimos tik pirmosiomis dienomis ir atrodo kaip dvi greta esančios sporocistos, o pačios oocistos sienelė vos matoma. Tačiau neretai ši sienelė įtrūksta, tokiu būdu išlaisvinamos viduje esančios sporocistos, kurios dažniausiai yra vienintelė išmatose pastebima stadija (Dubey et al., 2015a).

1.3. *Sarcocystis* spp. morfologija

Prieš išaiškinant *Sarcocystis* parazitų gyvybinį ciklą, vienas iš pagrindinių naujos rūšies apibūdinimo kriterijų buvo sarkocistų struktūra (Levine, 1986). Šių parazitų struktūroje yra randamos organelės, būdingos eukariotiniams organizmams. Be branduolio, endoplazminio tinklo ar ribosomų, *Sarcocystis* pirmuonyse išskirtinai yra aptinkama tik Apicomplexa tipui būdingos struktūros, tokios kaip apikaliniai žiedai, pelikulė ar mikronemos (Dubey et al., 2015a).

Subrendusios sarkocistos daugiausiai aptinkamos tarpinių šeimininkų skersaruožuose raumenyse, tačiau jų skaičius ir pasiskirstymas visame organizme skiriasi priklausomai nuo šeimininko rūšies (Dong et al., 2018). Sarkocistų kiekiui ir infekcijos intensyvumui įtakos turi tiek į organizmą patekusių sporocistų skaičius, tiek ir šeimininko imunologinė būklė (Dubey et al., 2015a). *Sarcocystis* parazitų nelytinės stadijos formas – sarkocistas – galima aptikti širdies, stemplės, liežuvio, diafragmos ar skeleto raumenyse (Lau et al., 2014; Marandykina-Prakienė et al., 2022; Muthusamy et al., 2022). Nepaisant to, literatūroje yra aprašyta atvejų, kuomet iki galo nesubrendusios sarkocistos aptiktos ir lygiuosiuose žarnyno raumenyse (Dubey et al., 2015a). Verta paminėti, jog labai mažais kiekiais jos gali būti aptiktos centrinėje nervų sistemoje bei širdies Purkinjė skaidulose ir raumenų pluoštuose (Powell et al., 1986). Susiformavus bradizoitams, pasibaigia ir sarkocistos sienelės vyrstymasis, ji nekinta didėjant sarkocistai. Sarkocistų sienelės pokyčių nebuvimas yra vienas iš svarbių kriterijų, norint identifikuoti *Sarcocystis* parazitus (Nourollahi Fard et al., 2009). Priklausomai nuo *Sarcocystis* rūšies, sarkocistos gali ilgėti dar kelerius metus po to, kai tampa infektyviomis. Pavyzdžiui, avyse parazituojančios *S. medusiformis* rūšies sarkocistos pasiekia maksimalų ilgį (15 mm) šeimininko audiniuose tik praėjus keturiems metams nuo infekcijos pradžios. Taip pat pastebėta, jog sarkocistų forma varijuoja priklausomai nuo vystymosi vietos organizme. Pavyzdžiui, avyse parazituojančios *S. gigantea* rūšies sarkocistos diafragmoje yra matomos kaip pailgos ir plonos, o stemplėje jos yra apvalesnės (Dubey et al., 2015a).

Mažesnių parazito vystymosi stadijų darinių, tokių kaip bradizoitų ir metrocitų, morfologija skiriasi, priklausomai nuo dalijimosi stadijos. Bradizoitai gali būti išsidėstę itin tankiai arba retai sarkocistos viduje, o tai gali turėti įtakos jų dydžiui ir formai (Fayer, 2004). Daugumos *Sarcocystis* rūšių bradizoitai yra banano formos, tačiau jų išlenkimas labai skiriasi, todėl tiksliai išmatuoti yra sunku. Dėl šių priežasčių, bradizoitai kartu su kitomis sarkocistą sudarančiomis organelėmis, tokiomis kaip mitochondrijos ar mikronemos, nėra naudojama kaip rūšį apibūdinantis kriterijus (Dubey et al., 2015a). Unikali sarkocistos sienelę sudarančios struktūros yra vis dar plačiai naudojamas rūšinio skirstymo kriterijus (Choi et al., 2018). Stebint transmisiniu elektroniniu mikroskopu, sienelė gali atrodyti lygi, plaukuota, ruožuota arba turinti įvairių išaugų. Šiuo metu yra

išskiriama daugiau nei 40 skirtingų sienelės tipų, kurie leidžia stebimas sarkocistas priskirti vienai ar kitai *Sarcocystis* rūšiai. Nepaisant to, tik pagal sienelės struktūrinius komponentus atskirti *Sarcocystis* rūšis gali būti itin sudėtinga. Pavyzdžiui, *S. tenella* sienelės struktūra yra itin panaši į namines ožkas (*Capra hircus*) parazituojančios *S. capracanis* rūšies sienelę (Dubey et al., 2015a).

Oocistų ir sporocistų struktūrinės ypatybės *Sarcocystis* taksonominėje klasifikacijoje yra mažai vertingos arba neturi jokios taksonominės vertės (Lindsay et al., 1995). Daugumos rūšių sporocistos ir oocistos, išskyrus nedidelius dydžių skirtumus, yra labai panašios struktūros. Pavyzdžiui, šuninių šeimos plėšrūnų (Canidae) išskiriamos *Sarcocystis* spp. sporocistos yra maždaug 15×10 μm dydžio, o katinių šeimos plėšrūnų (Felidae) išskiriamos sporocistos – maždaug 12×10 μm (Dubey et al., 2015a).

1.4. Šuninių šeimos plėšrūnų vaidmuo platinant *Sarcocystis* parazitus

Canidae yra viena labiausiai paplitusių plėšriųjų žinduolių šeimų, kuriai priklauso daugiau nei 35 skirtingos vilkų, kojotų, šakalų ir lapių rūšys (Padilla & Hilton, 2015; Szyrwelski et al., 2023). Bent viena šios šeimos rūšis yra aptinkama kiekviename žemyne, išskyrus Antarktidą (Padilla & Hilton, 2015). Lietuvoje dažniausiai pastebimi trys šuninių šeimos atstovai: pilkasis vilkas (*Canis lupus*), rudoji lapė (*Vulpes vulpes*) ir usūrinis šuo (*Nyctereutes procyonoides*) (Balčiauskas et al., 1995; Baltrūnaitė et al., 2013; Jasiulionis et al., 2023). Tuo tarpu paprastasis šakalas (*Canis aureus*) pirmą kartą Lietuvoje aptiktas tik 2015 metais, todėl šios rūšies paplitimas iki šių dienų yra mažas (Stratford, 2015). Pasaulio mastu pilkasis vilkas ir rudoji lapė yra vieni iš dažniausiai sutinkamų laukinių sausumos plėšrūnų pasaulyje (Wang et al., 2016; Reshamwala et al., 2022). Usūrinis šuo yra sparčiai Europoje plintanti invazinė rūšis. Sėkmingas prisitaikymas naujoje aplinkoje leidžia usūriniams šunims dėl maisto išteklių konkuruoti net ir su didžiausiais plėšrūnais (Kauhala & Kowalczyk, 2011; Diao et al., 2022). Itin aiškiai kova dėl mitybos plotų tarp šių Canidae atstovų yra pastebima Šiaurės Europoje, kuriai pagal Jungtinių Tautų Organizacijos skirstymą priklauso ir Lietuva (Selonen et al., 2022). Nors tarprūšinė konkurencija gali mažinti parazitų pernešimo potencialą, šios trys šuninių šeimos rūšys užima skirtingas nišas ir minta skirtingais maisto šaltiniais (Flemming et al., 2017). Mityba yra neatsiejama gyvūnų ir parazitų ekologijos dalis, todėl plėšriųjų žinduolių mitybos raciono duomenys yra itin svarbūs, siekiant suvokti jų vaidmenį ekosistemoje (Soe et al., 2017).

Šiuo metu yra žinoma, jog Canidae atstovai gali būti daugelio skirtingų parazitų pernešėjais, tačiau jų vaidmuo platinant *Sarcocystis* rūšis nėra pakankamai ištirtas (Tylkowska et al., 2019; Basso et al., 2020; Máca, 2020; Siyadatpanah et al., 2020). Rudoji lapė yra prisitaikiusi gyventi tiek kaimo, tiek ir miesto vietovėse, įskaitant ir didžiųjų Europos miestų centrus (Mierzejewska et al., 2021). Didesnį jų populiacijos tankumą miestuose gali lemti antropogeninių maisto šaltinių ar

prieglobsčio prieinamumas (Scott et al., 2014). Europoje rudosios lapės yra prisitaikiusios misti graužikais, augalais, bestuburiais, paukščiais, ropliais ir varliagyviais, tačiau vis dažniau pastebima padidėjusi mityba antropogeniniais maisto produktais ir naminių gyvulių mėsa (Soe et al., 2017; Castañeda et al., 2022). Lietuvoje yra nustatyta, jog tiek šiltuoju, tiek ir šaltuoju periodu, laukinių kanopinių gyvulių, kuriems priklauso ir avys, dvėseną yra vienas iš pagrindinių rudosios lapės maisto šaltinių (Baltrūnaitė et al., 2002). Pilkasis vilkas yra mėšėdis, kuris priklauso nuo laukinių kanopinių gyvūnų pažeidžiamumo ir prieinamumo (Ferretti et al., 2019). Europos valstybėse, kuriose gyvulininkystė yra akcentuojama ne į avis, pagrindinis vilkų grobis yra veršeliai ir galvijai (Trbojević et al., 2020). Tam tikrais atvejais šie plėšrūnai gali išgyventi ir mintant antropogeninės kilmės maistu, taip pat gyvuliais, ar netgi šiukšlėmis (Flemming et al., 2017). Lietuvoje plačiausiai yra auginami galvijai, tačiau dėl savo dydžio ir buvimo didelėse grupėse yra sunkiau sumedžiojami (Januškevičius et al., 2019). Dėl šių priežasčių, mažesnės ir pavieniui arba mažose grupėse gyvenančios avys yra lengvai sumedžiojamas grobis vilkams (Janeiro-Otero et al., 2020). Remiantis anksčiau atliktais tyrimais, Lietuvoje gyvenančių vilkų maisto racione vienas pagrindinių šaltinių yra naminės avys. Tyrimo metu nustatyta, jog 60,1–67,4 % visų metų dokumentuotų užpuolimų sudaro avys (Špinkytė-Bačkaitienė & Adeikis, 2021). Tuo tarpu usūriniai šunys yra gerai žinomi kelių zoonotinių ir patogeninių infekcijų šeiminkai, keliantys potencialų pavojų žmonių ir gyvūnų sveikatai (Kjaer et al., 2021). Palyginus su lapėmis ir vilkais, usūriniai šunys pasižymi plačiausiu maisto racionu, o jų mityba labai skiriasi priklausomai nuo vietovės ir maisto šaltinių prieinamumo (Jasulionis et al., 2023). Šaltuoju metų laiku Lietuvoje šios rūšies maisto racione dominuoja kanopinių ir galvijų skerdenos, o šiltuoju vyrauja varliagyviai, augalai ir graužikai (Baltrūnaitė et al., 2002).

Literatūroje vis dažniau aprašomi netipinių rūšių tam tikram šeiminkui aptikimo atvejai (Kolenda et al., 2015; Hong et al., 2016; Kalantari et al., 2016; Dakhil et al., 2017). Tai leidžia daryti prielaidą, jog turima informacija apie *Sarcocystis* gyvybinius ciklus, tarpinius ir galutinius šeiminkus nėra iki galo atskleista. Žinoma, jog šuninių plėšrūnų pernešamos *Sarcocystis* spp. yra patogeniškesnės lyginant su platinamomis Felidae šeimos atstovų. Dėl šios priežasties svarbu įvertinti nustatomų netipinių rūšių paplitimą ne tik tarpiniuose, bet ir galutiniuose šeiminkuose, jeigu jie yra šuninių šeimos atstovai (Abdullah, 2021).

1.5. *Sarcocystis* parazitų identifikavimo metodai

Ilgą laiką *Sarcocystis* tematikoje trūko žinių tiek apie patį parazitą, tiek apie jo gyvybinį ciklą ar daromą žalą. Tradiciniai *Sarcocystis* nustatymo metodai yra paremti makroskopinių cistų paieška, sarkocistos sienelės morfologija ir genetiniu charakterizavimu po atlikto raumeninio audinio dirbtinio virškinimo (Abdullah, 2021; Pestechian et al., 2021; Nawshirwan et al., 2023).

Šviesinė mikroskopija naudojama sarkocistų aptikimui raumeniniuose gyvūnų audiniuose, o sarkocistų dydis, forma ir sienelės struktūra gali padėti atskirti tam tikras *Sarcocystis* rūšis. Deja, gautuose mėginiuose sarkocistos gali būti nesubrendusios arba aiškiai nesimatyti dydžių skirtumų, todėl norint tiksliau nustatyti *Sarcocystis* rūšį, papildomai yra remiamasi sarkocistos sienelės ultrastruktūros skirtumais (Dubey et al., 2015a). Šiam tikslui įgyvendinti yra naudojama elektroninė mikroskopija, tačiau šis metodas yra brangus, kaip ir šviesinė mikroskopija ilgai trunkantis, todėl rečiau taikomas dideliame mėginių skaičiui (Xiang et al., 2009). Taip pat sienelės struktūros savybės gali būti vienodos ar panašios daugiau nei vienai *Sarcocystis* rūšiai (Dubey et al., 2015b). Dėl šių priežasčių morfologiniai skirtumai šiuo metu yra naudojamas kaip pagalbini kriterijus, papildantis molekulinį rūšių charakterizavimą (Xue et al., 2019).

Kompresinis-mikroskopinis nedažytų raumenų iškarpu metodas yra viena iš naujai pradėtų naudoti technikų *Sarcocystis* tyrimuose, tačiau esant itin mažam užsikrėtimui, sarkocistų aptikimas užima labai daug laiko ir reikalauja patirties bei žinių (Dong et al., 2018). Šio metodo optimizavimas, paveikiant pavyzdžius tam tikru dažu, pavyzdžiui, Giemsa arba metileno mėliu, užtikrina net tris kartus jautresnį parazitų aptikimą (Nourollahi Fard et al., 2009; Ng et al., 2015). Tačiau dažo panaudojimas izoliuotų sarkocistų aptikime kelia problemų dėl dažo poveikio pačioms parazito ląstelėms, taip apsunkinant tolimesnius genetinius tyrimus. Kitas plačiai naudojamas metodas yra dirbtinis audinių virškinimas pepsinu, leidžiantis identifikuoti skirtingų formų ir dydžių bradizoitus šviesiniu mikroskopu (Abdullah, 2021). Tačiau toks virškinimo metodo būdas paprastai taip pat užima daug laiko, todėl didelių imčių atveju yra rečiau naudojamas. Nors greitesnis sarkocistų aptikimas yra užtikrinamas kompresoriniu-mikroskopiniu dažytų raumeninių iškarpu metodu, tačiau jo jautrumas yra mažesnis nei raumeninių audinių virškinimo pepsinu (Latif et al., 1999).

Žymiai tikslesnis taksonomiškai artimų rūšių atskyrimas pastebėtas pradėjus tyrimuose naudoti genetinius žymenis (Xue et al., 2019; Prakas et al., 2020). Pagrindiniai *Sarcocystis* tyrimuose naudojami molekuliniai taikiniai yra *ITS-1* regionas, *cox1*, *18S* rRNR ir *28S* rRNR genų sekos (Hu et al., 2017; Gjerde et al., 2020; Marandykina-Prakienė et al., 2022). *18S* rRNR geno kaip molekulinio žymens „įsitvirtinimas“ *Sarcocystis* tyrimuose yra pagrįstas istorinėmis jo naudojimo tendencijomis, kol kitų rRNR genų naudingumas nebuvo įrodytas (Lee et al., 2021). Pažymėtina, jog daugiausia yra publikuotų tyrimų naudojant *18S* rRNR geną *Sarcocystis* rūšių atskyrimui, tačiau *cox1* geno sekos tiksliausiai atskiria artimas parazito rūšis, kurių šeiminiškai yra kanopiniai žinduoliai (Gjerde, 2013; Prakas et al., 2020). Dideli tarprūšiniai sekų skirtumai yra pastebimi per paukščius ar mėšedžius pernešamų *Sarcocystis* rūšių *ITS-1* regione, todėl ši sritis yra naudingas papildomas žymuo rūšių atskyrimui (Gjerde, 2014). Be šių plačiai naudojamų genetinių

žymenų tyrimuose pradedami naudoti kiti genetiniai žymenys, tokie kaip *cytB*, *rpoB* ir *clpC* genai bei *ITS-1-5.8S rRNR-ITS2* regionas (Watthanakaiwan et al., 2017; Kirillova et al., 2018; Prakas et al., 2019; Pan et al., 2020; Jäkel et al., 2023). Minėtasis *ITS-1-5.8S rRNR-ITS2* regionas ir *28S rRNR* genas tiksliau nurodo nukleotidų pasikeitimus tarp lyginamų sekų, o tai reiškia, jog *Sarcocystis* rūšys gali būti geriau atskiriamos (Lee et al., 2021).

Nepaisant teigiamų molekulinį metodų panaudojimo aspektų, tiksliausi rezultatai yra pasiekiami apjungiant kelias identifikavimo technikas tarpusavyje. Siekiant padidinti minėto raumeninių audinių virškinimo metodo jautrumą, buvo pradėta jį kombinuoti su molekuline analize (Mavi et al., 2020). Šiuo metu plačiai *Sarcocystis* tyrimuose yra kartu naudojami dirbtinio virškinimo ir tiesioginės arba lizdinės PGR metodai (Farhang-Pajuh et al., 2014; Dong et al., 2018; Marandykina-Prakienė et al., 2022; Zhu et al., 2022).

1.6. Avyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių įvairovė

Naminės avys (*Ovis aries*) gali būti mažiausiai šešių *Sarcocystis* rūšių tarpiniais šeimininkais (Marandykina-Prakienė et al., 2022) (1.1 lentelė).

1.1 lentelė. Naminėse avyse aprašytų *Sarcocystis* rūšių morfologinės savybės (parengta pagal Fayer, 2004; Dubey et al., 2015a; Fayer et al., 2015)

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Sarkocistų dydis	Bradizoitų struktūra	Sarkocistos sienelė	Sporicistų/ooocistų dydis
<i>S. arieticanis</i>	Mikroskopinės	Banano formos 4,6–6,4×1,9–2,3 μm	Plona (<1,0 μm), turinti 5,0–9,0 μm ilgio išaugas primenančios plaukelius	15–16,5×9,8–10,5 μm
<i>S. gigantea</i>	Makroskopinės	Banano formos 12,3×2,6 μm	Plona (<2,0 μm), turinti kalafiorą primenančias išaugas	10,5–14,0×8,0–9,7 μm
<i>S. microps</i>	Mikroskopinės	8,5×3,0 μm	Plona (<2,0 μm), turinti 0,6–0,7 μm ilgio T-formos išaugas	14,0×9,1 μm
<i>S. mihoensis</i>	Makroskopinės	–	Stora 10,0–12,0 μm, turinti išaugas primenančias iš statinių sudarytą tvorelę	15,0–16,0×8,0–9,0 μm
<i>S. medusiformis</i>	Makroskopinės	–	Plona (<2,0 μm), turinti trapecijos formos išaugas	10,3–13,0×7,3–8,8 μm

1.1 lentelės tęsinys. Naminėse avyse aprašytų *Sarcocystis* rūšių morfologinės savybės (parengta pagal Fayer, 2004; Dubey et al., 2015a; Fayer et al., 2015)

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Sarkocistų dydis	Bradizoitų struktūra	Sarkocistos sienelė	Sporicistų/ooocistų dydis
<i>S. tenella</i>	Mikroskopinės	Banano formos 6,6–7,8×1,1–2,2 μm	Plona (<2,0 μm), turinti iki 3,5 μm ilgio ir iki 0,5 μm pločio išaugas, panašias į „pirštus“	14,0–15,0×9–10,5 μm

Patogeniškiausios *S. tenella* ir *S. arieticanis* rūšys formuoja mikroskopines sarkocistas organizme, platinamas per šuninių šeimos plėšrūnus (Elmishmishy et al., 2018). Lyginant tarpusavyje, *S. arieticanis* rūšies sarkocistos (iki 900 μm) yra šiek tiek didesnės už *S. tenella* (iki 700 μm). Abiejų rūšių sarkocistos sienelė yra plona, tačiau *S. tenella* pasižymi į „pirštus“ panašiomis išaugomis, o *S. arieticanis* yra šeriota. Tuo tarpu katinių šeimos plėšrūnai perneša makroskopines plonasienes sarkocistas formuojančias *S. gigantea* ir *S. medusifformis* (Metwally et al., 2019). Į „ryžių grūdus“ panašios *S. gigantea* sarkocistos sugeba užaugti iki 1 cm, o *S. medusifformis* – iki 0,8 cm ilgio. Struktūriškai *S. gigantea* rūšies sienelės išaugos primena kalafiorą, o *S. medusifformis* išaugos primena trapecijos formą. Šios keturios dažniausiai literatūroje minimos rūšys skiriasi ir savo brendimo laikotarpiu. Pavyzdžiui, *S. tenella* ir *S. arieticanis* tampa infektyvios per 3 mėnesius, o *S. gigantea* rūšies sarkocistos gali nesubręsti metus ar ilgiau (Dubey et al., 2015a). Likusios rūšys yra labai mažai dokumentuotos literatūroje (1.2 lentelė). Kinijoje aptikta *S. microps* formuoja mikroskopines sarkocistas platinamas Canidae (Hu et al., 2017), o Japonijoje (Saito et al., 1997) bei Ispanijoje (Gjerde et al., 2020) identifikuota per dvėseną mintančių paukščių ekskrementus pernešama makroskopines sarkocistas formuojanti *S. mihoensis*.

