



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Modestas Petrauskas

**Vienaląsčių pirmuonių identifikavimas vandens mėginiuose ir
jų gyvybingumo analizė skirtingais metų laikais**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Živilė Strazdaitė-Žielienė

Darbas atliktas

Valstybiniame mokslinių tyrimų institute Gamtos
tyrimų centre, Genetikos laboratorijoje

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas	5
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Vienaląsčiai pirmuonys vandens ekosistemoje	7
1.2. Vienaląsčiai pirmuonys ir jų gyvybinis ciklas	8
1.3. <i>Sarcocystis</i> spp. patogeniškumas	9
1.4. Sporocistų struktūra ir atsparumas aplinkos sąlygoms	11
1.5. <i>Sarcocystis</i> spp. identifikavimas morfologiniais ir molekuliniiais metodais	12
1.6. Kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (qPGR) panaudojimas vienaląsčių pirmuonių tyrimuose	15
1.7. Mikroorganizmų gyvybingumo nustatymo metodai	18
2. Medžiagos ir metodai	21
2.1. Medžiagos	21
2.1.1. Darbe naudota įranga	21
2.1.2. Darbe naudoti bakterijų kamienai ir plazmidiniai vektoriai	21
2.1.3. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės	21
2.1.4. Pradmenys	22
2.1.5. Naudoti rinkiniai ir reagentai	22
2.1.6. Restrikcijos endonukleazės	23
2.2. Metodai	23
2.2.1. Vandens mėginių surinkimas	23
2.2.2. <i>Sarcocystis</i> spp. sporocistų išskyrimas iš vandens mėginių filtravimo ir koncentravimo metodu	24
2.2.3. PMA gyvybingumo testas	24
2.2.4. Genominės DNR išskyrimas	24
2.2.5. Polimerazės grandininė reakcija	25
2.2.6. Lizdinė polimerazės grandininė reakcija	25
2.2.7. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje	26
2.2.8. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio	26
2.2.9. Plazmidinių vektorių konstravimas naudojant <i>CloneJET</i> PGR klonavimo rinkinį	26
2.2.10. Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas ir transformacija	26
2.2.11. Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų	27
2.2.12. DNR restrikcinė analizė	28
2.2.13. Filogenetinė analizė	28
2.2.14. Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (qPGR)	28
3. Rezultatai ir jų aptarimas	30
3.1. Vandens mėginių analizė	30
3.2. Vienaląsčių pirmuonių identifikavimas vandens mėginiuose	31
3.3. Vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo kaita skirtingomis temperatūros sąlygomis	36
3.4. <i>Sarcocystis</i> rūšių paplitimo įvertinimas skirtingais metų mėnesiais lizdinio PGR metodu	39
3.5. <i>Sarcocystis</i> rūšių gDNR koncentracijos įvertinimas qPGR metodu	41
3.6. Gautų duomenų apibendrinimas ir analizė	45

Išvados	49
Santrauka	50
Abstract	51
Padėka	52
Literatūros sąrašas	53
Priedai	63
Priedas A. Mokslinių pasiekimų sąrašas	64
Priedas B. Publikacijos sertifikatas 2026	65
Priedas C. Mokslinio straipsnio santrauka 2026	66
Priedas D. Mokslinio straipsnio santrauka 2025	67
Priedas E. Tarptautinės konferencijos „The COINS 2025“ sertifikatas	68
Priedas F. Tarptautinės konferencijos „FEBS3+ Baltics“ sertifikatas	69

Santrumpos

BEM	–	galvijų eozinofilinis miozitas (angl., <i>Bovine Eosinophilic Myositis</i>).
<i>cox1</i>	–	citochromo c oksidazės I subvieneto genas.
Ct	–	slenkstinis ciklas (angl., <i>threshold cycle</i>).
eDNR	–	aplinkos deoksiribonukleorūgštis (angl., <i>environmental DNA</i>).
ELISA	–	imunofermentinė analizė (angl., <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).
EMA	–	etidžio monoazidas (angl., <i>ethidium monoazide</i>).
EPM	–	arklių pirmuonių sukeltas mielencefalitas (angl., <i>Equine Protozoal Myeloencephalitis</i>).
gDNR	–	genominė deoksiribonukleorūgštis.
ITS	–	vidinis transkribuojamas tarpiklis (angl., <i>internal transcribed spacer</i>).
pDNR	–	plazmidinė deoksiribonukleorūgštis.
PMA	–	propidžio monoazidas (angl., <i>propidium monoazide</i>).
qPGR	–	kiekybinė polimerazės grandininė reakcija / realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (angl., <i>quantitative polymerase chain reaction, qPCR</i>).
RFLP (PCR-RFLP)	–	restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmas (angl., <i>restriction fragment length polymorphism</i>).
SAR	–	supergrupė, apimanti <i>Stramenopiles</i> , <i>Alveolata</i> ir <i>Rhizaria</i> .
SYTO	–	fluorescencinių dažų grupė.
SYBR Green	–	asimetriškas cianino dažas.
TEM	–	transmisijos elektronų mikroskopija (angl., <i>transmission electron microscopy</i>).

Įvadas

Vienaląščiai pirmuonys yra neatsiejama vandens ekosistemos dalis, pasižyminti didele taksonomine ir morfologine įvairove. Jų gausa ir rūšinė sudėtis vandens telkiniuose nuolat kinta priklausomai nuo aplinkos veiksnių: sezoniškumo, vandens temperatūros, pH ir maistinių medžiagų koncentracijos. Dalis laisvai vandens aplinkoje gyvenančių pirmuonių yra vienaląščiai parazitai, tarp kurių, Apicomplexa tipo atstovai yra patogeniški tiek gyvūnams, tiek žmonėms. Tarp Apicomplexa tipui priklausančių vienaląščių pirmuonių *Sarcocystis* spp. genties parazitai ištirti mažiausiai.

Sarcocystis spp. paplitę visame pasaulyje ir turi privalomą dviejų šeimininkų gyvybinį ciklą. Šie patogeniniai mikroorganizmai kelia grėsmę ne tik gyvūnų sveikatai, bet ir žmonėms, sukeldami žarnyno sutrikimus arba raumenų sarkocistozę. Į aplinką šių vienaląščių pirmuonių sporocistos patenka su galutinių šeimininkų išmatomis. Sporocistos dėl savo tvirtos sienelės yra atsparios išoriniams poveikiams ir ilgą laiką gali išlikti aplinkoje. Visgi duomenų apie sporocistų gyvybingumo dinamiką bei jų toleranciją kintančioms aplinkos sąlygoms vis dar trūksta. Daugumoje publikuotų mokslinių darbų apsiribojama tik šių parazitų paplitimo analize, o vienaląščių pirmuonių koncentracija aplinkoje bei jų gyvybingumas lieka neįvertinti.

Identifikuoti vienaląščius parazitus vandens mėginiuose yra sudėtinga dėl mažų genominės DNR koncentracijų. Tradiciniai mikroskopijos metodai neužtikrina pakankamo jautrumo rūšinei identifikacijai, todėl vis dažniau naudojami molekulinės biologijos metodai, pavyzdžiui, lizdinė PGR arba tikro laiko PGR. PGR metodas yra ribotas – jis neleidžia atskirti gyvybingų ląstelių nuo negyvybingų, nes DNR gali būti amplifikuojama ir po mikroorganizmo žūties. Šiai problemai spręsti taikomas propidžio monoazido (PMA) dažas, kuris selektyviai blokuoja DNR amplifikaciją iš ląstelių su pažeistomis membranomis.

Šis magistrinis darbas yra bakalauro studijų metu pradėtų tyrimų tęsinys. Iki šiol *Sarcocystis* rūšių paplitimas skirtingais metų laikais buvo vertinamas kokybiniais metodais. Trūksta duomenų apie sporocistų koncentracijų dinamiką skirtingais metų laikais, bei vienaląščių pirmuonių išgyvenamumą esant skirtingoms temperatūroms.

Darbo tikslas: Įvertinti vienaląščių parazitų gyvybingumą ir rūšinę įvairovę vandens mėginiuose, bei taikant tikro laiko PGR metodą, ištirti DNR kopijų skaičiaus dinamiką skirtingais metų laikais.

Darbo uždaviniai:

1. Taikant molekulinis metodus įvertinti vienaląščių pirmuonių įvairovę vandens mėginiuose, surinktuose skirtingais metų laikais.
2. Įvertinti vienaląščių pirmuonių gyvybingumą esant skirtingoms temperatūroms naudojant propidžio monoazido dažą.
3. Lizdinio PGR metodu nustatyti *Sarcocystis cruzi* ir *Sarcocystis bovifelis* rūšių aptikimo dažnį skirtingais metų laikais surinktuose Bukiškio tvenkinio vandens mėginiuose.

4. Kiekybiškai įvertinti *Sarcocystis cruzi* ir *Sarcocystis bovifelis* DNR kopijų skaičių vandens mėginiuose, surinktuose skirtingais metų laikais.
5. Kiekybiniu tikro laiko PGR metodu nustatyti ar sezoniškumas daro įtaką *Sarcocystis cruzi* ir *Sarcocystis bovifelis* DNR kopijų skaičiui.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Vienaląsčiai pirmuonys vandens ekosistemoje

Vienaląsčiai pirmuonys pasižymi didele taksonomine bei morfologine įvairove. Jų gausa ir rūšinė įvairovė kinta priklausomai nuo buveinės (jūrų, pakrančių ar gėlo vandens ekosistemos), sezoniškumo, maistinių medžiagų koncentracijos ir vandens telkinio sąlygų. Dėl šių priežasčių skirtingose aplinkose susiformuoja nevienalytė bendrijų sudėtis.

Vienaląsčiai pirmuonys paplitę tiek gėlo vandens telkiniuose (Garner ir kt., 2022), tiek jūrinėse ekosistemose (Caron ir kt., 2012). Jie aptinkami net ir ekstremaliomis sąlygomis, pavyzdžiui, Antarkties vandenyse arba žemos temperatūros ir aukšto slėgio jūros dugno buveinėse (Caron ir kt., 2012). Gėlo vandens telkiniuose dažniausiai aptinkami vienaląsčiai dumbliai, tokie kaip Chrysophyceae klasės atstovai (Ortiz-Álvarez ir kt., 2018). Chrysophyceae klasės atstovai gėlo vandens ekosistemose pasižymi ne tik gausa, bet ir funkcinė įvairove – daugelis jų yra miksotrofai, gebantys derinti fotosintezę su aktyvia bakterijų fagocitoze (Bock ir kt., 2022), taip užtikrindami anglies bei kitų maistinių medžiagų apykaitą. Taip pat nustatyta, kad dažniausiai dominuoja fototrofiniai vienaląsčiai pirmuonys, o jūrinėse bendrijose – heterotrofai (Singer ir kt., 2021). Kitų tyrimų duomenimis, vienaląsčių pirmuonių grupių dominavimas kinta priklausomai nuo sezoniškumo bei vandens telkinio gylio (Cruaud ir kt., 2019).

Pagrindiniai veiksniai, formuojantys pirmuonių bendrijų struktūrą, yra pH lygis, vandens temperatūra ir maistinių medžiagų koncentracija (Yuan ir kt., 2024). Kai kurios vienaląsčių pirmuonių rūšys patirdamos aplinkos stresą formuoja cistas (Salazar-Ardiles ir kt., 2022). Ši būseną leidžia mikroorganizmams išlikti gyvybingiems nepalankiais laikotarpiais. Sezoniškumas taip pat turi įtaką: pavyzdžiui, vasaros metu pakilusi vandens temperatūra skatina didesnę rūšinę įvairovę ir spartesnę mikroorganizmų kaitą (Esteban ir Maberly, 2023).

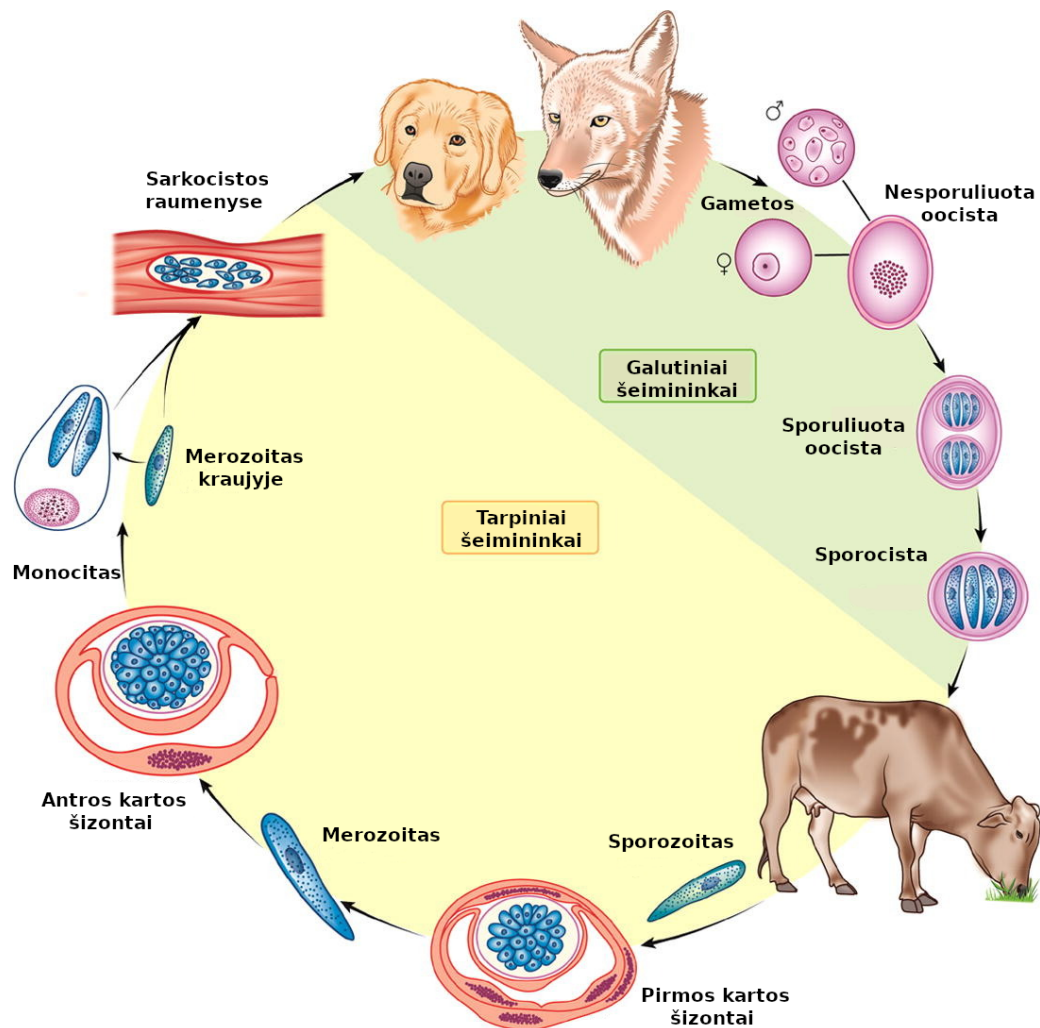
Vandens telkinių ekosistemose greta vienaląsčių dumblių aptinkama gausi vienaląsčių parazitų įvairovė: Apicomplexa, Perkinsidae, Syndiniales, Ichthyosporea, Myxozoa ir Zoopagomycotina atstovai (Ortiz-Álvarez ir kt., 2018). Apicomplexa tipui priklausantys vienaląsčiai pirmuonys aptinkami beveik visose vandens buveinėse – nuo paviršinių vandenų iki giliavandenių nuosėdų (Del Campo ir kt., 2019). Kadangi tai yra obligatiniai parazitai, jų paplitimas yra glaudžiai susijęs su potencialių šeimininkų tankiu. Apicomplexa tipo parazitus nustatyti vandens telkiniuose sunkiausia dėl mažų gDNR koncentracijų. Vieni geriausiai ištirtų vandens aplinkoje aptinkamų Apicomplexa atstovų yra *Cryptosporidium* genties rūšys, kurios dažnai siejamos su geriamojo vandens užterštumu ir viduriavimo protrūkiais (Baldursson ir Karanis, 2011). Taip pat *Toxoplasma gondii* oocistos, patekusios į vandens telkinius, gali išlikti infekcinės ir sukelti ligas tiek žmonėms, tiek gyvūnams (Miller ir kt., 2002).