1.2 lentelė. Naminėse avyse aprašytų *Sarcocystis* rūšių šeimininkai ir paplitimas pasaulyje (parengta pagal Fayer, 2004; Dubey et al., 2015a; Fayer et al., 2015)

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Galutinis šeimininkas	Aptikimo arealas
<i>S. arieticanis</i> (1985)	Naminis šuo (<i>Canis familiaris</i>)	Afrika (Alžyras, Egiptas), Azija (Irakas, Kinija), Europa (Italija, Ispanija, Jungtinė Karalystė, Lietuva, Turkija, Vokietija), Pietų Amerika (Brazilija)
<i>S. gigantea</i> (1866)	Naminė katė (<i>Felis catus</i>)	Afrika (Egiptas), Azija (Irakas, Iranas), Europa (Anglija, Italija, Ispanija, Norvegija), Pietų Amerika (Argentina, Brazilija)

1.2 lentelės tęsinys. Naminėse avyse aprašytų *Sarcocystis* rūšių šeimininkai ir paplitimas pasaulyje (parengta pagal Fayer, 2004; Dubey et al., 2015a; Fayer et al., 2015)

<i>S. microps</i> (1988)	Tikriausiai šuninių šeimos atstovai (nepatvirtinta)	Azija (Kinija)
<i>S. mihoensis</i> (1997)	Tikriausiai šuninių šeimos atstovai (nepatvirtinta)	Azija (Japonija)
<i>S. medusifformis</i> (1979)	Naminė katė (<i>Felis catus</i>)	Azija (Iranas), Europa (Ispanija), Naujoji Zelandija
<i>S. tenella</i> (1886)	Naminis šuo, kojotas (<i>Canis latrans</i>), rudoji lapė (<i>Vulpes vulpes</i>)	Afrika (Alžyras, Egiptas, Saudo Arabija, Tunisas), Azija (Indija, Irakas, Iranas, Japonija, Kinija, Malaizija, Saudo Arabija), Europa (Italija, Lietuva, Norvegija, Turkija), Pietų Amerika (Brazilija)

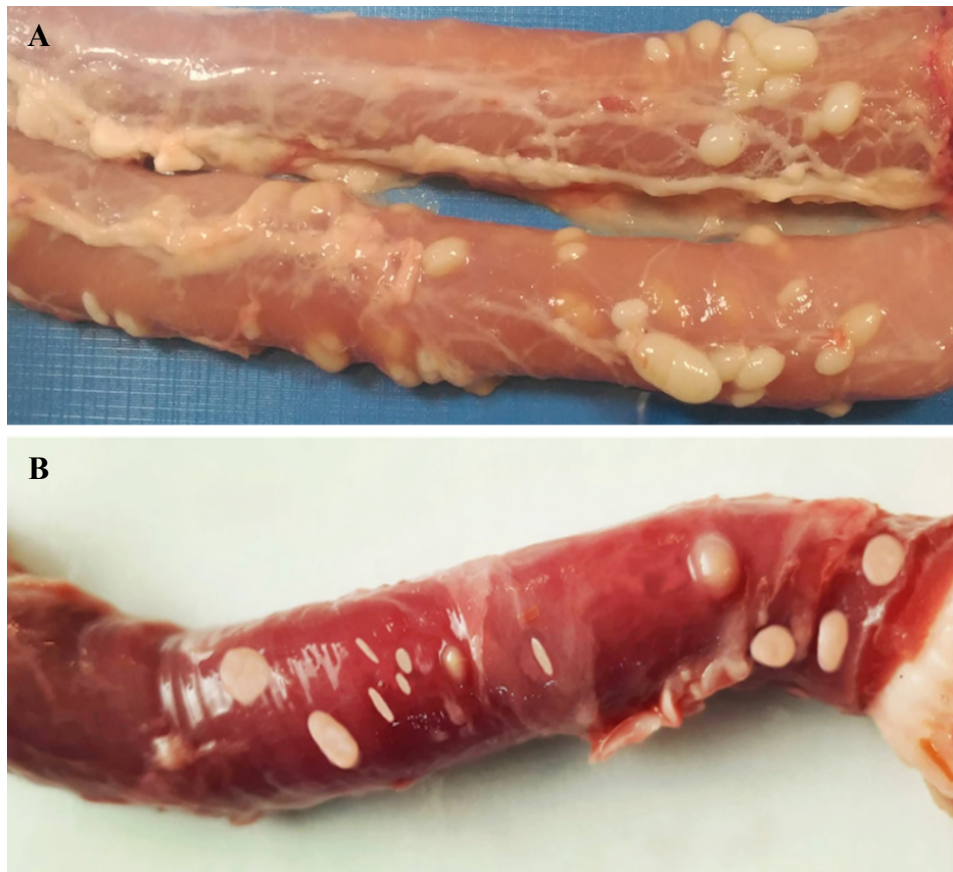
Seniausias žinomas *Sarcocystis* parazitų tyrimas Lietuvoje auginamuose naminiuose gyvuliuose pradėtas dar 1976 metais (Prakas & Butkauskas, 2012). Šio tyrimo metu sarkocistozės mastas buvo fiksuotas tik galvijuose ir kiaulėse, o pirmojo dokumentuoto tyrimo avyse reikėjo palaukti dar beveik 50 metų. 2012–2014 metais skerdyklose surinktų avių ($n = 61$) mėšos pavyzdžiuose nustatytas 100 % *Sarcocystis* parazitų užsikrėtimas. Dalyje tirtų avių (44,9 %) užfiksuota sunki infekcija, t.y. nustatyta daugiau nei 40 cistų viename grame mėginių (Januškevičius et al., 2019). Šiame tyrime sarkocistos nebuvo morfologiškai identifikuotos, todėl *Sarcocystis* rūšių įvairovė pirmą kartą nustatyta tik dar po trijų metų. Naujausi tyrimai rodo, jog Lietuvoje auginamas avis parazituoja tik dvi *Sarcocystis* genties rūšys: *S. arieticanis* ir *S. tenella* (Marandykina-Prakienė et al., 2022)

1.7. *Sarcocystis* parazitų patogeniškumas ir prevencija

Sarkocistozė arba sarkosporidiozė yra viena labiausiai paplitusių protistų ligų gyvuliuose, kurią sukelia *Sarcocystis* parazitai (Fayer, 2004). Šis parazitinis susirgimas yra nustatomas visame pasaulyje, todėl turi didelę įtaką ekonomikos ir gyvulininkystės sektoriams. Galutiniame šeimininke sarkocistozė dažnu atveju nepasireiškia ūmiais klinikiniais požymiais. Nepaisant to, kai kurios *Sarcocystis* rūšys yra zoonotinės ir gali sutrikdyti žmonių sveikatą (Rosenthal, 2021). Šiuo metu yra žinoma, jog žmonės gali būti trijų *Sarcocystis* rūšių galutiniu šeimininku: per galvijus pernešamoms *S. heydorni* (Dubey et al., 2015b) ir *S. hominis* bei per kiaules ir šernus plintančiai *S. suihominis* (Dubey et al., 2015a). Žmogus taip pat gali būti ir atsitiktiniu tarpiniu *S. nesbitti* rūšies šeimininku, į organizmą patekus šios rūšies sporocistoms (Lau et al., 2014).

Sarcocystis rūšių pavojingumas šeimininkams priklauso nuo skirtingų veiksnių, tokių kaip į organizmą patekusių ir suvirškintų sporocistų skaičiaus, gebėjimo greitai daugintis, šizogonijos vietos bei galimybės pasiekti centrinę nervų sistemą (Castro-Forero *et al.*, 2022). Infekcijos intensyvumą skatina ir tokie veiksniai kaip nėštumas, mitybos racionas, laktacija ir stresas (Fayer *et al.*, 2015). Nustatyta, jog nelytinis *Sarcocystis* parazitų dauginimosi procesas yra įvairių organų audinių irimo ar endotelio pažeidimų pradinė priežastis (Wünschmann *et al.*, 2009; Castro Forero *et al.*, 2022).

Priklausomai nuo *Sarcocystis* parazitų lokalizacijos organizme, išskiriami du šios ligos tipai: žarnyno ir raumenų sarkocistozė (Dubey *et al.*, 2015a). Raumenų sarkocistozės atveju pastebimas ūmus karščiavimas, skeleto raumenų uždegimas ir skausmas, vaskulitas, bronchinė astma ar įvairūs bėrimai (Esposito *et al.*, 2012; AbuBakar *et al.*, 2013). Šis ligos tipas taip pat gali būti siejamas su nespecifinėmis reumatinėmis ligomis, tokiomis kaip skeleto raumenų uždegimas (Abdul-Rahman *et al.*, 2002). Nors literatūroje yra aprašoma atvejų, kai žmogus gali būti tarpiniu *Sarcocystis* parazitų šeimininku, trūksta tyrimų, kurie leistų geriau suprasti tokio tipo sarkocistozės simptomus (Fayer, 2004). Be sukiamų sunkių sveikatos sutrikimų, raumenų sarkocistozė daro neigiamą poveikį gyvulininkystės sektoriui. Žemės ūkyje *Sarcocystis* parazitų sukeliama liga gali sumažinti avių ir galvijų pieno produkciją, ožkų bei avių vilna neretai tampa prastos kokybės, o pati skerdiena gali būti pripažinta kaip netinkama vartojimui (1.2 pav.) (Poulsen & Stensvold, 2014). Tuo tarpu žarnyno sarkocistozė dažnu atveju yra besimptomė ir savaime praeina, tačiau gali būti pastebimi pilvo skausmai, vėmimas ir rečiau pasireiškiantys lėtiniai virškinamojo trakto sutrikimai (Fayer *et al.*, 2015; Harris *et al.*, 2015).



1.2 pav. *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių naminėse avyse ir ožkose, formuojamos sarkocistos: A) *Sarcocystis gigantea* rūšies makroskopinės sarkocistos avies stemplės pavyzdyje (Gjerde et al., 2020); B) *Sarcocystis moulei* rūšies makroskopinės sarkocistos ožkos stemplės pavyzdyje (El-Morsei & Abdo, 2024)

Dideliu patogeniškumu tarpiniams šeimininkams pasižymi dalis *Sarcocystis* rūšių, kurios net ir lengvos infekcijos atveju gali sukelti mirtį (Castro-Forero et al., 2022). Labiausiai patogeniškos yra atrajotojus infekuojančios *Sarcocystis* rūšys, ypač avis parazituojanči *S. tenella*. Šios rūšies susirgimai yra fiksuojami kaip labiausiai paplitę ir pavojingiausi šeimininkams (Dubey et al., 2015a). Pirminis avių užsikrėtimas *S. tenella* ar kita avims patogeniška *S. arieticanis* rūšimi gali sukelti ūmią ligą ar abortą ankstyvojoje infekcijos fazėje bei lėtinę ligą jau vėlyvojoje fazėje (Pestechian et al., 2021). *Sarcocystis gigantea* yra mažiau patogeniška avims, nes išskyrus karščiavimą, jokių kitų klinikinių požymių nėra nustatyta. Likusios trys *Sarcocystis* rūšys – *S. medusiformis*, *S. microps* ir *S. mihoensis* – šiuo metu literatūroje yra aprašomos kaip nepavojingos avims, tačiau jų patogeniškumui įvertinti vis dar yra reikalingi išsamesni tyrimai (Dubey et al., 2015a). Prisitaikymas išgyventi aplinkoje nepalankiomis sąlygomis taip pat prisideda prie *Sarcocystis* parazitų patogeniškumo. Pavyzdžiui, dviejų avyse parazituojančių *S. gigantea* ir *S. medusiformis* rūšių formuojamos sporocistos gali būti gyvybingos net ir praėjus 6–8 mėnesiams po patekimo į aplinką, taip pat yra atsparios šaldymui, o žūsta tik dėl išdžiūvimo ar sumažėjus dirvožemio pH (McKenna & Charleston, 1992; Savini et al., 1996; Taggart et al., 2019).

Šiuo metu nėra vienos veiksmingos žarnyno ar raumenų sarkocistozės gydymo strategijos. Nors ir buvo pastebėta, jog pirminę parazito infekciją išgyvenę gyvūnai paprastai įgyja imunitetą nuo ūmaus pakartotinio tos pačios *Sarcocystis* rūšies užsikrėtimo, daugumoje atvejų toks prevencinis požiūris nėra veiksmingas (Tenter, 1995). Šiuolaikinės kontrolės strategijos yra paremtos parazito plitimo slopinimu. Pavyzdžiui, mažinamos galimybės įvairiaėdžiams ar plėšrūnams praryti netinkamai termiškai apdorotą ar visiškai žalią mėsą, kontroliuojamas vandens bei pievų užterštumas. Taip pat, dėl išliekančios užkrato galimybės, gyvulių pašaro laikymo pastatuose negalima įleisti kačių ir šunų (Fayer, 2004).

Literatūroje yra pateikiama klinikinių vaistų panaudojimo nuo sarkocistozės tyrimų, tačiau jų veiksmingumas nėra tinkamai ar iki galo ištirtas. Raumenų sarkocistozės atveju, *in vitro* buvo nustatyta, jog trimetoprimas ir pirimetaminas pasižymi aktyvumu prieš *Sarcocystis* patogenus, tačiau platesnių klinikinių tyrimų iki šiol atlikta nėra (Lindsay & Dubey, 1999). Taip pat pastebėta, jog gydymas vien albendazolu arba kartu su prednizonu tam tikrais atvejais gali pagerinti paciento būklę, tačiau vėlgi trūksta informacijos apie gydymo protokolus bei klinikinį atsaką (Arness et al., 1999). Žarnyno sarkocistozės atveju taip pat nėra atrasta jokių veiksmingų profilaktikos metodų, nors dabartinės rekomendacijos yra susijusios su ditiazanino, pirimetamino su silfizoksazolu derinio, sulfametoksazolo su trimetoprimo derinio ir acetilspiramicino panaudojimu (Nimri, 2014; Fayer et al., 2015). Nors literatūroje ir yra pateikiama atliktų tyrimų duomenys, šiuo metu nė vieno iš gydymo būdų negalima rekomenduoti kaip pranašesnio ar tinkamesnio už kitus (Fayer, 2004).

1.8. Tipinių ir netipinių *Sarcocystis* rūšių avyse tyrimai pasaulyje

Sarcocystis parazitų tyrimai avyse pasauliniu mastu suintensyvėjo tik XX amžiaus pabaigoje. Eksperimentiniai avių užkrėtimai katininių ir šuninių šeimos atstovų sporocistomis parodė, jog *Sarcocystis* spp. gali plisti šuns-avies ciklu, formuojant mikroskopines sarkocistas, bei katės-avies gyvybiniu ciklu, susiformuojant makroskopinėms sarkocistoms (Munday et al., 1975; Munday & Obendorf, 1984). Nors visos dabar žinomos avis parazituojančios *Sarcocystis* rūšys buvo aptiktos ir aprašytos dar iki XXI amžiaus pradžios, pastaruoju metu daugėja pranešimų apie šiems šeiminiškams netipines rūšis (Dubey et al., 2015a). Pavyzdžiui, ožkas parazituojančios *S. capracanis* ir *S. moulei* rūšys aptiktos Jungtinėje Karalystėje, Irane ir Irake vykdytų tyrimų metu avyse (Formisano et al., 2013; Kalantari et al., 2016; Rahdar & Kardooni, 2017; Swar & Shnawa, 2021; Shahabi et al., 2022). Diskusinius klausimus apie avyse aptinkamų *Sarcocystis* spp. rūšinę įvairovę bei specifiškumą avims kelia *S. gigantea* ir *S. tenella* aptikimas kituose tarpiniuose šeiminiškuose, tokiuose kaip arkliai ir ožkos (Hong et al., 2016; Vorenesi et al., 2020).

Netipinių avims *Sarcocystis* rūšių aptikimą apsunkina itin dažnas tipinių rūšių aptikimas. Remiantis atliktais tyrimais, *Sarcocystis* spp. užsikrėtimo ekstensyvumas tarp Lietuvoje auginamų

avių siekia 100 % (Januškevičius et al., 2019; Marandykina-Prakienė et al., 2022). Tyrimų metu nustatyta, jog Lietuvoje parazituoja *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšys avių diafragmose, stemplėse ir širdyse (Marandykina-Prakienė et al., 2022). Aukštos sarkocistozės paplitimo vertės (65,1–100 %) dokumentuojamos visame Europos žemyne (Gokpinar et al., 2014; Dessì et al., 2022). Lyginant Europos mastu publikuotus duomenis, dažniausiai nustatomos išlieka tos pačios *Sarcocystis* spp., kurios nustatytos ir Lietuvoje (Hazirolu et al., 2003; Bacci et al., 2016; Pipia et al., 2016; Peris et al., 2024). Be šių parazito rūšių Italijoje, Norvegijoje ir Ispanijoje nustatyta mažiau patogeniška *S. gigantea* rūšis (Gjerde, 2013; Gjerde et al., 2020), o išskirtai tik Ispanijoje – avims nepavojinga *S. medusifformis* ir į *S. mihoensis* panaši rūšis (Gjerde et al., 2020).