Nepaisant gausių tyrimų, atliktų su tokiais kokcidiniais pirmuoniais kaip *Eimeria*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ar *Toxoplasma*, *Sarcocystis* genties parazitų paplitimas vandens aplinkoje išlieka mažiausiai ištirtas. Nors ši vienaląsčių pirmuonių gentis iki šiol yra menkai tyrinėta Apicomplexa tipui priklausantys jos atstovai geba sukelti zoonotines ligas, kurios gali kelti pavojų tiek gyvūnams, tiek žmonėms. Dėl šios priežasties išsamesni *Sarcocystis* spp.

tyrimai yra svarbūs siekiant geriau suprasti jų pasiskirstymą ekosistemose ir įvertinti galimą infekcijų perdavimo riziką.

1.2. Vienaląsčiai pirmuonys ir jų gyvybinis ciklas

Sarcocystis – tai viduląstelių parazitinių pirmuonių gentis, kuri priklauso Apicomplexa tipui, Conoidasida klasei ir Sarcocystidae šeimai. *Sarcocystis* genties parazitai paplitę visame pasaulyje ir jai priklauso daugiau nei 200 rūšių. Šie parazitai dažnai aptinkami ropliuose (Bezerra ir kt., 2023), žinduoliuose (J. P. Dubey, 1976) ir paukščiuose (J. P. Dubey ir kt., 2016). *Sarcocystis* spp. turi privalomą dviejų šeimininkų ciklą. Nelytinės dauginimosi stadijos vyksta tarpiniame šeimininke, kuris dažniausiai yra žolėdis arba visaėdis. Šios genties parazitai lytiškai dauginasi galutinio šeimininko organizme, kuriuo dažniausiai tampa mėsėdis gyvūnas. Įprastai tarpiniai ir galutiniai šeimininkai skiriasi tarp *Sarcocystis* rūšių. Pavyzdžiui: trys *Sarcocystis* rūšys, kurios kaip tarpinius šeimininkus infekuoja kiaules (*S. miescheriana*, *S. porcifelis*, *S. suihominis*), turi skirtingus galutinius šeimininkus: šunis, kates, primatus (Badri ir kt., 2026).



1 pav. *Sarcocystis* spp. gyvybinis ciklas (J. Dubey ir Rosenthal, 2023).

Neretai *Sarcocystis* spp. tarpiniais šeimininkais būna kanopiniai gyvūnai pavyzdžiui: briedžiai (Mahrt ir Colwell, 1980), ožkos (Buxton, 1998) ar galvijai (J. Dubey ir Rosenthal, 2023).

Galutiniam šeimininkui suvalgius užkrėstą raumeninį audinį su sarkocistomis, virškinimo trakte tripsinas ir tulžis suardo cistų sienelę, o išlaisvinti bradizoitai patenka į žarnyno gleivinės epitelinį sluoksnį (Fayer ir kt., 2015). Bradizoitai subręsta į vyriškas ir moteriškas gametas ir lytiškai dauginasi žarnyno gleivinėje (1 pav.). Kiekvienoje subrendusioje oocistoje yra dvi sporocistos. Kai oocistos prasiskverbia pro jungiamąjį audinį į plonosios žarnos vidų, jų sienelės plyšta, sporocistos išsiskiria ir pasišalina iš šeimininko organizmo kartu su išmatomis (Fayer, 2004). Vienaląsčiai parazitai pasižymi sparčiu plitimu, nes į aplinką patenka labai didelis kiekis oocistų. Vienas užsikrėtęs gyvūnas per 1 – 3 savaites gali išskirti net iki 10^8 oocistų (Dumètre ir Dardé, 2003). Kiekviena sporocista yra maždaug $15\ \mu\text{m}$ ilgio ir turi keturis sporozoitus (Fayer ir kt., 2015). Tarpiniam šeimininkui prarijus maistą (žolę) ar vandenį su sporocistomis, išsiskiria sporozoitai, kurie prasiskverbia pro žarnyno epitelį ir migruoja į kraujagyslių endotelį. Kraujagyslių endotelyje vyksta nelytinio dauginimosi ciklai, po kurių susidaro merozoitai, jie sklinda kartu su krauju ir įsiskverbia į širdies arba skersaruožių raumenų ląsteles. Raumenų ląstelėse susidaro sarkocistos, kuriose yra bradizoitų. Sarkocistos tampa užkrečiamos tik po subrendimo, kuris gali trukti iki 2 mėnesių (Fayer ir kt., 2015). Ciklas yra užbaigiamas, kai galutinis šeimininkas suvalgo tarpinio šeimininko *Sarcocystis* spp. parazitais užkrėstą mėsą.