Intensyviausi avių sarkocistozės tyrimai atliekami Azijos žemyne, kuriame iki šiol aptiktos keturios plačiausiai aprašytos *Sarcocystis* rūšys avyse – *S. arieticanis*, *S. gigantea*, *S. medusifformis* ir *S. gigantea* (Hu et al., 2017; Sudan et al., 2019; Abdullah, 2021; Hussein et al., 2023). Makroskopines sarkocistas formuojančių rūšių nustatymo dažnis (4,1–36,8 %) (Farhang-Pajuh et al., 2014; Hussein et al., 2023; Newshirwan et al., 2023) Azijoje yra žymiai mažesnis lyginant su mikroskopinių sarkocistų aptikimo dažniu (52,1–100 %) (Bahari et al., 2014; Dong et al., 2018; Abdullah, 2021). Panašios tendencijos pastebimos ir Afrikos žemyno šalyse, tokiose kaip Alžyras, Egiptas, Etiopija ir Tunisas. *Sarcocystis arieticanis* ir *S. tenella* rūšys aptinkamos žymiai dažniau (86,8–93,0 %), lyginant su *S. gigantea* bei *S. medusifformis* rūšimis (0,74–13,2 %) (Amairia et al., 2017; Mekibib et al., 2019; Dahmani et al., 2020; El-Morsei et al., 2021). Skirtingai nei Azijoje ar Afrikoje, Šiaurės Amerikoje sarkocistozės paplitimas dokumentuojamas kaip itin aukštas (95,8–100 %) (Bittencourt et al., 2016; Minuzzi et al., 2019; Portella et al., 2021). Žinoma, jog Brazilijoje ir Argentinoje parazituoja *S. arieticanis*, *S. gigantea* ir *S. tenella* rūšys (Bittencourt et al., 2016; Gual et al., 2017; Silva et al., 2021). Išskirtinai tik Australijoje auginamose avyse parazitujančių *Sarcocystis* rūšių įvairovė iki šiol lieka nenustatyta, nors šių parazitų ekstensyvumas siekia tik 14,3 % (Phythian et al., 2018).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Darbo metu analizuoti 47 avių individų pavyzdžiai (iš viso 141 mėginys), kurie buvo auginti rytinėje Lietuvos dalyje. Avių raumeninių audinių medžiaga (diafragma, stemplė ir širdis) *Sarcocystis* parazitų identifikavimui buvo surinkta GTC Molekulinės ekologijos laboratorijos dr. E. Juozaitytės-Ngugu iš licenzijuotos skerdyklos „Alantos agroservisas, UAB“. Gauti raumeniniai pavyzdžiai buvo laikomi GTC Molekulinės ekologijos laboratorijoje –20 °C temperatūroje.

2.2. Medžiagos

Darbo metu naudoti komerciniai rinkiniai ir cheminės medžiagos nurodytos 2.1 lentelėje, o naudoti prietaisai – 2.2 lentelėje. Tyrimo metu naudoti pradmenys pateikiami 2.3 lentelėje.

2.1 lentelė. Darbe naudotos medžiagos ir komerciniai rinkiniai

Pavadinimas	Paskirtis	Gamintojas
Pepsinas „Pepsin from Porcine Stomach“	Dirbtinis virškinimas pepsinu	„Affymetrix/USB™“, JAV
70 % Druskos rūgštis (HCl)		„Fisher scientific“, JAV
NaCl		UAB „Labochema LT“, Lietuva
„PureLink Microbiome DNA Purification Kit“	gDNR skyrimo rinkinys iš homogenizuotų mėginių	UAB "Thermo Fisher Scientific Baltics", Lietuva
PGR mišinys „DreamTaq Green PCR Master Mix“	Tiesioginė ir lizdinė PGR	
PGR pradmenys		„Metabion International AG“, Vokietija
96 % etanolis	Iš raumeninių audinių izoliuotų sarkocistų laikymas	„Vilniaus degtinė“, Lietuva
Tris (tris(hidroksimetil) aminometano) milteliai	gDNR skyrimas iš izoliuotų sarkocistų	„Carl Roth“, Vokietija
Proteinazė K		UAB "Thermo Fisher Scientific Baltics", Lietuva
Fosfato buferinis tirpalas, pH 7,00 (PBS)		
Molekulinės masės žymuo „GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder“	Elektroforezė	UAB "Thermo Fisher Scientific Baltics", Lietuva
Agarozės milteliai		
Etidžio bromidas		
1× TAE (Tris-acetato-EDTA) buferis		
Egzonukleazė I (20 U/μl)	PGR metu gautų produktų valymas	
FastAP šarminė fosfatazė (1 U/μl)		

2.2 lentelė. Darbe naudotos priemonės ir įranga

Prietaisas	Gamintojas
Agarozės gelių dokumentavimo sistema „BioDocAnalyse“	„Biometra“, Vokietija
Autoklavas „STE-23-D“	„Icanclave“, Kinija
Centrifuga	„Nippon genetics“, Vokietija
Elektroforezės aparatas „MultiSUB Mini“	„Clever Scientific“, Anglija
Elektroforezės aparato maitinimo šaltinis „MP-300V“	UAB „VILdoma“, Lietuva
Inkubatorius „Esco IFA-54-8“	„Esco“, Singapūras
pH metras „pH211“	„Hanna instruments“, JAV
Purtyklė „RS-VA10“	„Phoenix Instrument“, Vokietija
Purtyklė-inkubatorius ES-20/60	„Biosan“, Latvija
Šviesinis mikroskopas „Nicon ECLIPSE 80i“	„Nikon“, Japonija
Termocikleris „Mastercycler Personal“	„Eppendorf“, Vokietija
Termocikleris „TC1000-G“	„DLAB Scientific“, Kinija
Termocikleris „T-Personal 48“	„Biometra“, Vokietija
Termocikleris „Veriti 96-Well Thermal Cycler“	„Applied Biosystems“, JAV

2.3 lentelė. Darbe naudoti pradmenys

Pradmuo	Seka (5'-3')	Paskirtis	Šaltinis
SF1	ATGGCGTACAACAATCATAAAGAA	<i>Sarcocystis</i> genties <i>cox1</i> geno amplifikavimui	Gjerde, 2013
SsunR3	CCGTTGGWATGGCRATCAT		Marandykina-Prakienė <i>et al.</i> , 2022
V2alc1	CAGCGTACTCGGATCGATAAAC	<i>S. alces</i> <i>cox1</i> geno amplifikavimas	Laboratorijos kolekcija
V2alc2	GCCAAAAACTGGCTTACTGGATAC		
Arieticanis7F	TAATTTCTCGGTACTGTACTGTTTG	<i>S. arieticanis</i> <i>cox1</i> geno amplifikavimas	
Arieticanis7R	TACTTACGCATTGCGATATTACG		
V2ca3	ATACCGATCTTTACGGGAGCAGTA	<i>S. capracanis</i> <i>cox1</i> geno amplifikavimas	
V2ca4	GGTCACCGCAGAGAAGTACGAT		
V2capreo1	CATCGTAGAGCCCCGTACTC	<i>S. capreolicanis</i> <i>cox1</i> geno amplifikavimui	
V2capreo2	ACCGCTATACGCTGGAGCTG		

2.3 lentelės tęsinys. Darbe naudoti pradmenys

Pradmuo	Seka (5'-3')	Paskirtis	Šaltinis
V2cr7	CAATGTGCTGTTTACGCTCCA	<i>S. cruzi cox1</i> geno amplifikavimui	Laboratorijos kolekcija
V2cr8	TCGTACAGGCCCGTAGTTAG		
V2gr9	GTGCTCGGGGCAGTGAAC	<i>S. gracilis cox1</i> geno amplifikavimui	
V2gr10	GCCAGTAGTCATCATGTGGTGT		
V2hjo1	AAGGTACACGGCATTGTTAC	<i>S. hjorti cox1</i> geno amplifikavimas	
V2hjo2	GAAAACCTACCCTGCCGCCTA		
V2taelin1	CGTAGACTGCATGACGACTTACAA	<i>S. linearis / S. taeniata cox1</i> geno amplifikavimui	
V2taelin2	CAAAGATGGATTTGCTGCCTA		
V2mor1	GTGTGCTTGGATCGGTCAAC	<i>S. morae cox1</i> geno amplifikavimui	
V2mor2	GCCGAATACCGGCTTACTTC		
Tenella8F	AACCATCGTACAATCCAAAATAAA	<i>S. tenella cox1</i> geno amplifikavimui	
Tenella8R	ATACCGCTCTACGCTGGATCTAC		

2.3. Metodai

2.3.1. *Sarcocystis* rūšių nustatymas avių raumeniniuose audiniuose

2.3.1.1 Dirbtinis skirtingų audinių virškinimas pepsinu

Sarcocystis rūšių identifikavimui molekuliniiais metodais, surinkta avių medžiaga paruošta vykdant modifikuotą dirbtinio virškinimo protokolą, kuris skirtas išskirti *Toxoplasma gondii* iš gyvūnų audinių (Dubey, 1998). Atpjaunama 30±5 g tiriamojo raumeninio audinio, nuo jo pašalinamas riebalinis audinys. Gautas mažesnis raumeninis audinys susmulkinamas į 1–2 cm dydžio gabaliukus, kurie perkeliama į komercinį plaktuvą. Užpilama 150 ml fiziologinio tirpalo ir gabaliukai homogenizuojami maišant nedideliais intervalais. Gautas mišinys perpilamas į Erlenmejerio kolbą ir papildomas 150 ml rūgštinio pepsino tirpalu (0,78 g pepsino; 1,5 g NaCl; 150 ml distiliuoto vandens; pH 1,1–1,2). Homogenatas švelniai pamaišomas ir vėliau 2 val., 37 °C, 170 aps./min. greičiu inkubuojamas purtyklėje–inkubatorijoje ES-20/60. Naudojant dviejų sluoksnių medicininę marlę mišinys filtruojamas, perkeliama dalį mišinio į 50 ml centrifuginį mėgintuvėlį. Vėliau mišinys centrifuguojamas 10 min., 1200 × g. Supernatantas nupilamas, paliekant tik susidariusias nuosėdas. Susiformavusios nuosėdos dar kartą užpilamos po inkubavimo susidariusiu

skysčiu, centrifuguojama 10 min., 1200 × g, nupilamas supernatantas ir procedūra kartojama, kol nelieta pradinio skysčio. Po galutinio centrifugavimo, supernatantas nupilamas, nuosėdos užpilamos 45 ml fiziologinio tirpalo, centrifuguojama 10 min., 1200 × g, supernatantas nupilamas. Gautas homogenatas laikomas 4 °C šaldytuve iki DNR skyrimo.

2.3.1.2 gDNR skyrimas iš homogenizuotų mėginių

gDNR skyrimui naudotos nuosėdos, gautos po dirbtinio raumeninių audinių virškinimo (2.3.1.1 skyrius). DNR skyrimui naudojamas komercinis rinkinys „Thermo Scientific PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit“. 200 µl nuosėdų pridedama į mėgintuvėlį su rutuliukais, užpilama 600 µl S1 lizės buferio ir 100 µl S2 lizės enhancerio. Sumaišoma ir inkubuojama 10 min. 65 °C. Mėgintuvėlis perkeliamas į maišyklį, homogenizuojama 10 ml maišantis rutuliukams. Centrifuguojama 5 min. 14000 × g. Iki 400 µl supernatanto perkeliama į naują mėgintuvėlį. Pridedama 250 µl S3 praplovimo buferio, sumaišoma ir 10 min. inkubuojama ant ledo. Centrifuguojama 1 min. 14000 × g. Iki 500 µl supernatanto perkeliama į naują mėgintuvėlį. Pridedama 900 µl S4 surišimo buferio ir sumaišoma. 700 µl mišinio perkeliama į mėgintuvėlį su kolonėle ir centrifuguojama 1 min. 14000 × g. Pratekėjęs skystis pašalinamas, ant kolonėlės užpilamas likęs skystis ir vėl centrifuguojama. Kolonėlė perkeliama į švarų surinkimo mėgintuvėlį, pridedama 500 µl S5 praplovimo buferio ir centrifuguojama 1 min. 14000 × g. Pratekėjęs skystis pašalinamas, vėl centrifuguojama 30 sek. 14000 × g. Kolonėlė perkeliama į švarų mėgintuvėlį, pridedama 100 µl S6 eliacijos buferio ir inkubuojama 1 min. kambario temperatūroje. Centrifuguojama 1 min. 14000 × g, kolonėlė pašalinama, o surinktas skystis laikomas –20 °C temperatūroje šaldiklyje iki molekulinės analizės.

2.3.1.3 Tiesioginis PGR ir lizdinė PGR

Sarcocystis rūšys identifikuotos pagausinant DNR fragmentus tiesioginės PGR ir lizdinės PGR metu. Tiesioginė PGR vykdoma 25 µl mišinyje, kuris yra sudarytas iš komponentų: 12,5 µl „Thermo Scientific DreamTaq DNA Green Master Mix“ (2X), po 0,5 µl (0,5 µM) tiesioginio ir atvirkštinio pradmens, 4 µl gDNR (2.3.1.2 skyrius), o likęs tūris užpildomas vandeniu be nukleazių. Teigiamoms kontrolėms naudojama ankstesnių laboratorijoje atliktų tyrimų metu iš sarkocistų išskirta *Sarcocystis* gDNR, taip užtikrinant šiame darbe tirtoms *Sarcocystis* rūšims sukurtų pradmenų specifiškumą (Prakas et al., 2019; Rudaitytė-Lukošienė et al., 2020; Rudaitytė-Lukošienė et al., 2021; Marandykina-Prakienė et al., 2022). Tiesioginė PGR ir lizdinė PGR atliekamos termocikleriuose, nurodytuose 2.2 lentelėje. Tiesioginės PGR ir lizdinės PGR sąlygos pateiktos 2.4 lentelėje.

2.4 lentelė. Tiesioginės PGR, pirmosios bei antrosios lizdinės PGR sąlygos *Sarcocystis* rūšių identifikavimui

Procesas	Temperatūra, °C	Trukmė	
Pradinė denatūracija	95	5 min.	
DNR denatūracija	95	35 sek.	35 ciklai
Pradmenų hibridizacija	53–65	45 sek.	
DNR sintezė	72	55 sek.	
Galutinė sintezė	72	5 min.	

Maža parazito DNR koncentracija mėginiuose neleidžia tinkamai identifikuoti *Sarcocystis* rūšių, todėl papildomai naudota lizdinė PGR. Pirmosios reakcijos metu du išoriniai pradmenys, pagausina didesnę fragmentą nuo gDNR. Šis didesnis fragmentas kaip matrica vėliau naudojamas antroje lizdinės PGR reakcijoje, kurios metu du vidiniai pradmenys pagausina mažesnę tikslią fragmentą (Strazdaitė-Žielienė et al., 2022). Pirmosios lizdinės PGR metu 25 µl reakcijos mišinys, sudarytas iš 12,5 µl „Thermo Scientific DreamTaq DNA Green Master Mix“ (2X), 0,5 µl (0,5 µM) SF1 pradmens ir 0,5 µl (0,5 µM) SsunR3 pradmens (2.3 lentelė), 4 µl gDNR, o likęs tūris užpildomas vandeniu be nukleazių. Antrosios lizdinės PGR metu galutinis mišinys (25 µl) yra sudarytas iš 12,5 µl „Thermo Scientific DreamTaq DNA Green Master Mix“ (2X), 0,5 µl (0,5 µM) *Sarcocystis* rūšiai specifinių tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų poros (2.3 lentelė), 2 µl pirmosios lizdinės PGR metu pagausinto fragmento, ir 9,5 µl vandens be nukleazių. PGR metu gauti ampliconai saugomi –20 °C temperatūroje iki tolimesnės analizės.

2.3.1.4 Elektroforezė agarozės gelyje

Pagausintų fragmentų vizualizavimui yra naudojamas 1 % agarozės gelis (0,3 g agarozės miltelių; 30 ml 1X TAE buferio). Atvėsinus pakaitintą agarozės gelio mišinį, jis papildomas 1 µg/ml etidžio bromidu ir sustingdomas specialioje formoje. Gautas gelis įstatomas į elektroforezės aparatą „MultiSUB Mini“, ant viršaus užpilama 1X TAE buferio. Į suformuotus šulinėlius įleidžiama po 5 µl PGR metu gauto mėginio. Vėliau, į vieną šulinėlį įleidžiama 2 µl DNR molekulinės masės žymens „GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder“. Paleidžiama 90 V (6 V/cm) elektros srovė, elektroforezė vykdoma 25–30 min. produktams išsifracionavus, gelis išimamas iš elektroforezės aparato ir vizualizuojamas bei fotografuojamas „BioDocAnalyze“ sistemos prietaisu.

2.3.1.5 PGR fragmentų gryninimas

Analizuojami teigiami mėginiai paruošiami sekoskaitai, juos išvalant nuo neįterptų pradmenų ir suardant neįterptus nukleotidus. 5 µl PGR reakcijos produkto perkeliama į naują mėgintuvėlį. Pridedama 0,5 µl egzonukleazės I (10 U/µl) ir 1 µl FastAP temperatūrai jautrios šarminės fosfatazės (1 U/µl). Gerai sumaišoma ir inkubuojama 15 min. 37 °C. Reakcija stabdoma mišinį pakaitinus 15 min. 85 °C. Išvalytų mėginių sekoskaita atliekama Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijos biologės Evelinos Maziliauskaitės.

2.3.2. Sarkocistų identifikavimas molekuliais metodais

2.3.2.1 Pavienių sarkocistų izoliavimas iš raumeninių pavyzdžių

Netipinių *Sarcocystis* rūšių sarkocistų aptikimui avių raumeniniuose audiniuose naudotas kompresorinis-mikroskopinis dažytų raumeninių iškarpų metodas (Prakas et al., 2020). Tiriamas raumeninis audinys sukarpomamas į 28 gabalėlius (5–7 mm ilgio ir 1–2 mm pločio), kurių bendra masė sudaro apie 1 g. Sukarpyti gabaliukai perkeliama ant sintetinio tinklelio ir 30 ml panardinami į 0,2 % metileno mėlio dažų vandeninį tirpalą (0,5 g metileno mėlio; 250 ml distiliuoto vandens), retkarčiais pamaišant. Kartu su sintetiniu tinkleliu, raumens gabaliukai yra nusausinami juos sudedant 3–5 sek. ant filtrinio popieriaus. Nudažyti gabaliukai 20 ml panardinami į 1,5 % acto rūgšties tirpalą (7,5 ml acto rūgšties; 500 ml distiliuoto vandens) ir kartais pamaišomi, jog gabaliukai nebūtų sulipę. Raumens gabalėliai nusausinimui vėl sudedami ant filtrinio popieriaus. Sausi gabaliukai perkeliama ant stiklinio kompresoriaus, sudaryto iš varžtais suveržtų dviejų stiklo plokštelių. Nudažyti raumens pavyzdžiai mikroskopuojami Nikon ECLIPSE 80i šviesiniu mikroskopu. Aptikta sarkocista izoliuojama iš raumeninio audinio dviejų adatėlių pagalba ir patalpinama į mėgintuvėlį, užpildytą 96 % etanoliumi. Mėgintuvėlis laikomas 2–4 savaites 4 °C temperatūroje šaldytuve, priklausomai nuo dažo išsiplovimo greičio.

2.3.2.2 gDNR skyrimas iš izoliuotų sarkocistų

gDNR skyrimas iš raumens pavyzdžių izoliuotų pavienių sarkocistų vykdomas pagal modifikuotą protokolą (Pozio & Rosa, 2003). Išskirta sarkocista yra perkeliama į 0,5 ml mėgintuvėlį ir praplaunama 5 µl PBS tirpalo. Pridedama 2 µl Tris-HCl tirpalo (pH = 7,6) ir mėginys inkubuojamas 10 min. 90 °C temperatūroje. Reakcija stabdoma atšaldant mėgintuvėlį ant ledo. Pridedama 3 µl proteinazės K tirpalo (100 µg/ml) ir inkubuojama 3 val. 48 °C temperatūroje. Reakcija stabdoma mėginį pakaitinus 10 min. 90 °C temperatūroje ir atšaldant ant ledo. Išskirta gDNR iš sarkocistos laikoma laikoma –20 °C temperatūroje.

2.3.2.3 Molekulinė izoliuotų sarkocistų analizė

Izoliuotų sarkocistų genetinė analizė vykdoma taikant lizdinę PGR kaip aprašyta 2.3.1.4 skyriuje, amplikonų dydžiai tikrinami elektroforezės pagalba agarozės gelyje kaip aprašyta 2.3.1.5 skyriuje. Teigiami mėginiai paruošiami sekoskaitai juos išvalant pagal 2.3.1.6 skyriuje aprašytą protokolą.

2.3.2.4 *Sarcocystis* rūšių identifikavimas galutiniuose šeimininkuose

Siekiant nustatyti, kokios avyse parazituojančios *Sarcocystis* rūšys yra paplitusios Lietuvoje, papildomai buvo tirti trys plėšrieji žinduoliai: rudoji lapė, pilkasis vilkas ir usūrinis šuo. DNR mėginiai šiai tyrimo daliai paruošti GTC Molekulinės ekologijos darbuotojų, dirbančių Lietuvos mokslo tarybos finansuojamame projekte „Naminių ir laukinių šunių ir katių plėšrūnų vaidmuo platinant *Sarcocystis* parazitus“.