1.3. *Sarcocystis* spp. patogeniškumas

Sarcocystis genties pirmuonys yra pavojingi ne tik gyvūnams, bet ir žmonėms. Šie vienaląsčiai parazitai gali sukelti įvairių sveikatos problemų, nuo lengvų simptomų, tokių kaip virškinimo sutrikimai, iki sunkesnių, pavyzdžiui, raumenų sarkocistozės. Ligos eiga pasižymi plačiu spektru – nuo besimptomų formų iki mirtinų sisteminių ligų. Europos Sąjungos teisės aktai dėl sarkocistų kontrolės mėsos apžiūros metu nėra griežti, todėl kruopšti gyvulių skerdenų patikra skerdyklose nėra privaloma. Daugelis sarkocistų aptinkamos atsitiktinai skerdimo metu, tačiau kelios rūšys sukelia kliniškai reikšmingas ligas ir didelius ekonominius nuostolius. Globaliu mastu galvijų tarpe užsikrėtimas siekia 63 %, o iki šiol nustatyta ne mažiau kaip 12 skirtingų rūšių, infekuojančių galvijus kaip tarpinius šeimininkus (Shams ir kt., 2022). *Sarcocystis cruzi* yra viena iš patogeniškiausių rūšių galvijams. Ši rūšis dažnai nustatoma sveikuose galvijuose, o tai rodo, kad infekcija ne visada pasireiškia klinikiniais požymiais. Manoma, kad klinikinės sarkocistozės išsivystymas priklauso nuo parazitų sporocistų kiekio, taip pat nuo gyvūno fiziologinės būklės ar kitų neidentifikuotų veiksnių (J. Dubey ir Rosenthal, 2023). *Sarcocystis* infekcijos siejamos su galvijų skersaruožių raumenų uždegimine liga – galvijų eozinofiliniu miozitu (BEM). BEM paveikti galvijai dažniausiai neturi klinikinių požymių, o liga nustatoma po gyvūno skerdimo atliekant apžiūrą. Ligos paplitimui neturi įtakos lytis ar gyvūno veislė, o pažeidimai gali apimti beveik visus skersaruožius raumenis (J. Dubey ir Rosenthal, 2023). Dėl skerdenos privalomo utilizavimo JAV, BEM sukelia reikšmingus ekonominius nuostolius. Atlikus *cox1* geno analizę, nustatyta, kad *Sarcocystis cruzi* paplitimas Japonijoje siekė 49,9% (Murata ir kt., 2018), o Lietuvoje, tiriant iš ūkininkų ir mėsos perdirbimo įmonių surinktus mėginius, net 96,1% (Prakas ir kt., 2020).

Sarkocistozė yra paplitusi ne tik tarp galvijų. Infekcija nustatoma 66% avių ir 52% ožkų

(Feng ir kt., 2023). Avims *S. tenella* ir *S. arieticanis* yra patogeniškos, perduodamos šuninių šeimos galutiniams šeimininkams. *S. tenella* infekcija avims gali pasireikšti anoreksija, svorio kritimu, karščiavimu, anemija, kailio slinkimu ar net gaišimu. Infekcijos paplitimas avyse ir ožkose siejamas su amžiumi ir lytimi, nustatant didesnę dažnį vyresniems gyvūnams ir patelėms (Feng ir kt., 2023).

Sarcocystis parazitai aptinkami ne tik raumeniniame, bet ir nerviniame audinyje. Pavyzdžiui, *Sarcocystis neurona* aptinkama arklių centrinėje nervų sistemoje ir sukelia EPM (arklių pirmuonių sukeliama mieloencefalitą) (Reed ir kt., 2016). Arkliai užsikrėčia *Sarcocystis neurona* per maistą ar vandenį užkrėstą oposumo (galutinio šeimininko) išmatomis. Arklių centrinėje nervų sistemoje sukelia pažeidimus smegenyse ir nugaros smegenyse, dėl kurių gyvūnams gali pasireikšti neurologiniai simptomai, tokie kaip nenormali eisena, rijimo sutrikimai, raumenų atrofija ar net traukuliai (J. Dubey ir kt., 2015).

Didžioji dauguma *Sarcocystis* genties parazitų yra nekenksmingi žmonėms, tačiau keletas rūšių žmones infekuoja kaip galutinius šeimininkus: *S. hominis*, *S. suihominis*, *S. heydorni*, *S. nesbitti* (Rosenthal, 2021) bei neseniai atrasta rūšis – *S. sigmoideus* (Moniot ir kt., 2025). Žmonės žarnyno sarkocistoze gali užsikrėsti vartodami termiškai neapdorotą mėsą: jautieną su *S. hominis*, *S. heydorni* ar *S. sigmoideus* sarkocistomis bei kiaulieną arba šernieną, kurioje yra *S. suihominis* cistų. Žarnyno sarkocistozės simptomai apsiriboja ūmiais, o tik retais atvejais lėtiniais virškinimo trakto sutrikimais. Tyrimų metu dirbtinai sukeltos infekcijos simptomai apima pykinimą, pilvo skausmus, viduriavimą, o simptomų sunkumas priklauso nuo suvalgyto mėsos kiekio (Rosenthal, 2021). Ar užsikrėtęs asmuo išlieka be simptomų, ar suserga, greičiausiai priklauso nuo užkrečiančios rūšies, šeimininko veiksnio ir infekcinės dozės dydžio (Harris ir kt., 2015). Žmogui valgant termiškai neapdorotą arklio mėsą su sarkocistomis *Sarcocystis fayeri* išskirtas toksinas gali sukelti apsinuodijimo simptomus (Kamata ir kt., 2014).

Dauguma raumenų sarkocistozės atvejų buvo nustatyta žmonėms iš tropinių Azijos ar Pietryčių Azijos šalių (Harris ir kt., 2015). Iki šiol atlikti tik riboti tyrimai apie *Sarcocystis* spp. infekcijas žmonėse. Atlikus mokslinius tyrimus Pietryčių Azijoje buvo nustatyta, kad apie 20 % Malaizijos gyventojų kraujo serume aptinkami antikūnai prieš šiuos parazitus (Thomas ir Dissanaik, 1978). *Sarcocystis nesbitti* yra tropikuose aptinkama *Sarcocystis* rūšis, kurios galutinis šeimininkas yra gyvatės (Wassermann ir kt., 2017), o tarpinis šeimininkas – žmogus (Fayer ir kt., 2015). Aplinkos mėginių analizė Tiamono saloje parodė, kad *S. nesbitti* aptinkama vandens mėginiuose iš vandens talpyklų ir upių, o tai leidžia daryti prielaidą, jog vanduo gali būti svarbus šio parazito plitimo kelias (Shahari ir kt., 2016). Raumenų sarkocistozės atvejai įprastai besimptomiai. Simptominiai atvejai gali būti susiję su skausmingu raumenų patinimu, kuris trunka iki 4 savaičių. Dažniausi simptomai buvo karščiavimas, mialgija, galvos skausmas, silpnumas ir bronchų spazmai (Rosenthal, 2021).

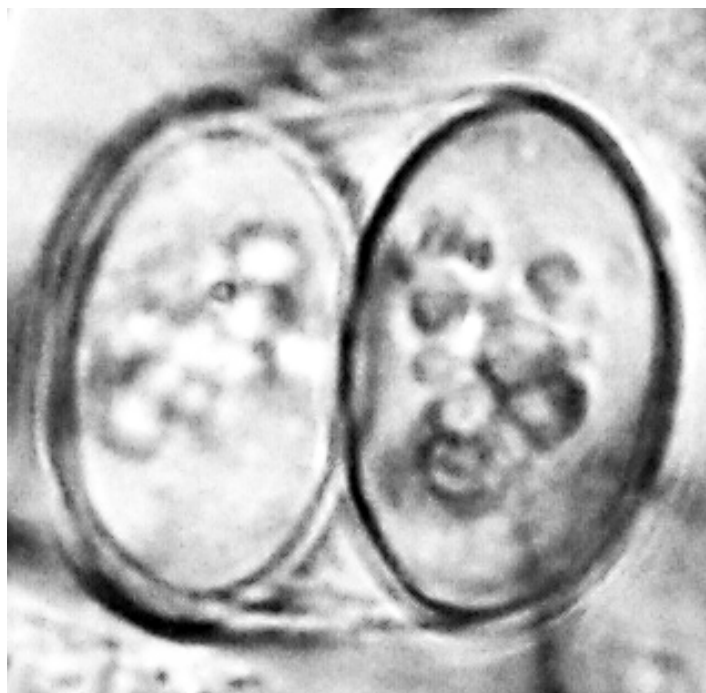
Sarcocystis genties pirmuonys yra paplitę tarp ūkinių gyvūnų. Nors infekcija dažnai būna be simptomų, ji gali lemti sunkius patologinius sutrikimus ir reikšmingus ekonominius nuostolius ūkininkams. Žmonės šiais parazitais dažniausiai užsikrėčia vartodami termiškai neapdorotą mėsą ar užterštą vandenį, o ligos eiga, priklausomai nuo parazito rūšies ir šeimininko būklės,

varijuoja nuo lengvų virškinimo sutrikimų iki sisteminių raumenų pažeidimų.