2.3.2.5 Medžiagos paruošimas *Sarcocystis* spp. identifikavimui molekuliniiais metodais

Surinktuose trijų plėšrūnų pavyzdžiuose esančios *Sarcocystis* spp. oocistos/sporocistos išskirtos iš gyvūnų žarnyno pagal modifikuotą protokolą (Verma et al., 2017). Žarnyno epitelio nuogrindos suspenduojamos 50 ml distiliuoto vandens, centrifuguojama 10 min. 1000 aps./min. greičiu, 25 °C temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, kartojama centrifugavimo procedūra, o susidaręs supernatantas nupilamas (Prakas et al., 2021). Iš 200 µl pakartotinai suspenduotų nuosėdų skiriama gDNR, naudojant komercinį rinkinį „GeneJET Genomic DNA Purification Kit“.

2.3.2.6 Genetinė *Sarcocystis* spp. paieška galutiniuose šeimininkuose

Sarcocystis rūšys identifikuojamos galutiniuose šeimininkuose vykdant lizdinę PGR kaip aprašyta 2.3.1.4 skyriuje, tikslinių fragmentų susidarymas vizualizuojamas agarozės gelyje kaip aprašyta 2.3.1.5 skyriuje. Teigiami mėginiai paruošiami sekoskaitai juos išvalant pagal 2.3.1.6 skyriuje aprašytą metodiką.

2.3.3. Genetinė analizė

Sekoskaitos metu gautos *Sarcocystis* rūšių sekos analizuotos jas lyginant su NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis sekomis, panaudojant nukleotidų lyginimo įrankį BLAST (Altschul et al., 1990; Sayers et al., 2022). Daugybinius gautų sekų palyginys suformuotas naudojant MUSCLE algoritimą, integruotą MEGA 11 programoje (Kimura et al., 2021). Filogenetinių medžių formavimui naudotas didžiausio tikėtimumo metodas. Filogenijos analizės patikimumas vertinamas naudojant imčių kartojimo (angl. *bootstrapping*) metodą ir 1000 iteracijų.

2.3.4. Statistinė analizė

Blaker testas naudotas nustatyti 95 % pasikliautinuosius intervalus (PI) *Sarcocystis* spp. aptikimo rodikliams. Statistiniai skirtumų tarp infekcijos dažnių reikšmingumai įvertinti naudojant Pirsono (χ^2) arba Fišerio (angl. *Fisher*) tikslųjį testą, priklausomai nuo mėginių imties. Vienfaktorė nepriklausomų imčių ANOVA analizė naudota siekiant nustatyti, ar skirtumai tarp užsikrėtimo dažnio vidurkių yra statistiškai reikšmingi. Esant statistiškai reikšmingam skirtumui tarp vidurkių, taikomas Tukey HSD (angl. *honestly significant difference*) kriterijus. Statistinės analizės rezultatai apskaičiuoti Quantitative Parasitology 3.0 ir GraphPad Prism 10 programomis (Reiczigel *et al.*, 2019). Statistiškai reikšmingi skirtumai laikyti, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1. *Sarcocystis* rūšinė įvairovė Lietuvoje auginamų avių raumeniniuose audiniuose

Ankstesnio tyrimo metu Lietuvoje tirtos ir nustatytos *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšys, kurios pasaulio mastu yra pačios dažniausios naminėse avyse (Marandykina-Prakienė et al., 2022). Šio darbo tikslas buvo aptikti naminių avių audiniuose kitas, netipines *Sarcocystis* rūšis. Dėl šios priežasties, darbo pradžioje, išanalizavus duomenų bazėje esančią informaciją apie Lietuvoje atliktus *Sarcocystis* rūšių tyrimus, buvo pasirinktos mūsų šalyje dažniausios šios genties parazitų rūšys (3.1 lentelė).

3.1 lentelė. Dažniausios Lietuvoje aptinkamos *Sarcocystis* rūšys

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Tarpinis šeimininkas	Galutinis šeimininkas
<i>S. alces</i>	Briedis (<i>Alces alces</i>)	Poliarinė lapė (<i>Alopex lagopus</i>), rudoji lapė, naminis šuo
<i>S. arieticanis</i>	Naminės avys, laukinės avys (<i>Ovis ammon</i>)	Naminis šuo
<i>S. capracanis</i>	Ožka (<i>Capra hircus</i>)	Kojotas (<i>Canis latrans</i>), pilkasis vilkas, savaninė lapė (<i>Cerdocyon thous</i>), rudoji lapė
<i>S. capreolicanis</i>	Stirna (<i>Capreolus capreolus</i>)	Naminis šuo, rudoji lapė, poliarinė lapė, usūrinis šuo
<i>S. cruzi</i>	Gaūras (<i>Bos frontalis</i>), bantengas (<i>Bos javanicus</i>), naminis jautis (<i>Bos taurus</i>), bizonas (<i>Bison bison</i>), stumbras (<i>Bison bonasus</i>), Azijinis buivolai (<i>Bubalus bubalis</i>)	Kojotas, naminis šuo, rudoji lapė
<i>S. gracilis</i>	Stirna (<i>Capreolus capreolus</i>), Sibirinė stirna (<i>Capreolus pygargus</i>), naminis jautis (<i>Bos taurus</i>)	Naminis šuo, rudoji lapė, usūrinis šuo
<i>S. hjorti</i>	Taurusis elnias (<i>Cervus elaphus</i>), Ispanijos taurusis elnias (<i>Cervus elaphus hispanicus</i>), briedis (<i>Alces alces</i>)	Poliarinė lapė, rudoji lapė, naminis šuo
<i>S. linearis</i>	Dėmėtasis elnias (<i>Cervus nippon</i>), stirna (<i>Capreolus capreolus</i>)	Canidae šeimos atstovai*
<i>S. morae</i>	Taurusis elnias (<i>Cervus elaphus</i>), danielius (<i>Dama dama</i>)	Naminis šuo
<i>S. taeniata</i>	Briedis (<i>Alces alces</i>), dėmėtasis elnias (<i>Cervus nippon</i>)	Canidae šeimos atstovai*
<i>S. tenella</i>	Naminės avys, laukinės avys	Naminis šuo, kojotas, rudoji lapė

*Eksperimentiškai nėra nustatyta, tačiau remiantis filogenetine analize, turėtų būti šuninių plėšrūnai

Ilgą laiką manyta, jog ūkiniuose gyvūnuose aptinkamoms *Sarcocystis* rūšims būdingas griežtas tarpinio šeimininko specifiškumas, t.y. parazitavimas vienoje šeimininko rūšyje. Pastaruoju metu daugėja pranešimų apie *Sarcocystis* rūšis, aptinkamas anksčiau neaprašytuose šeimininkuose. Siekiant patikrinti, ar Lietuvoje auginamose naminėse avyse parazituoja kitos, joms netipinės *Sarcocystis* rūšys, tyrimo pradžioje atsitiktiniu būdu pasirinkta 20 mėginių iš skirtingų raumeninių audinių (8 iš diafragmos, 6 iš stemplės ir 6 iš homogenizuotų širdies mėginių). Vienas mėginys buvo pasirinktas tik iš vieno avies individo, siekiant turėti kuo platesnę mėginių imtį. Tuo pat metu ieškota ir tipinių, *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių, kurios šiame darbo etape buvo kaip kontrolės, norint palyginti tipinių ir netipinių rūšių pasiskirstymą skirtinguose avių audiniuose.

Pirmiausia, bandyta pagausinti tikslinius *Sarcocystis* rūšių fragmentus, naudojant tiesioginę PGR su rūšiai specifinėmis pradmenų poromis, taip taupant finansinius išteklius (2.1 lentelė). Remiantis literatūra, *Sarcocystis* parazitų DNR koncentracija homogenizuotuose mėginiuose gali būti maža, todėl dažnu atveju tiksliniai fragmentai nėra matomi po tiesioginio PGR. Dėl šios priežasties, tuose pačiuose mėginiuose buvo siekiama pagausinti fragmentus ir lizdinės PGR metu. Pirmajame cikle naudota *Sarcocystis* genčiai specifinė SF1/SsunR3 pradmenų pora, tačiau tikslinių fragmentų nesimatė. Antrojo lizdinės PGR ciklo metu, naudojant rūšiai specifinių pradmenų poras, pavyko pagausinti DNR fragmentus. Bendras aptikimo dažnis, nustatytas tiesiogine PGR buvo 20,7 % (95 % CI = 13,50–26,72), tuo tarpu lizdine PGR gautas žymiai didesnis – 50,7 % (95 % CI = 42,49–58,94) (3.2 lentelė). Gauti rezultatai parodė, jog naudojant dviejų žingsnių PGR metodiką gaunama beveik du kartus daugiau teigiamų amplikonų lyginant su tiesioginės PGR rezultatais tiek tipinių (*S. arieticanis* ir *S. tenella*), tiek ir netipinių *Sarcocystis* rūšių atveju. Statistiškai daugiau tipinių avims *S. arieticanis* ($\chi^2 = 8,46$; $df = 1$; $p < 0,05$) ir *S. tenella* ($\chi^2 = 11,61$; $df = 1$; $p < 0,05$) rūšių buvo nustatyta naudojant lizdinę PGR lyginant su tiesiogine PGR. Tokia pati tendencija pastebėta ir *S. capracanis* ($\chi^2 = 6,40$; $df = 1$; $p < 0,05$) bei *S. morae* ($\chi^2 = 8,27$; $df = 1$; $p < 0,05$) rūšių atveju, kuomet lizdinės PGR metu gautas aptikimo dažnis buvo statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su tiesioginės PGR.

3.2 lentelė. Tipinių ir netipinių *Sarcocystis* rūšių nustatymas avių raumeniniuose audiniuose tiesiogine (PGR) ir lizdine PGR (nPGR)

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Tiesioginė PGR	Lizdinė PGR
<i>S. arieticanis</i>	8/20 (40,0 %)	17/20 (85,0 %)
<i>S. capracanis</i>	6/20 (30,0 %)	14/20 (70,0 %)
<i>S. capreolicanis</i>	0/20 (0 %)	5/20 (25,0 %)
<i>S. hjorti</i>	0/20 (0 %)	1/20 (5,0 %)

3.2 lentelės tęsinys. Tipinių ir netipinių *Sarcocystis* rūšių nustatymas avių raumeniniuose audiniuose tiesiogine (PGR) ir lizdine PGR (nPGR)

<i>S. linearis</i>	0/20 (0 %)	1/20 (5,0 %)
<i>S. morae</i>	4/20 (20,0 %)	13/20 (65,0 %)
<i>S. tenella</i>	11/20 (55,0 %)	20/20 (100 %)

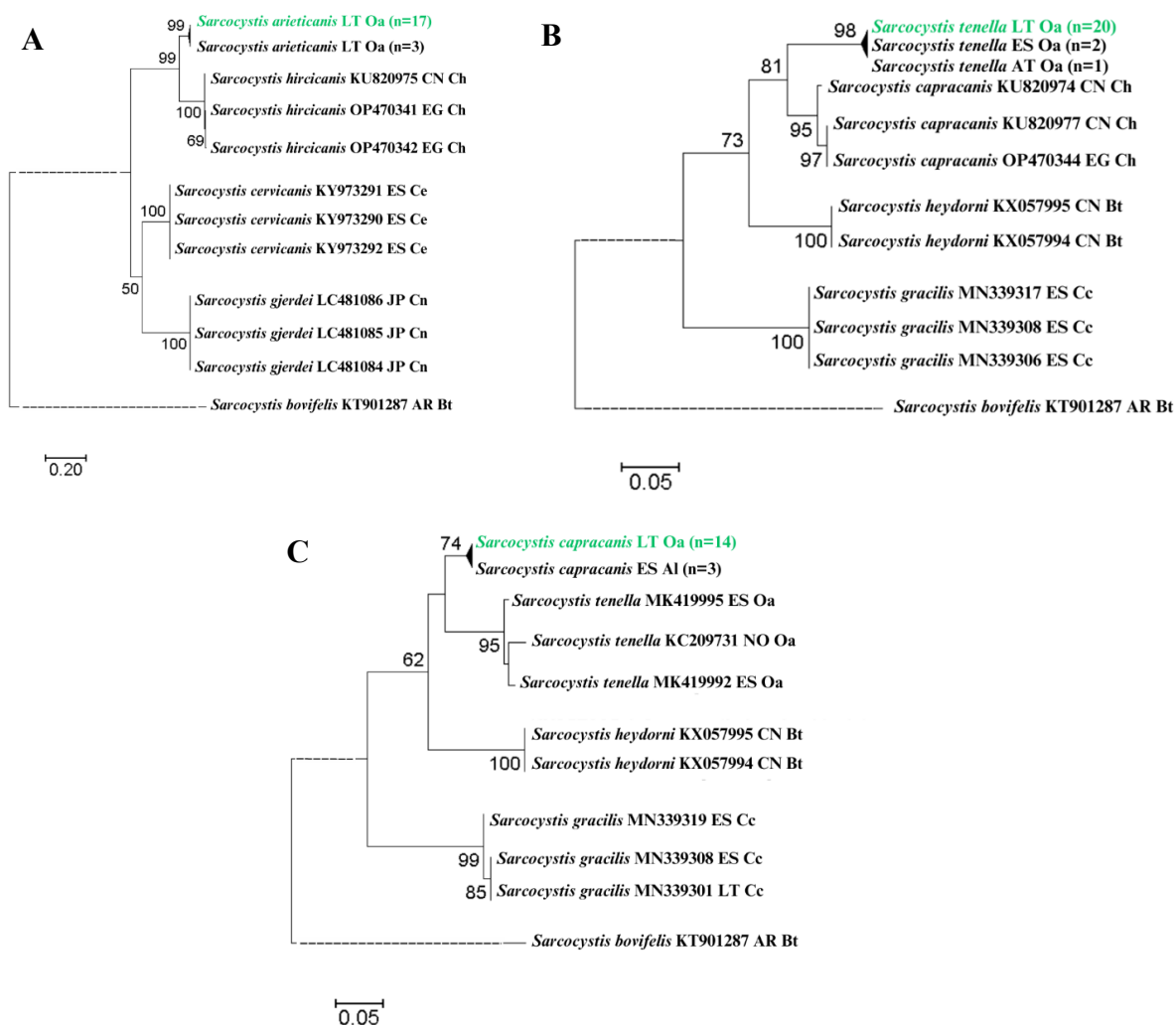
Gauti rezultatai parodo, jog *Sarcocystis* rūšių aptikimui iš homogenizuotų mėginių išskirtoje DNR yra reikalingas jautresnis metodas už tiesioginę PGR. Maža *Sarcocystis* parazitų DNR koncentracija geriau ir specifiškiau detektuojama lizdine PGR, kuri ir buvo naudojama tolimesniuose darbo etapuose.

Atlikus kiekvienos *Sarcocystis* rūšies pagausintų dalinių *cox1* geno fragmentų teigiamų mėginių sekoskaitą, nustatyta, jog tiriamose avyse dažniausiai parazituojančios rūšys yra ir anksčiau dokumentuotos *S. arieticanis* ir *S. tenella* bei iki šiol avyse kaip tarpiniuose šeimininkuose neaprašytos *S. capracanis*, *S. capreolicanis*, *S. hjorti*, *S. linearis* ir *S. morae*. Elniniuose aptinkamos *S. alces*, *S. gracilis* ir *S. taeniata* bei galvijus infekuojanti *S. cruzi* rūšys avių audiniuose nebuvo aptiktos. Nustatytos vidurūšinio ir tarprūšinio kintamumo reikšmės nepersidengė, todėl tyrime naudojama metodika yra tinkama tirtų *Sarcocystis* rūšių identifikavimui (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Avių raumeniniuose audiniuose aptiktų *Sarcocystis* rūšių vidurūšinė ir tarprūšinė įvairovė

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Sekų identiškumas lyginant su NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis tos pačios rūšies sekomis	Sekų identiškumas lyginant su NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis taksonomiškai artimų rūšių sekomis
<i>S. arieticanis</i>	97,5–100 %	87,2–87,7 % <i>S. hircicanis</i>
<i>S. capracanis</i>	97,5–100 %	91,9–93,2 % <i>S. tenella</i>
<i>S. capreolicanis</i>	99,2–100 %	94,8–95,2 % <i>S. alceslatrans</i>
<i>S. hjorti</i>	98,7–100 %	94,6–96,2 % <i>S. pilosa</i>
<i>S. linearis</i>	98,1–100 %	97,4–97,8 % <i>S. taeniata</i>
<i>S. morae</i>	96,6–100 %	83,2–84,6 % <i>S. cervicanis</i>
<i>S. tenella</i>	99,1–100 %	91,8–92,0 % <i>S. capracanis</i>

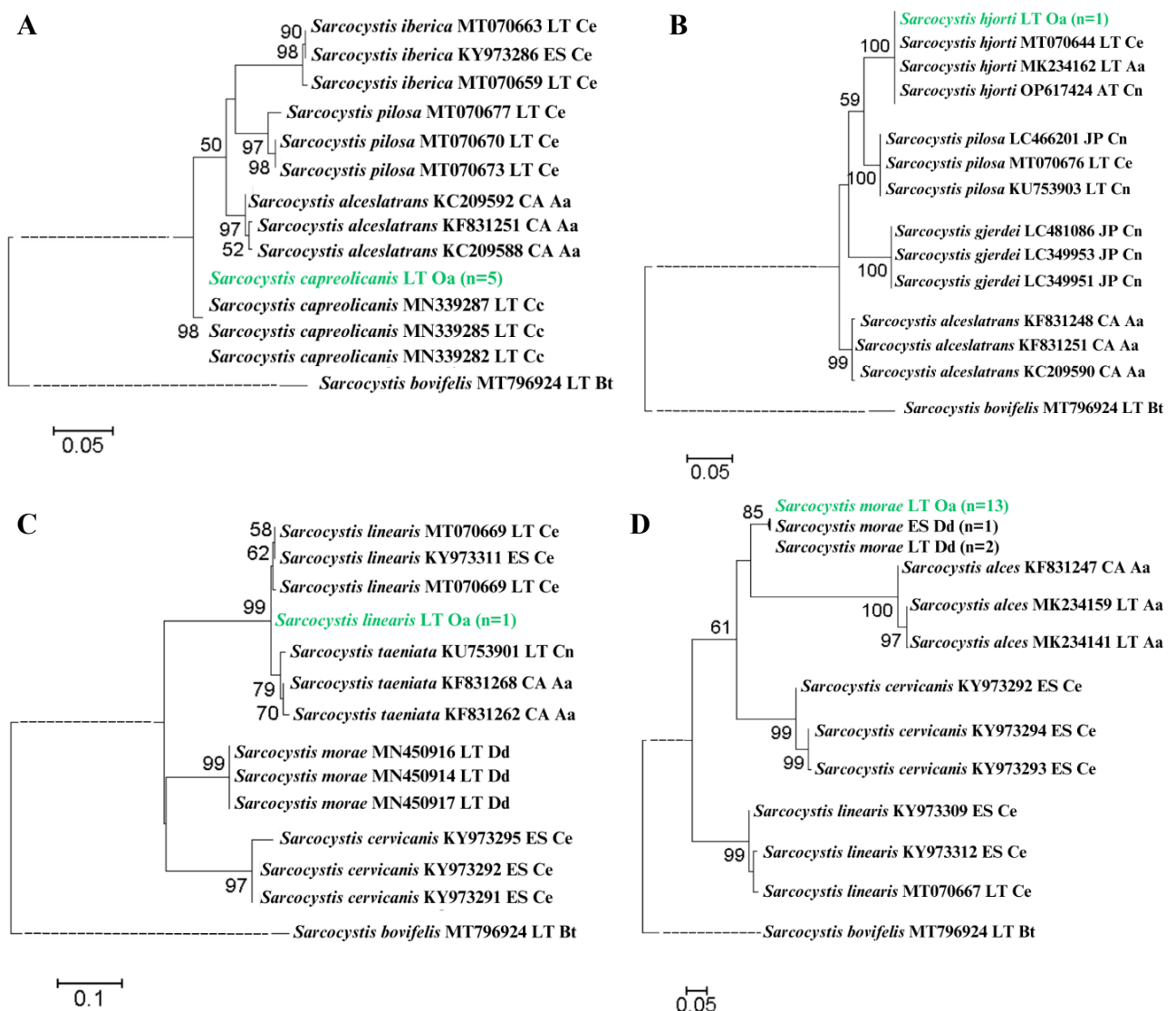
Siekiant įvertinti, ar darbe nustatytos *Sarcocystis* rūšių dalinės *cox1* geno sekos grupuojasi su kitomis NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis tos pačios rūšies sekomis, atlikta filogenetinė analizė. Filogenetinių medžių konstravimui pasirinktos dalinės *cox1* geno sekos, nustatytos šio darbo metu, bei pagal NCBI Blast įrankio informaciją trys artimiausios *Sarcocystis* rūšys. Nors patikimumo rodiklis tarp mokslininkų vis dar yra diskutuotina tema, vieni tyrėjai patikimumis šakų įkėlų vertėmis laiko didesnes arba lygias 50 %, kitų nuomone šis rodiklis turi viršyti 70 % (Dong et al., 2018; Mohd Fadil et al., 2019). Šios filogenijos analizės metu, patikimumis imčių kartojimo vertėmis laikytos didesnės arba lygios 50 %. Suformavus Caprinae pošeimio gyvūnuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių filogenetinius medžius, nustatyta, jog tiek *S. arieticanis*, tiek *S. capracanis*, tiek ir *S. tenella* atvejais, šiame darbe nustatytos rūšys formuoja atskirą kladą su tos pačios rūšies sekomis, gautomis iš kitų izoliatų (3.1 pav.)



3.1 pav. Naminėse ir laukinėse avyse bei ožkose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai medžiai, suformuoti remiantis dalinėmis *cox1* geno sekomis. A) Avyse parazituojančios *S. arieticanis* rūšies filogenetinis medis; B) Avyse parazituojančios *S. tenella* rūšies filogenetinis medis; C) *Sarcocystis capracanis* rūšies, parazituojančios ožkose, filogenetinis medis. Filogenetiniai medžiai nubraižyti naudojant didžiausio tikėtimumo metodą, taikant Kimura-2+G evoliucinį nukleotidų sekų pakaitų modelį. Šakų grupavimosi patikimumas vertinamas naudojant imčių kartojimo metodą su 1000 iteracijų. Šio darbo metu nustatytos sekos pažymėtos žalia spalva. Brūkšninė linija, naudojama išorinės grupės atveju, neatitinka tikrųjų evoliucinių atstumų. AT: Austrija, CZ: Čekija, EG: Egiptas, ES: Ispanija, CN: Kinija, LT: Lietuva, NO: Norvegija, JP: Japonija, AI: berberinis avinas (*Ammotragus lervia*), Bt: *Bos taurus*, Ch: *Capra hircus*, Cc: *Capreolus capreolus*, Cn: *Cervus nippon*, Oa: *Ovis aries*, Pl: paprastasis meškėnas (*Procyon lotor*)

Tokia pati tendencija pastebėta elniniuose gyvūnuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių filogenetinėje analizėje (3.2 pav). Visuose keturiuose dalinių *cox1* geno fragmentų filogenetiniuose medžiuose matoma, jog darbo metu nustatytos Cervidae šeimoje parazituojančios rūšys grupuojasi su tos pačios *Sarcocystis* rūšies sekomis, esančiomis NCBI Genų banko duomenų bazėje. Išskirtinai, *S. linearis* rūšies atveju, kaip yra matoma iš suformuoto filogenetinio medžio, labai

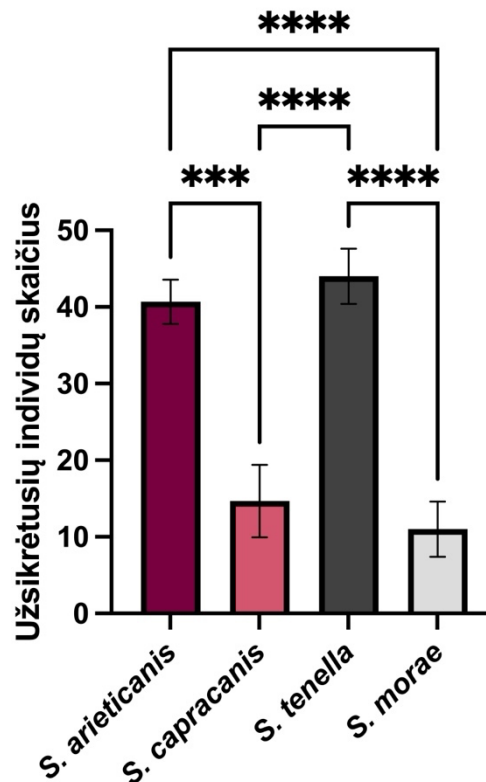
genetiškai artima rūšis yra *S. taeniata*, todėl šioms dviem rūšims sukurti atskirų rūšių specifinių pradmenų nėra įmanoma. Šias rūšis nustatyti galima tik po atliktos sekoskaitos ir filogenetinės analizės, ką galima pastebėti iš šio darbo metu suformuoto filogenetinio medžio (3.2 pav. C dalis).



3.2 pav. Elniniuose gyvūnuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai medžiai, suformuoti remiantis dalinėmis *cox1* geno sekomis. A) *Sarcocystis capreolicanis* rūšies filogenetinis medis; B) *Sarcocystis. hjorti* rūšies filogenetinis medis; C) *Sarcocystis linearis* rūšies filogenetinis medis; D) *Sarcocystis morae* rūšies filogenetinis medis. Filogenetiniai medžiai nubraižyti naudojant didžiausio tikėtimumo metodą, taikant Kimura-2+G evoliucinį nukleotidų sekų pakaitų modelį. Šakų grupavimosi patikimumas vertinamas naudojant iteracijų metodą su 1000 pakartojimų. Šio darbo metu nustatytos sekos pažymėtos žalia spalva. Brūkšninė linija, naudojama išorinės grupės atveju, neatitinka tikrųjų evoliucinių atstumų. IS: Islandija, CA: Kanada, NO: Norvegija, JP: Japonija, Aa: *Alces alces*, Dd: *Dama dama*, Rt: šiaurinis elnias (*Rangifer tarandus*), Ss: kiaulė (*Sus scrofa*)

Gauti rezultatai rodo, jog dažniausios anksčiau avyse kaip tarpiniuose šeiminiukuose neaprašytos yra tik dvi *Sarcocystis* rūšys, *S. capracanis* ir *S. morae*, kurių toliau ieškota likusiuose

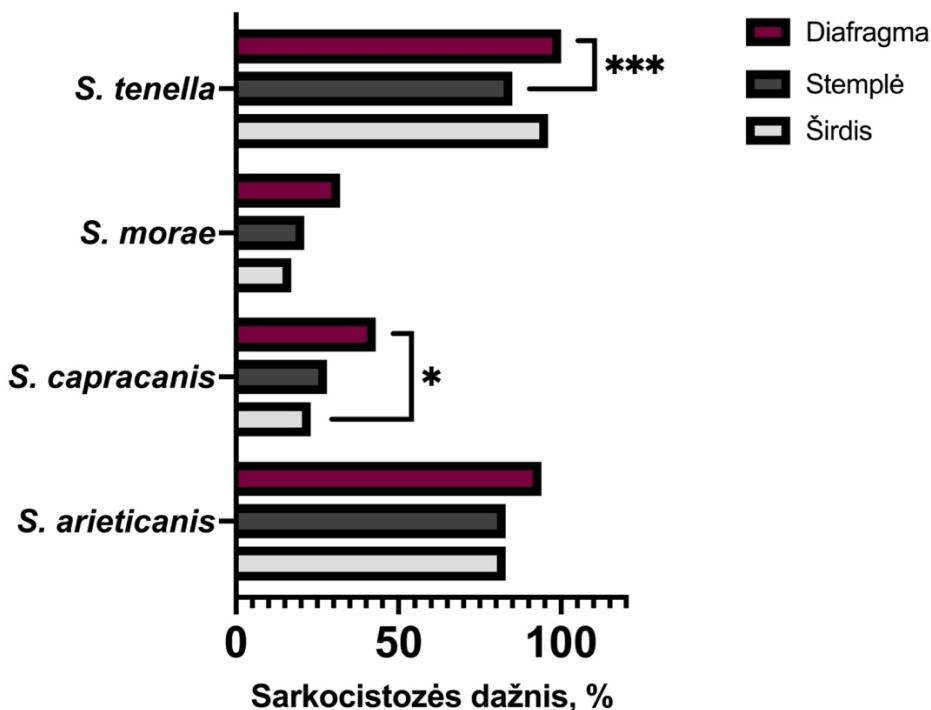
mėginiuose. Siekiant palyginti, kaip skiriasi netipinių ir tipinių *Sarcocystis* rūšių aptikimo dažnis avyse, visa tiriamų mėginių imtis (n = 141) analizuota naudojant *S. arieticanis*, *S. capracanis*, *S. morae* ir *S. tenella* rūšiai specifinius pradmenis. Gauti rezultatai parodė, jog kaip ir tikėtasi, avyse įprastai parazituojančios *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšys yra labiau paplitusios lyginant su *S. capracanis* ir *S. morae* (3.3 pav.). Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp užsikrėtimo dažnių vidurkių tirtuose naminių avių raumeniniuose pavyzdžiuose nenustatyta tarp *S. arieticanis* ir *S. tenella* bei tarp *S. capracanis* ir *S. morae* rūšių.



3.3 pav. Tipinių ir netipinių *Sarcocystis* rūšių užsikrėtimo dažnis Lietuvoje auginamose naminėse avyse. Stulpeliai ir klaidų juostos nurodo vidurkis ± SN. Statistinis reikšmingumas nurodytas žvaigždutėmis (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$)

Analizuojant darbo metu nustatytą *Sarcocystis* rūšių pasiskirstymą tirtuose raumeniniuose audiniuose, *S. capracanis* rūšies užsikrėtimo dažnis (42,50 %) diafragmoje (95 % CI = 28,51–57,51) buvo statistiškai reikšmingai didesnis lyginant su aptikimo dažniu (23,40 %) širdyje (95 % CI = 13,21–37,52) ($\chi^2 = 3,90$; $p < 0,05$) (3.4 pav.). Taip pat nustatytas statistiškai patikimai didesnis *S. tenella* rūšies paplitimas diafragmoje (100 %) (95 % CI = 92,03–100) lyginant su parazito aptikimu stemplėje (85,11 %) (95 % CI = 71,5–92,85) ($\chi^2 = 7,56$; $p < 0,001$). Kitų darbe nustatytų

Sarcocystis rūšių atveju, statistiškai reikšmingų užsikrėtimo dažnių skirtumų raumeniniuose avių audiniuose nenustatyta.



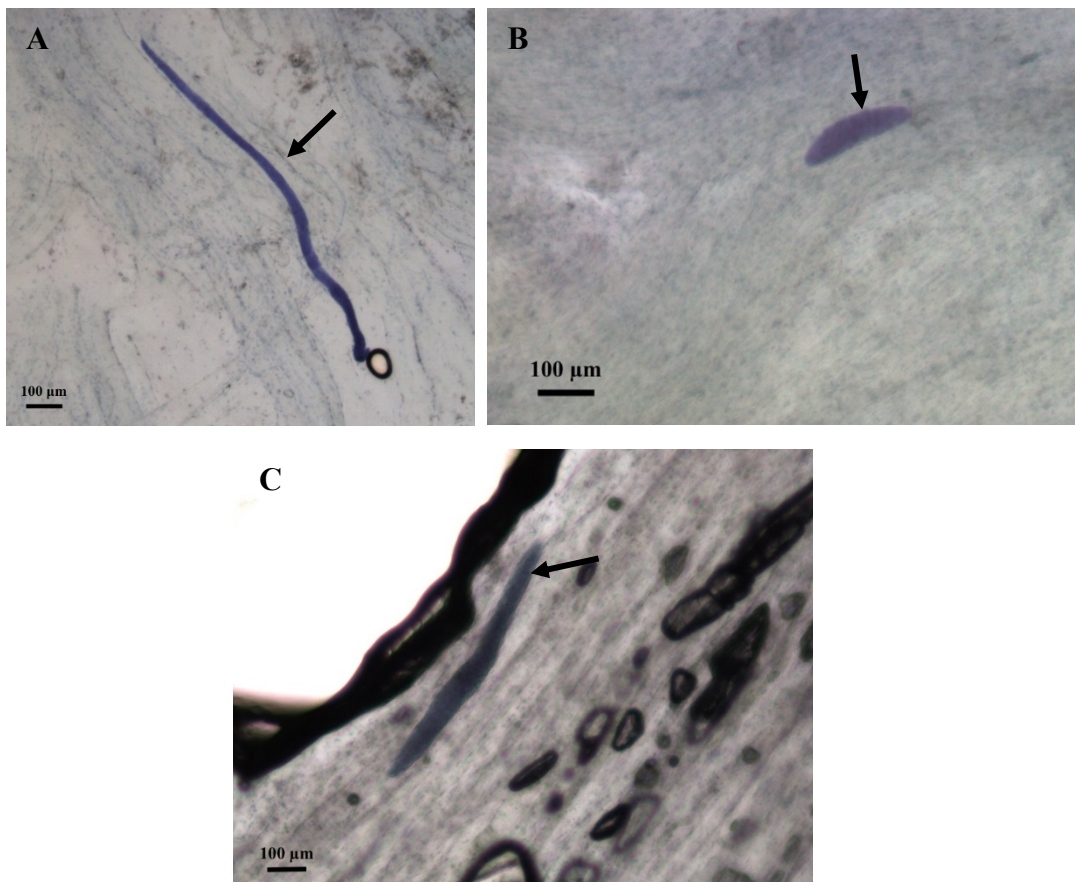
3.4 pav. Tipinių ir netipinių *Sarcocystis* rūšių užsikrėtimo dažnis tirtuose naminių avių raumeniniuose audiniuose. Statistinis reikšmingumas nurodytas žvaigždutėmis (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

3.2. *Sarcocystis* parazitų identifikavimas dažytuose pavyzdžiuose

Siekiant aprašyti *Sarcocystis* rūšis naujame tarpiniame šeimininke yra reikalingas morfologinis sarkocistų apibūdinimas. Sarkocistų forma ir sienelės struktūra geriausiai galima įvertinti taikant nedažytų raumeninių išskarpų metodą. Šio metodo panaudojimas yra problematiškas dėl ilgai trunkančio proceso, specialių įgūdžių bei sunkumų aptikti sarkocistas, jeigu užsikrėtimas parazitais yra itin mažas. Dėl šių priežasčių, netipinių *Sarcocystis* rūšių sarkocistų paieška raumeniniuose audiniuose buvo vykdyta naudojant modifikuotą raumeninių išskarpų metodą, mėginius dažant metileno mėliu. Tokiu būdu sarkocistos aiškiai yra matomos tiriamuose raumeniniuose audiniuose.

Avims tipinių *Sarcocystis* rūšių (*S. arieticanis* ir *S. tenella*) paplitimas tirtuose raumeniniuose audiniuose pasirodė itin dažnas. Nebuvo nustatyta tokių mėginių, kuriuose molekuline analize nebūtų identifikuotos abi rūšys. Bent viena avims tipinė *Sarcocystis* rūšis buvo nustatyta visuose tirtuose ($n = 141$) mėginiuose. Toks didelis aptikimo dažnis komplikuoja netipinių *Sarcocystis* rūšių paiešką pagal morfologinį kriterijų ar kitais mikroskopiniais metodais. Netipinių *Sarcocystis* rūšių

formuojamų sarkocistų avių audiniuose paieška vykdyta tik tuose izoliatų pavyzdžiuose, kuriuose nebuvo aptikta morfologiškai panašių avyse parazituojančių tipinių *Sarcocystis* rūšių. Jei molekuliniais metodais iš atitinkamo homogenizuoto raumeninio audinio pavyzdžio pavyko pagausinti tik *S. morae* rūšiai specifinį fragmentą, o į ją morfologiškai labai panašios *S. arieticanis* rūšies nebuvo nustatyta, tuomet tokiame raumeniniame audinyje buvo ieškoma *S. morae* rūšies sarkocistų. Toks pat principas taikytas *S. capracanis* rūšies atveju, pavyzdžiuose, kuriuose nebuvo aptikta *S. tenella* rūšies. Modifikuoto trichinoskopijos metodu analizuota 14 skirtingų avių izoliatų raumeninių audinių. Mikroskopiškai įvertinus užsikrėtimo intensyvumą, nuspręsta iš kiekvieno izoliato išskirti po dešimt sarkocistų genetiniam identifikavimui (3.5 pav.).



3.5 pav. *Sarcocystis* spp. sarkocistos tiriamuose avių raumeniniuose pavyzdžiuose: A) diafragmoje; B) stemplėje; C) širdyje. Rodyklėmis pažymėtos raumenyse aptiktos sarkocistos

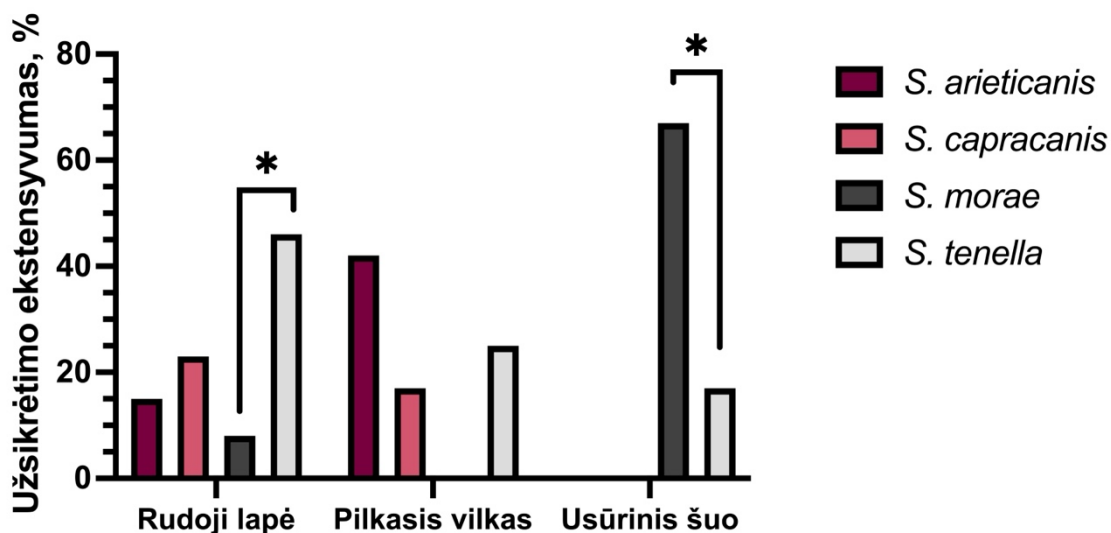
Kiekviena individuali sarkocista nufotografuota, išmatuoti jos parametrai ir dviejų adatėlių pagalba, izoliuota sarkocista perkelta į mėgintuvėlį su etanoliumi. Jeigu infekcijos intensyvumas tiriamame individe didelis ir sarkocistų matoma labai daug, stengtasi išskirti kuo įvairesnių dydžių sarkocistų (žr. 1 priedą). Išskyrus gDNR iš kiekvienos sarkocistos, vykdyta lizdinė PGR su

Sarcocystis genčiai ir rūšiai specifinėmis pradmenų poromis, atitinkamai pirmame ir antrame lizdinės PGR etapuose.

Atlikus lizdinę PGR, amplifikuoti fragmentai matėsi tik naudojant tipinių, *S. arieticanis* arba *S. tenella* rūšių specifines pradmenų poras. Netipinėms *S. capracanis* ir *S. morae* rūšims specifinių fragmentų pagausinti nepavyko, todėl galima teigti, jog netipinių rūšių formuojamos sarkocistos yra itin retos ir jas sunku aptikti dėl didelio tipinių rūšių intensyvumo.