1.4. Sporocistų struktūra ir atsparumas aplinkos sąlygoms

Nors informacijos apie *Sarcocystis* genties parazitų sporocistų struktūrą, baltymus ir atsparumą aplinkos veiksniams yra nedaug, šie pirmuonys yra panašūs į kitų *Coccidia* grupės parazitus, pavyzdžiui, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia*, *Isospora* ir *Eimeria* gentis (Mai ir kt., 2009).

Šių pirmuonių oocistų sienelės struktūra yra panaši visoje *Coccidia* grupėje (Berto ir kt., 2014). Oocistų sienelė tvirta, todėl ji atspari išoriniams veiksniams. Jų mechaniniam pažeidimui būtinas ilgas homogenizavimas (vorteksuojant) naudojant stiklo rutuliukus. Cheminis oocistų pažeidimas pasiekiamas jas apdorojant balikliu, kaliodichromatu arba sieros rūgštimi (Mai ir kt., 2009). Vis dėlto oocistų sienelė yra pralaidi mažoms molekulėms bei lipiduose tirpioms medžiagoms, tokioms kaip metilbromidas ar amoniakas (Belli ir kt., 2006). Oocistų sienelės formavime dalyvauja dvi specifinės organelės – sienelę formuojantys 1 tipo (WFB1) ir 2 tipo (WFB2) kūnai. Abu sienelę formuojantys kūnai aptinkami ankstyvosiose makrogametos biogenezės stadijose. Atlikus *E. tenella* ir *E. maxima* biocheminę oocistų sienelės analizę nustatyta, kad jos sudėtyje yra nuo 0,6 iki 2,0 % angliavandenių, nuo 1,4 iki 7,6 % lipidų ir nuo 90,4 iki 98,3 % baltymų, tiek nesporuliavusiose, tiek sporuliavusiose oocistose (Mai ir kt., 2009). Sporuliavusiose oocistose yra mažiau angliavandenių nei nesporuliavusiose. *Sarcocystis* parazitai sugeba išlikti gyvybingi aplinkoje dėl barjerinių sluoksnių, kurie apsaugo nuo aplinkos poveikio (2 pav.). Oocistą gaubia apsauginė sienelė, kuriai suirus, išsilaisvina dvi membranos dengtos sporocistos. Kiekvienoje sporocistoje yra po keturis sporozoitus, kurie taip pat yra apgaubti individualiais membranų sluoksniais.



2 pav. *Sarcocystis* spp. iš žarnyno nuograndų.

Vienas iš oocistų atsparumo pavyzdžių yra *Cryptosporidium parvum*, kurios yra atsparios įprastoms laboratorijoje naudojamoms dezinfekcijos priemonėms, tokioms kaip hipochloritas ar 70 % etanolis. Nustatyta, kad dezinfekavimo priemonė, sudaryta iš stiklo plovimo skysčio ir amonio hidroksido, reikšmingai sumažino oocistų gebėjimą sukelti infekciją tiek po 13, tiek po 33 minučių poveikio (Weir ir kt., 2002). Oocistos taip pat pasižymi dideliu atsparumu temperatūros poveikiui. *T. gondii* sporuliavusios oocistos laboratorinėmis sąlygomis gali išlikti infektyvios 35 °C temperatūroje iki 32 dienų, 40 °C – iki 9 dienų, o 45 °C temperatūroje – iki 1 dienos. Be to šios oocistos geba išgyventi iki 54 mėnesių 4 °C temperatūroje ir iki 106 dienų užšaldytos –10 °C temperatūroje (Petersen ir kt., 2010). Taip pat nustatyta, kad trumpalaikis inkubavimas 100 °C temperatūroje nėra pakankamas visiškam oocistų sienelės suardymui. Net ir po 15 minučių virinimo (100 °C) dalis oocistų išlaikė nepažeistą sienelę (Marciano ir kt., 2020). Dėl savo tvirtos sienelės ir gebėjimo išlikti užkrečiamomis įvairiose temperatūrose *T. gondii* oocistos yra atsparios įvairiems aplinkos poveikiams. Vertinant šias biologines savybes užkrečiamųjų ligų kontekste būtina pasirinkti efektyviausias kontrolės strategijas. *T. gondii* apsauginę sienelę formuoja 225 specifiniai baltymai, pasižymintys tirozino bei cisteino gausa ir turintys specifinius PAN domenų (Freppel ir kt., 2019).

Nustatyta, kad *Sarcocystis* spp. sarkocistos mėsos mėginiuose išlieka gyvybingos bent 7 dienas, mėginius laikant 0 °C ir 4 °C temperatūrose. Tačiau mėginius veikiant šalčiu (–20 °C, –30 °C ir –80 °C) cistos tapo nebegyvybingos iškart, kai tik mėsos viduje buvo pasiekta tikslinė užšaldymo temperatūra (Honda ir kt., 2018). Terminė inaktyvacija yra patikima sarkocistų prevencijos priemonė. Tyrimai patvirtino, kad terminis apdorojimas mikrobangomis yra efektyvus būdas parazitams naikinti: 30 sekundžių trukmės poveikis lėmė visišką bradizoitų žūtį, o tik po 15 sekundžių trukmės apdorojimo išgyvenamumas dar siekė 74,4 % (Arafa ir kt., 2025). Literatūroje pateikiama nedaug duomenų apie *Sarcocystis* spp. sporocistų atsparumą aplinkos veiksniams. Nustatyta, kad *S. cruzi* sporocistos išlieka gyvybingos ne trumpiau kaip 90 dienų esant kambario temperatūrai, 4 °C arba 37 °C temperatūrai, taip pat esant 18 %, 75 % ir 100 % santykiniam drėgnumui. Palankiausios išlikimo sąlygos buvo 4 °C temperatūra ir 100 % santykinis drėgnumas – tokiomis sąlygomis sporocistų gyvybingumas per 240 dienų nekito. Tuo tarpu esant 100 % santykiniam drėgnumui ir 37 °C arba kambario temperatūrai, sporocistų išgyvenamumas per 120 dienų sumažėjo iki nulio (Savini ir kt., 1996).