3.3. *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių naminėse avyse, paplitimas Lietuvoje

Siekiant identifikuoti, koks yra *Sarcocystis* rūšių paplitimas Lietuvoje, toliau buvo analizuojama iš šuninių plėšrūnų žarnynų išskirta *Sarcocystis* parazitų DNR. Molekulinei analizei naudota 13 rudųjų lapių, 12 pilkųjų vilkų ir 12 usūrinių šunų DNR mėginių. Gauti rezultatai parodė, jog rudoji lapė statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) daugiau platina *S. tenella* (95 % CI = 22,4–73,95) lyginant su *S. morae* rūšimi (95 % CI = 0,4–34,15) (3.5 pav.). Priešingai nei rudoji lapė, pilkuosiuose vilkuose nustatyta didžiausia *S. arieticanis* rūšies infekcija, o *S. morae* tirtuose šio plėšrūno mėginiuose neaptikta. Tuo tarpu, 66,67 % (95 % CI = 37,02–87,71) iš tirtų usūrinių šunų buvo aptikta *S. morae* rūšis ir 16,67 % (95 % CI = 3,05–45,71) *S. tenella* rūšies sporocistų. Didesnis *S. morae* rūšies aptikimo dažnis usūriniuose šunyse yra statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) didesnis lyginant su *S. tenella* rūšies aptikimo dažniu.



3.5 pav. Plėšriųjų žinduolių pernešamų *Sarcocystis* rūšių infekcijos dažnis Lietuvoje. Statistinis reikšmingumas nurodytas žvaigždute (* $p < 0,05$)

Atlikus teigiamų mėginių sekoskaitą, gautos *Sarcocystis* spp. sekos palygintos su NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis tos pačios rūšies ir taksonomiškai artimiausių rūšių sekomis (3.4 lentelė).

3.4 lentelė. Lietuvos šuniniuose plėšrėnuose parazituojančių *Sarcocystis* rūšių vidurūšinė ir tarprūšinė įvairovė

<i>Sarcocystis</i> rūšis	Vidurūšinė įvairovė su NCBI Genų banko sekomis	Tarprūšinė įvairovė su NCBI Genų banko duomenų bazėje esančiomis sekomis		
<i>S. arieticanis</i>	91,29–100 %	82,59–84,44 % <i>S. capracanis</i>	81,86–82,56 % <i>S. cervicanis</i>	81,19–81,68 % <i>S. alces</i>
<i>S. capracanis</i>	97,88–100 %	92,17–93,59 % <i>S. tenella</i>	86,47–87,22 % <i>S. gracilis</i>	82,96–83,33 % <i>S. linearis</i>
<i>S. morae</i>	96,23–100 %	84,67–85,27 % <i>S. cervicanis</i>	82,25–84,44 % <i>S. linearis</i>	81,23–81,91 % <i>S. taeniata</i>
<i>S. tenella</i>	98,11–100 %	88,95–90,86 % <i>S. capracanis</i>	87,10–86,83 % <i>S. heydorni</i>	82,80–83,33 % <i>S. gracilis</i>

Vidurūšinio ir tarprūšinio kintamumo vertės nepersidengė, parodančios naudotos identifikavimo metodikos tinkamumą. Apibendrinant, avyse įprastai parazituojančios ir šio darbo metu nustatytos avims netipinės *Sarcocystis* rūšys yra pernašamos Lietuvos plėšriųjų žinduolių.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiuo metu literatūroje yra aprašyta daugiau nei 200 skirtingų *Sarcocystis* rūšių, tačiau ne visų jų iki galo išaiškinti tiek tarpiniai, tiek ir galutiniai šeimininkai (Rosenthal, 2021). Remiantis pasauliniu mastu atliktais tyrimais, naminių gyvulių grupei priskiriamos naminės avys yra vienos labiausiai *Sarcocystis* parazitais infekuojamų tarpinių šeimininkų (Feng *et al.*, 2023). Sarkocistozės susirgimai avyse ne visada lemia patologinius pakitimus, tačiau ūmios infekcijos atveju, gali sumažėti vilnos ar pieno produkcija, o kraštutiniais atvejais – liga gali baigtis gyvulio žūtimi (Mahran *et al.*, 2009; Pestechian *et al.*, 2021). Šio darbo metu buvo tiriama Lietuvoje auginamų naminėse avyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių įvairovė. Januškevičius ir kt. (2019) nustatė, jog Lietuvoje auginamos naminės avys yra 100 % užsikrėtusios *Sarcocystis* parazitais, tačiau rūšys nebuvo nustatytos. Po trijų metų, Marandykina ir kt. (2022) aptiko dvi patogeniškas naminėms avims *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšis, o bendras sarkocistozės dažnis buvo gana aukštas (82,61–100 %).

Europos mastu, šių mikroskopines sarkocistas formuojančių rūšių aptikimo dažnis yra santykinai aukštas 52,2–100 % (Gokpinar *et al.*, 2014; Dessì *et al.*, 2022; Marandykina-Prakienė *et al.*, 2022). Kituose žemynuose, patogeniškų *Sarcocystis* rūšių paplitimas avyse yra labai panašus. Šiaurės Amerikoje *Sarcocystis* infekcija užfiksuota 95,8–100 % tirtų individų (Bittencourt *et al.*, 2016; Portella *et al.*, 2021). Azijoje užsikrėtimo mastai šiek tiek mažesni, kintantys nuo 50,0 % iki 100 % (Rad *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021), priklausomai nuo naudotų metodų. Afrikoje šiomis mikroskopines sarkocistas formuojančiomis rūšimis užsikrėtę 50,4–95,37 % tirtų avių (Amairia *et al.*, 2018; Elmishmishy *et al.*, 2018). Tokie sarkocistozės reikšmių skirtumai atsiranda dėl skirtingų *Sarcocystis* parazitų identifikavimui naudotų metodų. Žinoma, jog tiksliausi rezultatai yra gaunami kombinuojant morfologinius metodus ir molekulinę analizę. Tyrimai atskleidė, kad *S. tenella* rūšies parazitų dažnis diafragmoje, stemplėje ir širdyje reikšmingai nesiskiria (El-Morsey *et al.*, 2019; Abdullah, 2021; Marandykina-Prakienė *et al.*, 2022). Tuo tarpu *S. arieticanis* rečiau aptinkama stemplėje (Abdullah, 2021; Marandykina-Prakienė *et al.*, 2022).

Toks aukštas sarkocistozės lygis rodo, jog *S. arieticanis* ir *S. tenella* yra kosmopolitiniai parazitai, kurių keliama grėsmė gyvulininkystės sektoriui gali lemti didelius nuostolius. Iki šiol mokslininkai manė, jog *Sarcocystis* rūšys pasižymi griežtu specifiškumu tarpiniams šeimininkams, tačiau naujausi tyrimai priverčia tuo abejojti. *S. tenella*, įprastai parazituojanči naminėse avyse, nustatyta gemzėje (*Rupicapra rupicapra tatrlica*) ir naminėje ožkoje (Kolenda *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2016). Per ožkas plintanti *S. moulei* rūšis aptikta naminėse avyse dviejų tyrimų Irane ir vieno tyrimo Irake metu (Kalantari *et al.*, 2016; Swar & Shnawa *et al.*, 2020; Shahabi *et al.*, 2022). Taip pat, *S. moulei* nustatyta Azijinio buivolo audiniuose (Dakhil *et al.*, 2017).

Šio darbo metu, pirmą kartą pasaulyje naminėse avyse nustatyta iki šiol avyse kaip tarpiniuose šeimininkuose neaprašyta *S. morae* rūšis. Anksčiau buvo parodyta, jog *S. morae* įprastai parazituoja Lietuvoje gyvenančiuose elniniuose gyvūnuose (Rudaitytė-Lukošienė et al., 2020). Dėl šios priežasties galima kelti prielaidą, jog naminių avių mitybos plotuose yra *S. morae* rūšies sporocistų, taip patvirtinant šios rūšies parazitavimą ir avyse. Ožkose kaip tarpiniuose šeimininkuose parazituojanči patogeniška *S. capracanis* rūšis aptikta ne tik šio darbo metu, bet ir avies smegenų skysčio mėginyje Jungtinėje Karalystėje (Formisano et al., 2013). Remiantis literatūra, pagal vienodus sarkocistos morfologinius požymius *S. capracanis* yra apibrėžiama kaip seserinis taksonas *S. tenella* rūšiai (El-Morsey et al., 2019). Dėl šios priežasties yra tikėtina, jog Caprinae pošeimį infekuojančios *Sarcocystis* rūšys gali parazituoti ne tik joms būdinguose tarpiniuose šeimininkuose.

Šio tyrimo metu pirmą kartą aprašytas modifikuotas trichinoskopijos ir DNR skyrimo metodas. Pasaulio mastu plačiai naudojamas nedažytų raumeninių iškarpų kompresorinis–mikroskopinis metodas reikalauja praktinių įgūdžių aptinkant sarkocistas, patirties jas izoliuojant iš raumeninio audinio ir didelių laiko sąnaudų (Feng et al., 2023). Nors tokia metodika turi trūkumų, tačiau naujų rūšių morfologinių savybių nustatyme yra būtina. Modifikuotas kompresorinis–mikroskopinis raumeninių iškarpų dažymo metileno mėliu metodas palengvina sarkocistų aptikimą, esant mažam infekcijos intensyvumui ar sarkocistoms nepilnai subrendus. Metileno mėlynasis (3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazin-5-iumchloridas) ir Giemsa yra įprastai parazitologijoje naudojami dažai (Khanna et al., 2014; Abbas & Dijkstra, 2020). Tačiau tik metileno mėlio efektyvumas ir pagerintas jautrumas *Sarcocystis* rūšių aptikime yra įrodytas statistiškai, lyginant nedažytų ir dažytų raumeninių iškarpų trichinoskopijos metodus. Pastebėta, jog dažytose raumeninėse iškarpose sarkocistos buvo aptiktos tris kart dažniau lyginant su nedažytomis raumeninėmis iškarpomis (Ng et al., 2015). Kitų audinių, tokių kaip avių smegenų ir širdies raumeninių audinių tyrimai atliekami tik histopatologiniais arba molekuliniais metodais dėl sunkaus sarkocistų aptikimo nedažytose raumeninėse iškarpose (Bahari et al., 2014; Dong et al., 2018; Marandykina-Prakienė et al., 2022). Tačiau neseniai publikuotame darbe *Sarcocystis* parazitų formuojamos sarkocistos buvo identifikuotos smulkiųjų žinduolių smegenų audiniuose naudojant modifikuotą dažytų raumeninių iškarpų mikroskopinį–kompresorinį metodą (Prakas et al., 2024). Molekuliniiais metodais *Sarcocystis* parazitų infekcija aptinkama žymiai dažniau lyginant su nedažytų raumeninių iškarpų rezultatais (Pipia et al., 2016; Zhu et al., 2022). Nepaisant šių teigiamų metodikos modifikavimo aspektų, iki šiol nėra informacijos apie tolimesnį gDNR skyrimą iš izoliuotų dažytų pavienių sarkocistų. Iki šiol praktikoje naudotas dažytų iškarpų kompresorinis–mikroskopinis metodas nebuvo tinkamai adaptuotas taikyti tolimesnę molekulinę analizę izoliuotiems parazitams. Šio darbo metu, pirmą kartą pasaulyje aprašyta metodika, kurios metu

galima vykdyti gDNR išskirtos iš izoliuotų pavienių sarkocistų genetinį charakterizavimą. Nors šio metodo efektyvumas nebuvo įvertintas darbo metu, tačiau sarkocistų aptikimas esant itin mažam *Sarcocystis* rūšių intensyvumui mėginyje yra ženkliai palengvinamas net ir patirties nedažytų raumeninių iškarpų metodo taikyme turintiems asmenims.

Kombinuojant dirbtinį virškinimą pepsinu ir molekulinę analizę, homogenizuotuose tirtų avių raumeninių audinių mėginiuose aptiktos netipinės avyse kaip tarpiniuose šeimininkuose *S. capracanis* ir *S. morae* rūšys. Tačiau iš metileno mėliu dažytų raumeninių iškarpų mėginių izoliuojant pavienes sarkocistas, ir toliau taikant genetinį charakterizavimą, šių rūšių aptikti nepavyko. Visuose tirtuose avių mėginiuose buvo nustatyta bent viena iš tipinių bei dažniausiai parazituojančių avyse *Sarcocystis* rūšių, *S. arieticanis* arba *S. tenella*. Nors darbo metu buvo bandyta cistų izoliavimui atrinkti tik tam tikrus mėginius, kad palengvinti netipinių avims parazito rūšių aptikimą, tačiau vizualiai matomų skirtimų tarp metileno mėliu dažytų tipinių ir netipinių rūšių formuojamų sarkocistų nebuvo pastebėta. Taip galėjo nutikti dėl ne iki galo subrendusių sarkocistų raumeniniuose audiniuose, kai jų dydis ir forma nėra pilnai išreikšti. Taip pat tipinių *Sarcocystis* rūšių infekcijos intensyvumas mėginiuose yra per didelis, jog iš mažos imties būtų aptiktos netipinių rūšių sarkocistos.

Šunių šeimos plėšrūnai yra pažeidžiami daugelio ectoparazitų (blusų, erkių ir utėlių) ir endoparazitų (nematodų, cestodų ir trematodų) (Bridger & Whitney, 2009; Light et al., 2019). Infekcijos atveju, tokių tipų parazitai gali lengvai egzistuoti simpatrinėje populiacijoje (Otranto et al., 2015). Šunių plėšrūnų organizme besivystančios žarnyno ir kvėpavimo takų parazitų lervos (oocistos ir kiaušinėliai) gali būti išskiriami į aplinką, taip palengvindami galimą parazitinių infekcijų plitimą ir žmonėms (Elshahawy et al., 2023). Tyrimų metu įrodyta, jog šiai šeimai priklausantys žinduoliai gali platinti ir *Sarcocystis* genties parazitus (Dubey et al., 2015a). Užkrėtimo eksperimentų metu nustatyta, jog *S. tenella* rūšies galutiniais šeimininkais gali būti naminis šuo, kojotas ir rudoji lapė (Erber, 1982; Dubey, 1983). Tuo tarpu *S. arieticanis* rūšies atveju, eksperimentiškai įrodytas tik naminio šuns kaip šeimininko vaidmuo (Heydorn & Mehlhorn, 1987). Duomenų trūkumas apie avyse parazituojančių *Sarcocystis* rūšių gyvybiniame cikle egzistuojančių galutinių šeimininkų vaidmenį demonstruoja tokių tyrimų reikalingumą. Šio darbo metu, analizuojant rudųjų lapių, pilkųjų vilkų ir usūrinių šunų mėginius, nustatyta, jog visų trijų rūšių plėšrūnai gali platinti *S. tenella* parazitus. *Sarcocystis arieticanis* atveju, šios rūšies platinime dalyvauja tik rudosios lapės ir pilkieji vilkai. Iki šiol nėra atlikta tyrimų Lietuvoje, kurių metu būtų analizuota rudosios lapės, pilkojo vilko ir usūrinio šuns vaidmens avyse parazituojančių *Sarcocystis* rūšių platinime. Šiame darbe avių audiniuose nustatytos netipinės *S. capracanis* rūšies galutiniu šeimininku gali būti kojotas, pilkasis vilkas, savaninė ir rudoji lapė. Tuo tarpu kitos netipinės

aviems rūšies *S. morae* galutiniu šeimininku eksperimentiškai įrodytas tik naminis šuo. Informacija apie galimus naujus šio tyrimo metu nustatytų *Sarcocystis* rūšių galutinius šeimininkus yra dokumentuota pirmą kartą pasaulio mastu, taip prisidedant prie *Sarcocystis* parazitų duomenų bazės plėtros.

Apibendrinant, šiame darbe pirmą kartą pasaulio mastu nustatyta, jog avyse kaip tarpiniuose šeimininkuose gali parazituoti *S. capracanis* ir *S. morae*. Modifikavus iki šiol naudotą metileno mėliu dažytų raumeninių iškarpų kompresorinį–mikroskopinį metodą ir optimizavus tolimesnį gDNR skyrimą iš pavienių izoliuotų sarkocistų, užtikrinamas *Sarcocystis* rūšių identifikavimas. Taip pat pirmą kartą pasaulyje dokumentuota, jog rudoji lapė gali būti *S. arieticanis* ir *S. morae* rūšių, pilkasis vilkas – *S. arieticanis*, *S. capracanis* ir *S. tenella* rūšių, o usūrinis šuo – *S. morae* bei *S. tenella* rūšių galutiniais šeimininkais.

IŠVADOS

1. Be tipinių *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių, šiame darbe pirmą kartą pasaulio mastu aptiktos avims kaip tarpiniams šeimininkams netipinės *S. capracanis*, *S. capreolicanis*, *S. hjorti*, *S. linearis* ir *S. morae* rūšys.
2. Kombinuojant kompresorinį–mikroskopinį metileno mėliu dažytų raumeninių išskarpų metodą su molekuline analize, naminių avių audiniuose nustatytos *S. arieticanis* ir *S. tenella* rūšių sarkocistos.
3. Rudoji lapė, pilkasis vilkas ir usūrinis šuo yra svarbūs avis infekuojančių *Sarcocystis* rūšių platintojai Lietuvoje. Dauguma tirtų rūšių šiuose galutiniuose šeimininkuose aptiktos pirmą kartą pasaulyje.

ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Tyrimo metu atlikau visus laboratorinius darbus, išskyrus šuninių šeimos plėšrūnų žarnyno nuograndų paruošimą bei gDNR skyrimą iš paruoštų plėšrūnų mėginių. Atlikau tyrimo metu gautų rezultatų statistinę analizę, prisidėjau prie darbo tikslo ir uždavinių formavimo, tyrimo planavimo ir išvadų formulavimo.

PADĖKA

Norėčiau padėkoti darbo vadovui dr. Petrui Prakui už pasitikėjimą, suteiktus patarimus, palaikymą, įgūdžių formavimą ir suformuotą itin pozityvų požiūrį į mokslą. Dėkoju Gamtos tyrimų centro Molekulinės ekologijos laboratorijos vadovui dr. (HP) Daliui Butkauskui už suteiktą galimybę atlikti praktiką ir gilinti žinias šioje laboratorijoje.

Esu labai dėkingas dr. Evelinai Juozaitytei-Ngugu už medžiagos surinkimą ir pagalbą mokantis taikyti mikroskopinius metodus tyrimuose, dr. Donatui Šneideriui už visokeriopą pagalbą, vertingus patarimus ir pozityvią darbo atmosferą. Taip pat norėčiau padėkoti biologei Evelinai Maziliauskaitei už atliktą mėginių sekoskaitą. Ačiū visam Molekulinės ekologijos laboratorijos kolektyvui už bendradarbiavimą, komandinį iškilusių problemų sprendimą ir geranoriškumą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abbas, S. S., & Dijkstra, T. M. H. (2020). Detection and stage classification of *Plasmodium falciparum* from images of Giemsa stained thin blood films using random forest classifiers. *Diagnostic Pathology*, 15(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-01040-9>
- Abdullah, S. H. (2021). Investigation of *Sarcocystis* spp. in slaughtered cattle and sheep by peptic digestion and histological examination in Sulaimani Province, Iraq. *Veterinary World*, 14(2), 468–474. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.468-474>
- Abdul-Rahman, S. M., Rashad, S. M., & Doma, M. A. (2002). Human muscle sarcocystosis in relation to non-specific rheumatic diseases and rheumatoid arthritis. *Egypt Rheumatol Rehabil*, 29(29), 743–753.
- AbuBakar, S., Teoh, B. T., Sam, S. S., Chang, L. Y., Johari, J., Hooi, P. S., Lakhbeer-Singh, H. K., Italiano, C. M., Omar, S. F. S., Wong, K. T., Ramli, N., & Tan, C. T. (2013). Outbreak of human infection with *Sarcocystis nesbitti*, Malaysia, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 1989–1991. <https://doi.org/10.3201/eid1912.120530>
- Al Quraishy, S., Morsy, K., Bashtar, A. R., Ghaffar, F. A., & Mehlhorn, H. (2014). *Sarcocystis arieticanis* (Apicomplexa: Sarcocystidae) infecting the heart muscles of the domestic sheep, *Ovis aries* (Artiodactyla: Bovidae), from K. S. A. on the basis of light and electron microscopic data. *Parasitology Research*, 113(10), 3823–3831. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4050-2>
- Amairia, S., Amdouni, Y., Rouatbi, M., Rjeibi, M. R., Awadi, S., & Gharbi, M. (2018). First detection and molecular identification of *Sarcocystis* spp. in small ruminants in North-West Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 441–446. <https://doi.org/10.1111/tbed.12722>
- Arness, M. K., Brown, J. D., Dubey, J. P., 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(4), 548–553. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.548>
- Bacci, C., Vismarra, A., Passeri, B., Sciarrone, F., Mangia, C., Genchi, M., Fabbi, M., Vicari, N., Bruini, I., Brindani, F., & Kramer, L. (2016). Detection of *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis tenella* in indigenous Cornigliese sheep in Italy using serological and molecular methods. *Small Ruminant Research*, 135, 13–16. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.025>
- Bahari, P., Salehi, M., Seyedabadi, M., & Mohammadi, A. (2014). Molecular identification of macroscopic and microscopic cysts of *Sarcocystis* in sheep in North Khorasan province, Iran. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 3(1), 51–56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927390/>
- Balčiauskas, L. (1996). Lithuanian mammal fauna review. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 8(1–2). <https://doi.org/10.4404/hystrix-8.1-2-4087>
- Baltrūnaitė, L. (2002). Diet composition of the red fox (*Vulpes vulpes*), pine marten (*Martes martes*), and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides* gray) in clay plain landscape, Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*, 12(4), 362–368. <https://doi.org/10.1080/13921657.2002.10512525>
- Baltrūnaitė, L., Balčiauskas, L., & Åkesson, M. (2013). The genetic structure of the Lithuanian wolf population. *Open Life Sciences*, 8(5), 440–447. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0154-9>
- Basso, W., Alvarez-Rojas, C. A., Buob, D., Ruetten, M., & Deplazes, P. (2020). *Sarcocystis* infection in red deer (*Cervus elaphus*) with eosinophilic myositis/fasciitis in Switzerland and involvement of red foxes (*Vulpes vulpes*) and hunting dogs in the transmission. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 13, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.09.005>

- Bezerra, T. L., Soares, R. M., & Gondim, L. F. P. (2023). *Sarcocystis* species (Apicomplexa, Eucoccidiorida) parasitizing snakes. *Parasitologia*, 3(4), 327–347. <https://doi.org/10.3390/parasitologia3040032>
- Bittencourt, M. V., Meneses, I. D. S., Ribeiro-Andrade, M., De Jesus, R. F., De Araújo, F. R., & Gondim, L. F. P. (2016). *Sarcocystis* spp. in sheep and goats: frequency of infection and species identification by morphological, ultrastructural, and molecular tests in Bahia, Brazil. *Parasitology Research*, 115(4), 1683–1689. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4909-5>
- Blazejewski, T., Nursimulu, N., Pszeny, V., Dangoudoubiyam, S., Namasivayam, S., Chiasson, M. A., Chessman, K., Tonkin, M., Swapna, L. S., Hung, S. S., Bridgers, J., Ricklefs, S. M., Boulanger, M. J., Dubey, J. P., Porcella, S. F., Kissinger, J. C., Howe, D. K., Grigg, M. E., & Parkinson, J. (2015). Systems-based analysis of the *Sarcocystis neurona* genome identifies pathways that contribute to a heteroxenous life cycle. *mBio*, 6(1), e02445-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02445-14>
- Bridger, K. E., & Whitney, H. (2009). Gastrointestinal parasites in dogs from the island of St. Pierre off the south coast of Newfoundland. *Veterinary Parasitology*, 162(1–2), 167–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.016>
- Castañeda, I., Doherty, T. S., Fleming, P. A., Stobo-Wilson, A. M., Woinarski, J. C. Z., & Newsome, T. M. (2022). Variation in red fox *Vulpes vulpes* diet in five continents. *Mammal Review*, 52(3), 328–342. <https://doi.org/10.1111/mam.12292>
- Castro-Forero, S. P., Bulla-Castañeda, D. M., López Buitrago, H. A., Díaz Anaya, A. M., Madeira De Carvalho, L. M., & Pulido-Medellín, M. O. (2022). *Sarcocystis* spp., a parasite with zoonotic potential. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 25(2), 175–186. <https://doi.org/10.15547/bjvm.2019-0129>
- Choi, T. I., Hong, E. J., Ryu, S. Y., Sim, C., Chae, J. S., Kim, H. C., Park, J., Choi, K. S., Yu, D. H., Yoo, J. G., & Park, B. K. (2018). Detection and identification of *Sarcocystis cruzi* (Protozoa: Apicomplexa) by molecular and ultrastructural studies in naturally infected Korean cattle (*Bos taurus coreanae*) from Daejeon, Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 56(2), 121–127. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.2.121>
- Da Silva, R. C., Su, C., & Langoni, H. (2009). First identification of *Sarcocystis tenella* (Railliet, 1886) Moulé, 1886 (Protozoa: Apicomplexa) by PCR in naturally infected sheep from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 165(3–4), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.016>
- Dahmani, A., Aissi, M., Zenia, S., Harhoura, K., Kadour, R., & Saadi, A. (2020). Morphometric study of microscopic cysts of *Sarcocystis* sp. in sheep carcasses. *Folia Veterinaria*, 64(3), 38–46. <https://doi.org/10.2478/fv-2020-0025>
- Dakhil, H.-G., Abdallah, H., & Abdullah, F.-A. (2017). Molecular identification of *Sarcocystis fusiformis* and *S. moulei* infecting water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Iraq. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(3), 215–229.
- Dessi, G., Tamponi, C., Pasini, C., Porcu, F., Meloni, L., Cavallo, L., Sini, M. F., Knoll, S., Scala, A., & Varcasia, A. (2022). A survey on Apicomplexa protozoa in sheep slaughtered for human consumption. *Parasitology Research*, 121(5), 1437–1445. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07469-9>
- Diao, Y., Zhao, Q., Weng, Y., Huang, Z., Wu, Y., Gu, B., Zhao, Q., & Wang, F. (2022). Predicting current and future species distribution of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Shanghai, China. *Landscape and Urban Planning*, 228, 104581. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2022.104581>

- Dong, H., Su, R., Wang, Y., Tong, Z., Zhang, L., Yang, Y., & Hu, J. (2018). *Sarcocystis* species in wild and domestic sheep (*Ovis ammon* and *Ovis aries*) from China. *BMC Veterinary Research*, *14*(1), 377. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1712-9>
- Dubey, J. P. (1983). Experimental infections of *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis tenella*, *Sarcocystis capracanis* and *Toxoplasma gondii* in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Journal of Wildlife Diseases*, *19*(3), 200–203. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-19.3.200>
- Dubey, J. P. (1998). Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, *74*(1), 75–77. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00135-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00135-0)
- Dubey, J. P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B. M., Speer, C. A., & Fayer, R. (2015a). *Sarcocystosis of animals and humans*. CRC Press.
- Dubey, J. P., Van Wilpe, E., Calero-Bernal, R., Verma, S. K., & Fayer, R. (2015b). *Sarcocystis heydorni*, n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae) with cattle (*Bos taurus*) and human (*Homo sapiens*) cycle. *Parasitology Research*, *114*(11), 4143–4147. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4645-2>
- Elmishmishy, B., Al-Araby, M., Abbas, I., & Abu-Elwafa, S. (2018). Genetic variability within isolates of *Sarcocystis* species infecting sheep from Egypt. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *13*, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.07.002>
- El-Morsey, A., Abdo, W., Sultan, K., Elhawary, N. M., & AbouZaid, A. A. (2019). Ultrastructural and molecular identification of the sarcocysts of *Sarcocystis tenella* and *Sarcocystis arieticanis* infecting domestic sheep (*Ovis aries*) from Egypt. *Acta Parasitologica*, *64*(3), 501–513. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00070-8>
- El-Morsey, A., Abdo, W., Zaid, A. A. A., & Sorour, S. S. G. (2021). Morphologic and molecular identification of three macroscopic *Sarcocystis* species infecting domestic sheep (*Ovis aries*) and cattle (*Bos taurus*) in Egypt. *Parasitology Research*, *120*(2), 637–654. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07002-w>
- El-Morsey, A., & Abdo, W. (2024). Recent insights into the morphology, molecular characterization, and tissue localization of the caprine *Sarcocystis* species infecting domestic goats (*Capra hircus*): *Sarcocystis moulei*, *Sarcocystis capracanis*, and *Sarcocystis hircicanis*. *Parasitology Research*, *123*(1), 55. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-08063-3>
- Elshahawy, I. S., Fawaz, M., Gomaa, A., & Mohammed, E. (2023). Prevalence and first molecular identification of *Sarcocystis* species in feces of domestic dogs (*Canis familiaris*) in Egypt. *BMC Veterinary Research*, *19*(1), 278. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03841-8>
- Erber, M. (1982). Life cycle of *Sarcocystis tenella* in sheep and dog. *Zeitschrift Für Parasitenkunde Parasitology Research*, *68*(2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/BF00935058>
- Esposito, D. H., Freedman, D. O., Neumayr, A., & Parola, P. (2012). Ongoing outbreak of an acute muscular *Sarcocystis*-like illness among travelers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011–2012. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, *17*(45), 20310. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4620707/>
- Farhang-Pajuh, F., Yakhchali, M., & Mardani, K. (2014). Molecular determination of abundance of infection with *Sarcocystis* species in slaughtered sheep of Urmia, Iran. *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, *5*(3), 181–186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279651/>
- Fayer, R. (2004). *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(4), 894–902. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.894-902.2004>

- Fayer, R., Esposito, D. H., & Dubey, J. P. (2015). Human infections with *Sarcocystis* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 295–311. <https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14>
- Feng, Y., Guo, R., Sang, X., Zhang, X., Li, M., Li, X., Yang, N., & Jiang, T. (2023). A systematic meta-analysis of global *Sarcocystis* infection in sheep and goats. *Pathogens*, 12(7), 902. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070902>
- Ferretti, F., Lovari, S., Mancino, V., Burrini, L., & Rossa, M. (2019). Food habits of wolves and selection of wild ungulates in a prey-rich Mediterranean coastal area. *Mammalian Biology*, 99, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2019.10.008>
- Fleming, P. J. S., Nolan, H., Jackson, S. M., Ballard, G.-A., Bengsen, A., Brown, W. Y., Meek, P. D., Mifsud, G., Pal, S. K., & Sparkes, J. (2017). Roles for the Canidae in food webs reviewed: Where do they fit? *Food Webs*, 12, 14–34. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2017.03.001>
- Formisano, P., Aldridge, B., Alony, Y., Beekhuis, L., Davies, E., Del Pozo, J., Dunn, K., English, K., Morrison, L., Sargison, N., Seguino, A., Summers, B. A., Wilson, D., Milne, E., & Beard, P. M. (2013). Identification of *Sarcocystis capracanis* in cerebrospinal fluid from sheep with neurological disease. *Veterinary Parasitology*, 193(1–3), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.016>
- Fukuyo, M., Battsetseg, G., & Byambaa, B. (2002). Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 33(3), 490–495.
- Gjerde, B. (2013). Phylogenetic relationships among *Sarcocystis* species in cervids, cattle, and sheep inferred from the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 43(7), 579–591. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.004>
- Gjerde, B. (2014). Molecular characterisation of *Sarcocystis rileyi* from a common eider (*Somateria mollissima*) in Norway. *Parasitology Research*, 113(9), 3501–3509. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4062-y>
- Gjerde, B., De La Fuente, C., Alunda, J. M., & Luzón, M. (2020). Molecular characterisation of five *Sarcocystis* species in domestic sheep (*Ovis aries*) from Spain. *Parasitology Research*, 119(1), 215–231. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06504-6>
- Gokpinar, S., Yildiz, K., & Gurcan, I. S. (2014). Prevalence and concentration of *Sarcocystis* spp. microscopic cysts in sheep muscles using percoll gradient centrifugation. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 69(2), 16–19.
- Grikienienė, J., & Kutkienė, L. (1998). New experimental data on the laboratory rat as a definitive host of *Sarcocystis rodentifelis*. *Acta Zoologica Lituanica*, 8(1), 121–124. <https://doi.org/10.1080/13921657.1998.10541451>
- Gual, I., Bartley, P. M., Katzer, F., Innes, E. A., Cantón, G. J., & Moore, D. P. (2017). Molecular confirmation of *Sarcocystis gigantea* in a naturally infected sheep in Argentina: A case report. *Veterinary Parasitology*, 248, 25–27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.017>
- Harris, V. C., Van Vugt, M., Aronica, E., De Bree, G. J., Stijnis, C., Goorhuis, A., & Grobusch, M. P. (2015). Human extraintestinal sarcocystosis: What we know, and what we don't know. *Current Infectious Disease Reports*, 17(8), 42. <https://doi.org/10.1007/s11908-015-0495-4>
- Haziroglu, R., Guvenc, T., & Tunca, R. (2002). Electron microscopical studies on cysts of *Sarcocystis arieticanis* within cardiac muscle of naturally infected sheep. *Parasitology Research*, 89(1), 23–25. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0549-4>
- Heydorn, A. O., & Mehlhorn, H. (1987). Fine structure of *Sarcocystis arieticanis* Heydorn, 1985 in its intermediate and final hosts (sheep and dog). *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und*

- Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 264(3–4), 353–362. [https://doi.org/10.1016/S0176-6724\(87\)80056-1](https://doi.org/10.1016/S0176-6724(87)80056-1)
- Hong, E. J., Sim, C., Chae, J. S., Kim, H. C., Park, J., Choi, K. S., Yu, D. H., Park, C. H., Yoo, J. G., & Park, B. K. (2016). Ultrastructural and molecular identification of *Sarcocystis tenella* (Protozoa, Apicomplexa) in naturally infected Korean native goats. *Veterinárni Medicína*, 61(7), 374–381. <https://doi.org/10.17221/93/2015-VETMED>
- Hu, J.-J., Huang, S., Wen, T., Esch, G. W., Liang, Y., & Li, H.-L. (2017). *Sarcocystis* spp. in domestic sheep in Kunming city, China: Prevalence, morphology, and molecular characteristics. *Parasite*, 24, 30. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017025>
- Hussein, S., Ibrahim, A., & Shukur, M. (2023). Histopathology and molecular identification of *Sarcocystis* species in slaughtered sheep and goats of Duhok Iraq. *Veterinary Research Forum, Online First*. <https://doi.org/10.30466/vrf.2023.559514.3575>
- Jäkel, T., Raisch, L., Richter, S., Wirth, M., Birenbaum, D., Ginting, S., Khoprasert, Y., Mackenstedt, U., & Wassermann, M. (2023). Morphological and molecular phylogenetic characterization of *Sarcocystis kani* sp. nov. and other novel, closely related *Sarcocystis* spp. infecting small mammals and colubrid snakes in Asia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 22, 184–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.10.005>
- Janeiro-Otero, A., Newsome, T. M., Van Eeden, L. M., Ripple, W. J., & Dormann, C. F. (2020). Grey wolf (*Canis lupus*) predation on livestock in relation to prey availability. *Biological Conservation*, 243, 108433. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108433>
- Januškevičius, V., Januškevičienė, G., Prakas, P., Butkauskas, D., & Petkevičius, S. (2019). Prevalence and intensity of *Sarcocystis* spp. infection in animals slaughtered for food in Lithuania. *Veterinárni Medicína*, 64(4), 149–157. <https://doi.org/10.17221/151/2017-VETMED>
- Jasiulionis, M., Stirkė, V., & Balčiauskas, L. (2023). The distribution and activity of the invasive raccoon dog in Lithuania as found with country-wide camera trapping. *Forests*, 14(7), 1328. <https://doi.org/10.3390/f14071328>
- Kalantari, N., Khaksar, M., Ghaffari, S., & Hamidekish, S. M. (2016). Molecular analysis of *Sarcocystis* spp. isolated from sheep (*Ovis aries*) in Babol area, Mazandaran province, Northern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 11(1), 73–80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835472/>
- Kauhala, K., & Kowalczyk, R. (2011). Invasion of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* in Europe: history of colonization, features behind its success, and threats to native fauna. *Current Zoology*, 57(5), 584–598. <https://doi.org/10.1093/czoolo/57.5.584>
- Khanna, V., Tilak, K., Rasheed, S., & Mukhopadhyay, C. (2014). Identification and preservation of intestinal parasites using methylene blue-glycerol mount: A new approach to stool microscopy. *Journal of Parasitology Research*, 2014, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/672018>
- Kirillova, V., Prakas, P., Calero-Bernal, R., Gavarāne, I., Fernández-García, J. L., Martínez-González, M., Rudaitytė-Lukošienė, E., Martínez-Estélez, M. Á. H., Butkauskas, D., & Kirjušina, M. (2018). Identification and genetic characterization of *Sarcocystis arctica* and *Sarcocystis lutrae* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Baltic States and Spain. *Parasites & Vectors*, 11(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2694-y>
- Kjær, L. J., Jensen, L. M., Chriél, M., Bødker, R., & Petersen, H. H. (2021). The raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) as a reservoir of zoonotic diseases in Denmark. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 16, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.09.008>

- Kolenda, R., Schierack, P., Zieba, F., Zwijacz-Kozica, T., & Bednarski, M. (2015). First molecular characterization of *Sarcocystis tenella* in Tatra chamois (*Rupicapra rupicapra tatrica*) in Poland. *Parasitology Research*, *114*(10), 3885–3892. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4619-4>
- Lau, Y. L., Chang, P. Y., Tan, C. T., Fong, M. Y., Mahmud, R., & Wong, K. T. (2014). *Sarcocystis nesbitti* infection in human skeletal muscle: Possible transmission from snakes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(2), 361–364. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0678>
- Lee, F. C. H., & Muthu, V. (2021). From 18S to 28S rRNA gene: An improved targeted Sarcocystidae PCR amplification, species identification with long DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *104*(4), 1388–1393. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0767>
- Levine, N. D. (1986). The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, apicomplexa) species. *The Journal of Parasitology*, *72*(3), 372–382.
- Light, J. E., Eckerlin, R. P., & Durden, L. A. (2019). Checklist of ectoparasites of Canidae and Felidae in Mexico. *Therya*, *10*(2), 109–119. <https://doi.org/10.12933/therya-19-784>
- Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (1999). Determination of the activity of pyrimethamine, trimethoprim, sulfonamides, and combinations of pyrimethamine and sulfonamides against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Veterinary Parasitology*, *82*(3), 205–210. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00020-5)
- Lindsay, D.-S., Blagburn, B.-L., & Braund, K.-G. (1995). *Sarcocystis* spp. and sarcocystosis. *BAM*, *5*(3), 249–254. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1573105976162942720>
- Máca, O. (2020). Molecular identification of *Sarcocystis lutrae* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, and the common raccoon, *Procyon lotor*, in the Czech Republic. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04108-z>
- Mahran, O. M. (2009). *Sarcocystis* infection in sheep and goats slaughtered in Shalatin abattoir, Red Sea governorate, Egypt. *Assiut Veterinary Medical Journal*, *55*(121), 1–15. <https://doi.org/10.21608/avmj.2009.174646>
- Marandykina-Prakienė, A., Butkauskas, D., Gudiškis, N., Juozaitytė-Ngugu, E., Januškevičius, V., Rudaitytė-Lukošienė, E., & Prakas, P. (2022). Molecular identification of *Sarcocystis* species in sheep from Lithuania. *Animals*, *12*(16), 2048. <https://doi.org/10.3390/ani12162048>
- Mateo, J. A., & Pleguezuelos, J. M. (2015). Cannibalism of an endemic island lizard (*Genus gallotia*). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, *259*, 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2015.07.003>
- Matuschka, F.-R., & Bannert, B. (1987). Cannibalism and autotomy as predator-prey relationship for monoxenous sarcosporidia. *Parasitology Research*, *74*(1), 88–93. <https://doi.org/10.1007/BF00534938>
- Mavi, S. A., Teimouri, A., Mohebal, M., Yazdi, M. K. S., Shojaee, S., Rezaian, M., Salimi, M., & Keshavarz, H. (2020). *Sarcocystis* infection in beef and industrial raw beef burgers from butchereries and retail stores: a molecular microscopic study. *Heliyon*, *6*(6), e04171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04171>
- McKenna, P. B., & Charleston, W. A. G. (1992). The survival of *Sarcocystis gigantea* sporocysts following exposure to various chemical and physical agents. *Veterinary Parasitology*, *45*(1–2), 1–16. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90023-3)
- Mekibib, B., Abdisa, D., Denbarga, Y., & Abebe, R. (2019). Muscular *Sarcocystis* infection in ruminants slaughtered at Municipality abattoir and selected hotels in Hawassa city, Southern