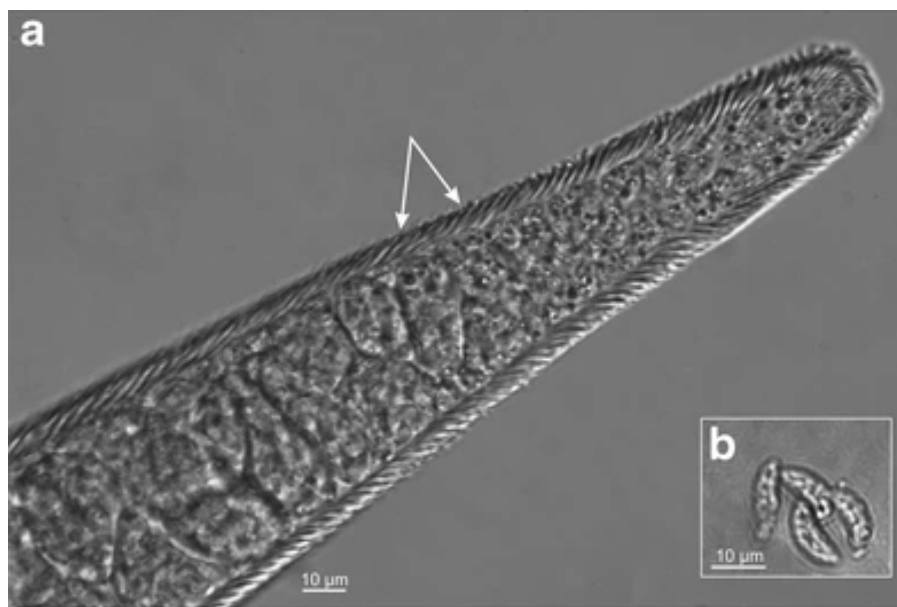
1.5. *Sarcocystis* spp. identifikavimas morfologiniais ir molekuliniais metodais

Sarcocystis genties rūšys gali būti identifikuojamos taikant molekulinis metodus tiek tarpiniuose šeimininkuose, tiriant raumeninį audinį, tiek galutiniuose šeimininkuose, analizuojant žarnyno mėginius, bei aplinkos mėginiuose. Morfologiniai identifikavimo metodai dažniausiai taikomi mėginiams iš tarpinių ar galutinių šeimininkų, nes aplinkos mėginiuose šių parazitų koncentracija yra labai maža. Įprasta PGR reakcija *Sarcocystis* spp. DNR aptikti nepavyko (0 %), o pritaikius mėginių filtravimą ir lizdinę PGR aptikimas išaugo iki 40 % (Strazdaitė-Žielenė ir kt., 2022). Vienas iš morfologinės identifikacijos metodų yra mikroskopija. Oocistos

gali būti vizualiai aptinkamos naudojant šviesinį (Olias ir kt., 2010) ar elektroninį mikroskopą (Hu ir kt., 2017). Sarkocistų identifikavimas atliekamas analizuojant raumeninį audinį. Sarkocistomis užkrėsti raumeniniai audiniai, tiriami šviesine mikroskopija, gali būti dažomi metileno mėlynuoju arba hematoksilino-eozino dažais (Kirillova ir kt., 2018). Šiuo metodu dažniausiai vertinamos sarkocistų struktūros arba laisvi bradizoitai. Įvertinami jų matmenys (ilgis, plotis) ir sienelės struktūra, įskaitant pertvaras ir bradizoitų formą (Lamu ir kt., 2026).

Tiriant dėmėtuosius elnius Lietuvoje, aprašytos kelios *Sarcocystis* parazitų rūšys (Rudaitytė-Lukošienė ir kt., 2018). Hematoksilinu ir eozinu nudažytų raumenų preparatų mikroskopinė analizė leido vizualizuoti audiniuose esančias sarkocistas. Parazitų gausumas įvertintas skaičiuojant sarkocistas, kurios matomos dažytuose preparatuose, o infekcijos plitimas nustatomas kaip užsikrėtusių ir visų ištirtų gyvūnų santykis (Rudaitytė-Lukošienė, 2020).

Priklausomai nuo rūšies, pagal morfologinius požymius sarkocistos susidariusios tarpinio šeimininko audiniuose gali būti mikroskopinės (*S. cruzi*) ar makroskopinės (*S. gigantea*, *S. muris*) (Florin-Christensen ir Schnittger, 2018). Sarkocistos ilgis būna nuo 30 µm iki 3000 µm, o plotis – nuo 20 µm iki 1000 µm (Portella ir kt., 2021). Sarkocistų sienelė būna įvairi, nuo cigaro iki verpstės ar pirštus primenančios formos, o bradizoitų, esančių cistose, būdingos banano ar cigaro formos (3 pav.) (Rudaitytė-Lukošienė ir kt., 2018). Pavyzdžiui, TEM metodu, *S. taeniata* sarkocistą raumeniniame audinyje galima identifikuoti pagal ploną cistos sienelę su trumpais juostelės formos iškyšuliais ir aiškiai matomais banano formos bradizoitais (Prakas ir kt., 2016), o *S. frondea* turi į grybo formą panašius sienelės išsikišimus ir banano formos bradizoitus (Rudaitytė-Lukošienė ir kt., 2018).



3 pav. *Sarcocystis frondea* n. sp. sarkocistos morfologija iš dėmėtojo elnio diafragmos raumeninio audinio (Rudaitytė-Lukošienė ir kt., 2018).

Mikroskopiniai metodai neužtikrina patikimos *Sarcocystis* rūšių identifikacijos, todėl pastaraisiais metais vis dažniau taikomi imunologiniai ir molekuliniai metodai, sukurti šiems parazitams aptikti. Vienas jų – *S. fusiformis* visos cistos antigeno pritaikymas netiesioginiam

ELISA metodui *Sarcocystis* parazitams nustatyti (Toaleb ir kt., 2025). Atlikus baltymų analizę identifikuoti du pagrindiniai imunoreaktyvūs polipeptidai (66 ir 32 kDa), kurie pasižymėjo stipriu atsaku tiek su hiperimuniniais laboratorinių žiurkių, tiek su natūraliai užsikrėtusių buivolų serumais. Dėl aukšto jautrumo ir specifiškumo ateityje šis metodas gali būti taikomas kaip efektyvi diagnostikos priemonė, leidžianti identifikuoti užsikrėtusius gyvūnus dar iki jų paskerdimo.

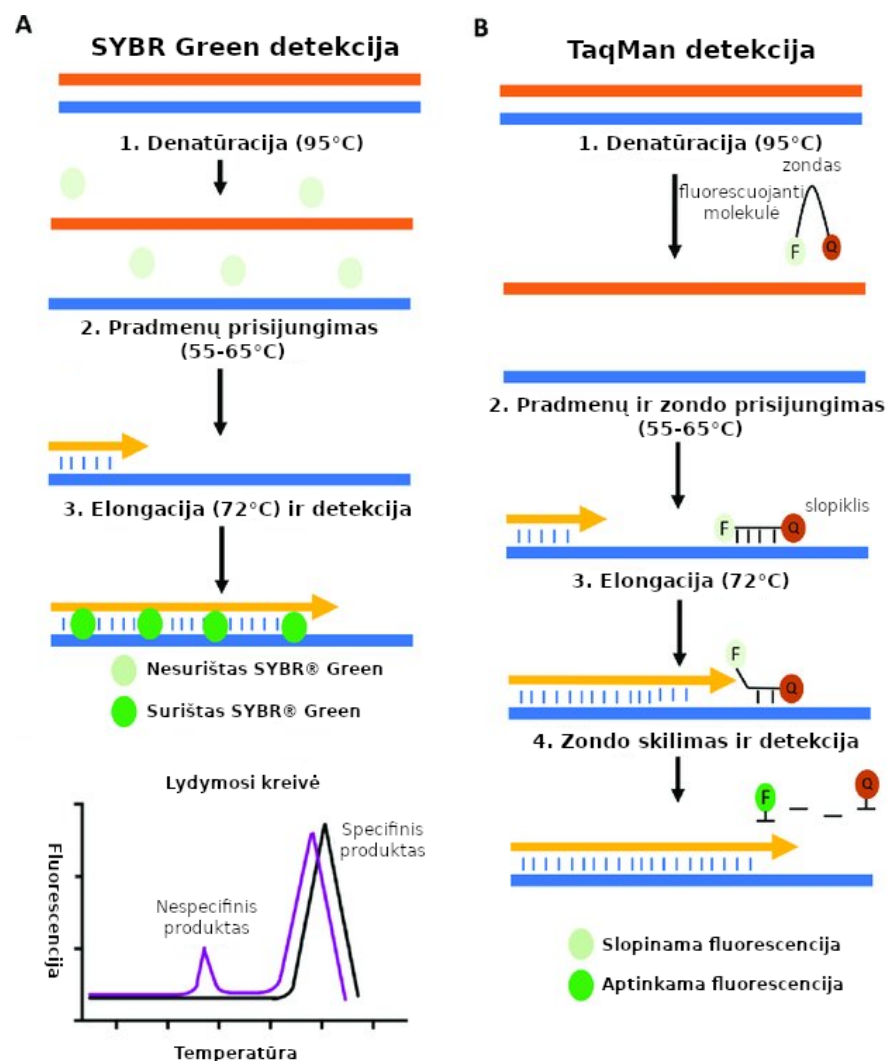
Sarcocystis spp. sporocistų koncentracija aplinkoje yra labai maža, todėl sudėtinga šiuos parazitus aptikti mikroskopijos metodu. Dėl šios priežasties rūšims nustatyti naudojami jautresni molekuliniai metodai, pavyzdžiui, PGR. Dažniausiai naudojami molekuliniai žymenys yra 18S ribosominė DNR, citochromo c oksidazės I subvieneto (*cox1*) arba ITS sritys. Citochromo c oksidazės I subvieneto seka leidžia geriau atpažinti artimas rūšis nei 18S rRNR geno sekos, kai tarpiniai šeimininkai yra elniai (Gjerde, 2013). Dėl nedidelių 18S rRNR geno sekų skirtumų storasienės *Sarcocystis* rūšis sunku atskirti, todėl *cox1* genas išlieka pranašesniu diagnostikos įrankiu (Hoeve-Bakker ir kt., 2019). Paukščių *Sarcocystis* rūšių identifikavimui ITS-1 regiono sritis yra tinkamesnė už 18S rRNR ar 28S rRNR geno sekas, nes užtikrina geresnį filogenetiškai panašių rūšių atskyrimą (Prakas ir kt., 2014). Taikant naujos kartos sekoskaitą amplifikuojant 28S rRNR geną vandens bei dirvožemio mėginiuose nustatyta didesnė *Sarcocystidae* genetinė įvairovė, palyginus su analize, pagrįsta 18S rRNR geno seka (Lee, 2019). Kiti genetiniai žymenys, tokie kaip *rpoB* (Kirillova ir kt., 2018), ar *rpl6* (Tang ir kt., 2023) taikomi rečiau. Šie genai gali būti informatyvūs, tačiau retai naudojami *Sarcocystis* atveju, nes standartiniai rDNR ir *cox1* žymenys jau leidžia identifikuoti parazitus rūšies lygmenyje, o šių baltymų lokusams trūksta universalių pradmenų ir didesnio kiekio referentinių sekų duomenų bazėse. Taip pat *Sarcocystis* rūšis galima identifikuoti PGR-RFLP (Polimerazės grandininės reakcijos restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo) analizės pagalba. Šis metodas apima PGR pagal specifinį genetinį žymenį ir amplikonų skaidymą restrikcijos fermentais, sudarant rūšiai būdingus fragmentų raštus agarozės gelyje. Dažniausia amplifikuojami rRNR regionai: 18S rRNR (Pestechian ir kt., 2021), arba ITS1 (Sneideris ir kt., 2022), po kurių gauti PGR produktai skaidomi *in silico* parinktomis restrikcijos endonukleazėmis, o fragmentų dydžių pasiskirstymas, nustatytas agarozės gelio elektroforezėje, lyginamas su referentiniais pavyzdžiais.

Sarcocystis rūšys gali būti priskirtos rūšiai/genčiai naudojant tiek morfologinius, tiek molekulinės biologijos metodus. Tačiau tradicinę mikroskopiją, kuri neužtikrina pakankamo rūšinio specifiškumo, vis dažniau keičia inovatyvūs diagnostikos metodai. Imunologiniai įrankiai, tokie kaip netiesioginis ELISA metodas, pasižymi dideliu jautrumu ir leidžia identifikuoti užsikrėtusius gyvūnus dar iki skerdimo, tuo tarpu molekuliniai metodai išlieka pagrindiniu įrankiu tiriant aplinkos mėginius ir nustatant rūšinę įvairovę. Nors šiuos parazitus nesunku aptikti tarpinių šeimininkų audiniuose ar galutinių šeimininkų virškinamajame trakte, jų nustatymas aplinkos mėginiuose išlieka komplikotas dėl itin mažos DNR koncentracijos.

1.6. Kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (qPGR) panaudojimas vienąląsčių pirmuonių tyrimuose

Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija yra pažangus diagnostikos metodas, leidžiantis identifikuoti ir tiksliai nustatyti pirmuonių parazitų koncentraciją gamtiniuose mėginiuose. Dėl aukšto jautrumo ir specifiškumo šis metodas ypač efektyvus analizuojant aplinkos mėginius, pasižyminčius itin mažais sporocistų kiekiais.

Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (qPGR), dar vadinama realaus laiko PGR, yra efektyvus ir plačiai taikomas metodas, skirtas specifinių nukleorūgščių sekų amplifikavimui ir kiekybiniam nustatymui. Šis metodas yra klasikinės polimerazės grandininės reakcijos modifikacija, integruojant fluorescencinius dažus ar zondus realiuoju laiku sekti amplifikacijos eigą (4 pav.) (Maddocks ir Jenkins, 2017). Tikro laiko PGR metu amplifikacija ir tikslinės DNR aptikimas vyksta vienu metu, o detekcija atliekama kiekviename cikle matuojant fluorescencijos signalą (Butz ir Patócs, 2019).



4 pav. Interkaliuojančių dažų ir hidrolizės pagrindu veikiančio zondų detekcijos principų palyginimas. A – SYBR Green I fluorescencijos emisija prisijungus prie dvigrandės DNR amplifikacijos metu, B – TaqMan zondo skaldymas polimerazės ekzonukleaziniu aktyvumu, atskiriant fluoroforą nuo slopiklio (Adams, 2020).