- Ethiopia: Prevalence and associated risk factors. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100333. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100333>
- Metwally, D. M., Al-Damigh, M. A., Al-Turaiki, I. M., & El-Khadragy, M. F. (2019). Molecular characterization of *Sarcocystis* species isolated from sheep and goats in Riyadh, Saudi Arabia. *Animals*, 9(5), 256. <https://doi.org/10.3390/ani9050256>
- Mierzejewska, E. J., Dwużnik, D., Koczwarska, J., Stańczak, Ł., Opalińska, P., Krokowska-Paluszak, M., Wierzbicka, A., Górecki, G., & Bajer, A. (2021). The red fox (*Vulpes vulpes*), a possible reservoir of *Babesia vulpes*, *B. canis*, and *Hepatozoon canis*, and its association with the tick *Dermacentor reticulatus* occurrence. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(1), 101551. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101551>
- Minuzzi, C. E., Cezar, A. S., Bräunig, P., Portella, L. P., Rodrigues, F. D. S., Sangioni, L. A., & Vogel, F. S. F. (2019). Occurrence of *Sarcocystis gigantea* macrocysts and high frequency of *S. tenella* microcysts in sheep from southern Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 15, 100256. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.12.002>
- Mohd Fadil, N. F., Tengku-Idris, T. I. N., Shahari, S., Fong, M. Y., & Lau, Y. L. (2019). Molecular evidence of *Sarcocystis* species infecting reptiles in peninsular Malaysia. *Iranian Journal of Parasitology*, 14(4), 623–630.
- Munday, B. L., Barker, I. K., & Rickard, M. D. (1975). The developmental cycle of a species of *Sarcocystis* occurring in dogs and sheep, with observations on pathogenicity in the intermediate host. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde*, 46(2), 111–123. <https://doi.org/10.1007/BF00389952>
- Munday, B. L., & Obendorf, D. L. (1984). Development and growth of *Sarcocystis gigantea* in experimentally-infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 15(3–4), 203–211. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(84\)90072-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90072-4)
- Muthusamy, T., Thong, H. K., Sabir Husin Athar, P. P., & Daud, A. (2022). Unusual site of oral sarcocystosis in the tongue. *Cureus*, 14(6), e25912. <https://doi.org/10.7759/cureus.25912>
- Nawshirwan, S., Heucken, N., Piekarek, N., Van Beers, T., Fulgham-Scott, N., Grandoch, A., Neiss, W. F., Vogt, J., & Barham, M. (2023). Morphological, ultrastructural, genetic characteristics and remarkably low prevalence of macroscopic *Sarcocystis* species isolated from sheep and goats in Kurdistan region, Iraq. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1225796. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1225796>
- Ng, Y. H., Fong, M. Y., Subramaniam, V., Shahari, S., & Lau, Y. L. (2015). Short communication: Genetic variants of *Sarcocystis cruzi* in infected Malaysian cattle based on 18S rDNA. *Research in Veterinary Science*, 103, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.10.009>
- Nimri, L. (2014). Unusual case presentation of intestinal *Sarcocystis hominis* infection in a healthy adult. *JMM Case Reports*, 1(4). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.T00019>
- Nourollahi Fard, S. R., Asghari, M., & Nouri, F. (2009). Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 41(8), 1633–1636. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9358-z>
- Otranto, D., Cantacessi, C., Pfeffer, M., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Deplazes, P., Genchi, C., Guberti, V., & Capelli, G. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe. *Veterinary Parasitology*, 213(1–2), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.022>
- Padilla, L. R., & Hilton, C. D. (2015). Canidae. In *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine, Volume 8* (pp. 457–467). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-7397-8.00046-3>

- Pan, J., Ma, C., Huang, Z., Ye, Y., Zeng, H., Deng, S., Hu, J., & Tao, J. (2020). Morphological and molecular characterization of *Sarcocystis wenzeli* in chickens (*Gallus gallus*) in China. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 512. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04390-x>
- Peris, M. P., Gracia, M. J., Moreno, B., Juan-Puente, P., Morales, M., Serrano, M., Manzano, M. D., Halaihel, N., Badiola, J., & Castillo, J. A. (2024). Identification of *Sarcocystis* spp. in slaughtered sheep from Spain and evaluation of bradyzoite viability after freezing. *Veterinary Sciences*, *11*(3), 103. <https://doi.org/10.3390/vetsci11030103>
- Pestechian, N., Yousefi, H. A., Kalantari, R., Jafari, R., Khamesipour, F., Keshtkar, M., & Esmailifallah, M. (2021). Molecular and microscopic investigation of *Sarcocystis* species isolated from sheep muscles in Iran. *Journal of Food Quality*, *2021*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/5562517>
- Phythian, C., Jackson, B., Bell, R., Citer, L., Barwell, R., & Windsor, P. (2018). Abattoir surveillance of *Sarcocystis* spp., *Cysticercosis ovis* and *Echinococcus granulosus* in Tasmanian slaughter sheep, 2007–2013. *Australian Veterinary Journal*, *96*(3), 62–68. <https://doi.org/10.1111/avj.12670>
- Pipia, A. P., Varcasia, A., Zidda, A., Dessì, G., Panzalis, R., Tamponi, C., Marrosu, R., Tosciri, G., Sanna, G., Dore, F., Chiesa, F., & Scala, A. (2016). Cross-sectional investigation on sheep sarcosporidiosis in Sardinia, Italy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *3–4*, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.05.004>
- Portella, L. P., Fernandes, F. D., Rodrigues, F. D. S., Minuzzi, C. E., Sangioni, L. A., Flores, M. M., & Vogel, F. S. F. (2021). Macroscopic, histological, and molecular aspects of *Sarcocystis* spp. infection in tissues of cattle and sheep. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *30*(3), e003621. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612021050>
- Poulsen, C. S., & Stensvold, C. R. (2014). Current status of epidemiology and diagnosis of human sarcocystosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(10), 3524–3530. <https://doi.org/10.1128/JCM.00955-14>
- Powell, E. C., Pezeshkpour, G., Dubey, J. P., & Fayer, R. (1986). Types of myofibers parasitized in experimentally induced infections with *Sarcocystis cruzi* and *Sarcocystis capracanis*. *American Journal of Veterinary Research*, *47*(3), 514–517.
- Pozio, E., & Rosa, G. L. (2002). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. *PCR Detection of Microbial Pathogens*, *216*, 299–310. <https://doi.org/10.1385/1-59259-344-5:299>
- Prakas, P., & Butkauskas, D. (2012). Protozoan parasites from genus *Sarcocystis* and their investigations in Lithuania. *Ekologija*, *58*(1). <https://doi.org/10.6001/ekologija.v58i1.2349>
- Prakas, P., Kirillova, V., Gavarāne, I., Grāvele, E., Butkauskas, D., Rudaitytė-Lukošienė, E., & Kirjušina, M. (2019). Morphological and molecular description of *Sarcocystis rattii* n. sp. from the black rat (*Rattus rattus*) in Latvia. *Parasitology Research*, *118*(9), 2689–2694. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06393-9>
- Prakas, P., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Januškevičius, V., Chiesa, F., Baranauskaitė, A., Rudaitytė-Lukošienė, E., Servienė, E., Petkevičius, S., & Butkauskas, D. (2020). Molecular identification of four *Sarcocystis* species in cattle from Lithuania, including *S. hominis*, and development of a rapid molecular detection method. *Parasites & Vectors*, *13*(1), 610. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04473-9>
- Prakas, P., Jasiulionis, M., Šukytė, T., Juozaitytė-Ngugu, E., Stirkė, V., Balčiauskas, L., & Butkauskas, D. (2024). First observations of buzzards (*Buteo*) as definitive hosts of *Sarcocystis* parasites

- forming cysts in the brain tissues of rodents in Lithuania. *Biology*, 13(4), 264. <https://doi.org/10.3390/biology13040264>
- Rad, H., Nourani, H., & Razmi, G. (2020). Histopathological, ultrastructural and molecular examination of *Sarcocystis* spp. in sheep of Mashhad area, Khorasan Razavi Province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology, Online First*. <https://doi.org/10.22067/veterinary.v12i2.88245>
- Rahdar, M., & Kardooni, T. (2017). Molecular identification of *Sarcocystis* spp. in sheep and cattle by PCR-RFLP from southwest of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 10(8). <https://doi.org/10.5812/jjm.12798>
- Rassouli, M., Ahmadpanahi, J., & Alvandi, A. (2014). Prevalence of *Sarcocystis* spp. and *Hammondia* spp. microcysts in esophagus tissue of sheep and cattle, emphasized on their morphological differences. *Parasitology Research*, 113(10), 3801–3805. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4047-x>
- Rosenthal, B. M. (2021). Zoonotic *Sarcocystis*. *Research in Veterinary Science*, 136, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.008>
- Rudaitytė-Lukošienė, E., Delgado De Las Cuevas, G. E., Prakas, P., Calero-Bernal, R., Martínez-González, M., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Servienė, E., Habela, M. A., & Butkauskas, D. (2020). *Sarcocystis* spp. diversity in the roe deer (*Capreolus capreolus*) from Lithuania and Spain. *Parasitology Research*, 119(4), 1363–1370. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06603-9>
- Rudaitytė-Lukošienė, E., Prakas, P., & Butkauskas, D. (2021). Molecular identification of seven *Sarcocystis* species in red deer (*Cervus elaphus*) from Lithuania. *Parasitology International*, 85, 102419. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102419>
- Saito, M., Shibata, Y., Kubo, M., & Itagaki, H. (1997). *Sarcocystis mihoensis* n. sp. from sheep in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 59(2), 103–106. <https://doi.org/10.1292/jvms.59.103>
- Savini, G., Dunsmore, J. D., & Robertson, I. D. (1996). Studies on pathogenesis, tissue infection, and congenital transmission in cows experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* by various routes. *Veterinary Parasitology*, 64(4), 319–327. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00929-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00929-9)
- Scott, D. M., Berg, M. J., Tolhurst, B. A., Chauvenet, A. L. M., Smith, G. C., Neaves, K., Lochhead, J., & Baker, P. J. (2014). Changes in the distribution of red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban areas in Great Britain: findings and limitations of a media-driven nationwide survey. *PLoS ONE*, 9(6), e99059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099059>
- Selonen, V., Brommer, J. E., Holopainen, S., Kauhala, K., Krüger, H., Poutanen, J., Väänänen, V.-M., & Laaksonen, T. (2022). Invasive species control with apex predators: increasing presence of wolves is associated with reduced occurrence of the alien raccoon dog. *Biological Invasions*, 24(11), 3461–3474. <https://doi.org/10.1007/s10530-022-02850-2>
- Shahabi, S., Dehbashi, N., Sarkari, B., Arefkhah, N., Sedaghat, B., & Savardashtaki, A. (2022). Detection and phylogenetic analysis of *Sarcocystis moulei* and *Sarcocystis* spp. (Sarcocystidae: Apicomplexa) from slaughtered sheep in southwest Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 46(1), 215–219. <https://doi.org/10.1007/s12639-021-01433-7>
- Siyadatpanah, A., Pagheh, A. S., Daryani, A., Sarvi, S., Hosseini, S. A., Norouzi, R., Boundenga, L., Tabatabaie, F., Pereira, M. D. L., Gholami, S., & Nissapatorn, V. (2020). Parasitic helminth infections of dogs, wolves, foxes, and golden jackals in Mazandaran Province, North of Iran. *Veterinary World*, 13(12), 2643–2648. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2643-2648>
- Soe, E., Davison, J., Süld, K., Valdmann, H., Laurimaa, L., & Saarma, U. (2017). Europe-wide biogeographical patterns in the diet of an ecologically and epidemiologically important

- mesopredator, the red fox *Vulpes vulpes*: a quantitative review. *Mammal Review*, 47(3), 198–211. <https://doi.org/10.1111/mam.12092>
- Stratford, J. (2015). Golden jackal in Lithuania, a consideration of its arrival, impact, and status. *Zoology and Ecology*, 25(4), 277–287. <https://doi.org/10.1080/21658005.2015.1073894>
- Strazdaitė-Žiėlienė, Ž., Baranauskaitė, A., Butkauskas, D., Servienė, E., & Prakas, P. (2022). Molecular identification of parasitic protozoa *Sarcocystis* in water samples. *Veterinary Sciences*, 9(8), 412. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080412>
- Sudan, V., Kumar, R., Shanker, D., & Paliwal, S. (2019). First report of molecular characterization and phylogenetic analysis of *Sarcocystis tenella* from India. *Parasitology Research*, 118(5), 1429–1434. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06282-1>
- Sun, Y., Ju, J., Su, X., Xie, C., Li, Y., & Kang, M. (2021). Infection survey and morphological characteristics of *Sarcocystis* spp. in naturally infected Tibetan sheep from Qinghai in northwestern China. *Parasitology International*, 80, 102219. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102219>
- Swar, S. O., & Shnawa, B. H. (2020). Ultrastructural and molecular characterization of *Sarcocystis* species derived from macroscopic sarcocysts of domestic sheep and goats in Soran city, Erbil, Iraq. *World's Veterinary Journal*, 540–550. <https://doi.org/10.54203/scil.2020.wvj65>
- Szynwelski, B. E., Kretschmer, R., Matzenbacher, C. A., Ferrari, F., Alievi, M. M., & De Freitas, T. R. O. (2023). Hybridization in canids – a case study of pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) and domestic dog (*Canis lupus familiaris*) hybrid. *Animals*, 13(15), 2505. <https://doi.org/10.3390/ani13152505>
- Šlapeta, J. R., Modrý, D., Votýpka, J., Jirků, M., Koudela, B., & Lukeš, J. (2001). Multiple origin of the dihomoxenous life cycle in Sarcosporidia. *International Journal for Parasitology*, 31(4), 413–417. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00127-8)
- Špinkytė-Bačkaitienė, R., & Adeikis, P. (2022). The part of livestock and pets in wolf diet in Lithuania. *Biologija*, 67(4). <https://doi.org/10.6001/biologija.v67i4.4652>
- Taggart, P. L., Stevenson, M. A., Firestone, S. M., McAllister, M. M., & Caraguel, C. G. B. (2019). Spatial analysis of a cat-borne disease reveals that soil pH and clay content are risk factors for sarcocystosis in sheep. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 127. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00127>
- Tenter, A. M. (1995). Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology*, 25(11), 1311–1330. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00068-D](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00068-D)
- Trbojević, I., Penezić, A., Kusak, J., Stevanović, O., & Ćirović, D. (2020). Wolf diet and livestock depredation in North Bosnia and Herzegovina. *Mammalian Biology*, 100(5), 499–504. <https://doi.org/10.1007/s42991-020-00053-7>
- Tylkowska, A., Pilarczyk, B., Pilarczyk, R., Zyśko, M., & Tomza-Marciniak, A. (2019). Presence of tapeworms (Cestoda) in red fox (*Vulpes vulpes*) in north-western Poland, with particular emphasis on *Echinococcus multilocularis*. *Journal of Veterinary Research*, 63(1), 71–78. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0005>
- Verma, S. K., Lindsay, D. S., Grigg, M. E., & Dubey, J. P. (2017). Isolation, Culture and Cryopreservation of *Sarcocystis* species. *Current Protocols in Microbiology*, 45(1). <https://doi.org/10.1002/cpmc.32>
- Veronesi, F., Di Palma, S., Gabrielli, S., Morganti, G., Milardi, G. L., Middleton, B., & Lepri, E. (2020). *Sarcocystis gigantea* infection associated with granulomatous eosinophilic myositis in a

horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(4), 611–615.
<https://doi.org/10.1177/1040638720935847>

- Wang, G.-L., Wei, T., Wang, X.-Y., Li, W.-Y., Zhang, P.-C., Dong, M.-X., & Xiao, H. (1988). The morphology and life cycle of *Sarcocystis microps* n. sp. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 6, 9–11.
- Wasmuth, J., Daub, J., Peregrín-Alvarez, J. M., Finney, C. A. M., & Parkinson, J. (2009). The origins of apicomplexan sequence innovation. *Genome Research*, 19(7), 1202–1213.
<https://doi.org/10.1101/gr.083386.108>
- Wattanakaiwan, V., Sukmak, M., Hamarit, K., Kaolim, N., Wajjwalku, W., & Muangkram, Y. (2017). Molecular characterization of the ribosomal DNA unit of *Sarcocystis singaporensis*, *Sarcocystis zamani* and *Sarcocystis zuoi* from rodents in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(8), 1412–1418. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0086>
- Wünschmann, A., Rejmanek, D., Cruz-Martinez, L., & Barr, B. C. (2009). *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(2), 283–287. <https://doi.org/10.1177/104063870902100223>
- Xiang, Z., Chen, X., Yang, L., He, Y., Jiang, R., Rosenthal, B. M., Luan, P., Attwood, S. W., Zuo, Y., Zhang, Y., & Yang, Z. (2009). Non-invasive methods for identifying oocysts of *Sarcocystis* spp. from definitive hosts. *Parasitology International*, 58(3), 293–296.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.03.004>
- Xue, R., Yan, W., Qian, W., Wang, T., Zhang, M., Wei, Z., Han, L., He, B., & Dou, J. (2019). Prevalence and molecular characterization of *Sarcocystis* infections of retail beef products from central China. *Acta Tropica*, 190, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.015>
- Zhu, Z., Chen, Y., Yang, X., Wang, L., Liu, Q., & Liu, J. (2022). Molecular detection and identification of three intracellular parasites of retail mutton products in Beijing, China. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1018788. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1018788>

PRIEDAI

1 priedas

1 lentelė. Iš avių raumeninių audinių išskirtų sarkocistų dydžiai

Izoliatas	Vidutinis išskirtų sarkocistų dydis	Tikėtasi identifikuoti rūšis
72D	145,03–891,91×14,26–92,39 μm (310,39±237,8×46,74±29,39 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
111D	115,37–231,09×42,88–76,04 μm (184,91±47,11×60,88±12,68 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
113D	35,2–310,67×12,1–80,81 μm (133,54±74,52×33,16±14,26 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
117D	140,47–240,55×30,16–94,8 μm (190,88±37,29×53,39±20,17 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
78E	92,2–330,4×22,12–121,91 μm (197,74±67,54×55,51 ± 28,79 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
88E	120,3–361,23×19,13–140,31 μm (215,36±78,97×57,56±35,1 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
95E	118,81–256,51×37,15–75,28 μm (202,96±46,43×63,63±14,25 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
97E	40,3–302,12×12,3–84,21 μm (120,42±56,52×36,28±10,26 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>
112E	113,4–258,51×21,2–77,28 μm (192,01±53,74×58,57±20,23 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
114E	30,3–334,67×12,1–91,23 μm (100,34±54,52×54,23±10,25 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
67H	118,81–230,44×39,5–77,28 μm (185,33±46,73×61,56±14,9 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
92H	140,47–278,4×30,16–74,61 μm (197,10±46,6×54,29±14,86 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
106H	66,8–290,57×20,3–59,21 μm (100,54±34,24×35,65±10,33 μm; n = 10)	<i>S. capracanis</i>
118H	36,3–312,77×9,1–88,81 μm (138,54±76,52×34,16±18,26 μm; n = 10)	<i>S. morae</i>