Taikant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją (qPGR), aplinkos mėginiuose galima ne tik aptikti specifinių patogenų DNR, bet ir kiekybiškai įvertinti jų koncentraciją. Minimali genominės DNR kopijų aptikimo riba buvo $1,60 \times 10^1$ kopijos/ μL bakterijose (Xue ir kt., 2025). Šis molekulinis analizės metodas buvo panaudotas aptinkant bakterijas (*E. coli*, *Legionella* spp. ir *L. pneumophila*) (Wolf-Baca ir Siedlecka, 2019) ir pirmuonis (*Blastocystis* sp., *E. dispar* ir *T. gondii*) (Moreno-Mesonero ir kt., 2022) vandens mėginiuose. Taip pat qPGR buvo pritaikytas *Sarcocystis cruzi* aptikimui galvijų širdies raumeniniame audinyje (Doi ir kt., 2023).

2025 metais Kinijoje atliktas tyrimas, kurio metu siekta pritaikyti qPGR metodą, skirtą trijų *Glaesserella parasuis* serovarų (5/12, 7 ir 11) greitam aptikimui ir diferenciacijai (Zhendong ir kt., 2025). *G. parasuis* serovariai buvo identifikuoti naudojant specifinius genų žymenis (*wcwK*, *funQ* ir *amtA*). qPGR metodo specifiškumas patvirtintas atlikus reakcijas su kitais dažniais kiaulių patogenais, o gauti rezultatai patvirtino šio metodo jautrumą – nustatyta aptikimo riba siekia 10^2 geno kopijų/ μL arba 100 kolonijas formuojančių vienetų.

Slenkstinis ciklas (Ct) yra pagrindinė kiekybinio PGR metodo išraiška, kuri nurodo ciklą, kai PGR produkto fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei fono fluorescencija. Atliekant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją, nukleorūgščių analizė įprastai skirstoma į dvi pagrindines grupes pagal tai, kaip aptinkami amplifikacijos produktai. Viena jų apima metodus, leidžiančius aptikti tiek specifinius, tiek nespecifinius amplifikacijos produktus, naudojant dvigrandę DNR surišančius fluorescencinius dažus. Antrai grupei priskiriami metodai, naudojantys fluorescencinėmis žymėmis paženklintus oligonukleotidus, kurie užtikrina tik specifinių PGR produktų aptikimą. Šiuo metu rinkoje siūlomas platus fluorescencinių dažų asortimentas, apimantis tokias medžiagas kaip SYBR Green, SYBR Gold, SYTO, BEBO, BOXTO ar EvaGreen (Navarro ir kt., 2015). Pagrindinė šių dažų savybė yra gebėjimas sąveikauti su bet kokia reakcijos metu susidariusia dvigrande DNR struktūra, todėl galima stebėti ne tik tikslius amplifikacijos fragmentus, bet ir nespecifinius šalutinius produktus bei pradmenų dimerus.

Nepaisant didelės komerciškai prieinamų fluorescencinių DNR dažų įvairovės, didžioji dalis realaus laiko PGR tyrimų buvo atlikta naudojant SYBR Green. SYBR Green I – tai asimetrinis cianino grupės dažas, pasižymintis stipria sąveika su dvigrande DNR. Standartinėmis polimerazės grandininės reakcijos sąlygomis šis junginys turi du teigiamus krūvius, kurie lemia stabilų ir specifinį jungimąsi prie nukleorūgščių. Susidaręs DNR ir dažo kompleksas efektyviausiai absorbuoja mėlynos spalvos šviesą ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$), o sužadintas skleidžia žalios spalvos fluorescenciją ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) (Navarro ir kt., 2015). Nors SYBR Green I yra vienas dažniausiai naudojamų dažų realaus laiko PGR methoduose, jis turi tam tikrų trūkumų, tokių kaip ribotas stabilumas ir galimas PGR reakcijos slopinimas, priklausantis nuo dažo koncentracijos (Sidstedt ir kt., 2020). SYBR Green I dažniausiai naudojamas patogenų identifikavimui, genų ekspresijos analizei, mutacijų ir vieno nukleotido polimorfizmą nustatymui ar genetiškai modifikuotų organizmų aptikimui (Navarro ir kt., 2015).

Atliktas tyrimas su skirtingais DNR dažais parodė, kad SYTO dažai yra perspektyvūs juos taikant tikro laiko PGR Eischeid (2011). Šie dažai priklauso didelei komerciškai prieinamų cianino dažų šeimai, kurios sąveika su DNR yra kompleksinė ir priklauso nuo elektrostatiinių,

van der Valso, hidrofobinių ir sterinių sąveikų, nulemtų dažų cheminės struktūros. Lyginant su kitais cianino dažais, SYTO grupės atstovai pasižymi didesniu hidrofobiškumu. Jų jungimasis prie DNR molekulės pagrįstas krūviu ir dažniausiai vyksta mažajame DNR griovelyje. Tokie dažai kaip SYTO 13, 16, 80 bei 82 užtikrina aukštą reakcijos efektyvumą ir mažesnę inhibiciją net esant didesnėms dažų koncentracijoms.

Dažų alterantyva yra zondai – tai dirbtinai sukurtos oligonukleotidų sekos, įprastai pažymėtos fluoroforais ir slopikliais. TaqMan hidrolizės zondai yra vieni dažniausiai naudojamų kiekybinėje PGR dėl didelio specifiškumo ir gebėjimo vienu metu analizuoti kelis taikinius (multipleksavimo) (He ir kt., 2026). Tačiau SYBR Green metodas yra pigesnis ir lengvesnis, nes nereikalauja zondu projektavimo ir sintezės (Tajadini ir kt., 2014). Naudojant SYBR Green metodą, bet koks nespecifinis produktas gali duoti klaidingus teigiamus rezultatus, o iškreipti duomenys gali sumažinti metodo našumą. Tačiau moksliniame straipsnyje pateikti rezultatai rodo, kad SYBR Green dažas turi panašų efektyvumą, kaip ir TaqMan zondas (5 pav.) (abiejų metodų efektyvumas virš 97 %).

Gene	Method	
	TaqMan	SYBR Green
A1	0.986	0.978
A2A	0.993	0.985
A2B	0.984	0.992
A3	0.982	0.991
B. actin	0.994	0.999

5 pav. Apskaičiuotas TaqMan ir SYBR Green metodų efektyvumas atliekant kiekybinę polimerazės grandininę reakciją su adenozino receptorių potipiais (Tajadini ir kt., 2014).

2023 metais Japonijoje buvo atliktas tyrimas, kurio metu buvo siekiama pritaikyti qPGR metodą *Sarcocystis cruzi* aptikimui, naudojant acetil-CoA sintetazės geno žymenis ir TaqMan zondus (Doi ir kt., 2023). Tyrimo metu buvo analizuojami galvijų širdies raumens mėginiai, surinkti Saitamos prefektūros skerdyklose. *S. cruzi* buvo identifikuota visuose mėginiuose pagal šiai rūšiai būdingas morfologines savybes (plona cistos sienelė ir į plaukus panašius išsikišimus). Be morfologinio identifikavimo taip pat buvo atlikta PGR ir sekoskaita pagal *cox1* geno seką, kurie patvirtino, kad aptiktos cistos priklauso *Sarcocystis cruzi* rūšiai. Mokslininkai iš Japonijos pritaikė qPGR sistemą, skirtą kiekybiniam *S. cruzi* įvertinimui, naudojant acetil-CoA geno seką kaip genetinį žymenį. Metodo specifiškumas buvo įrodytas atliekant qPGR. Ši qPGR sistema yra atranki, nes ji neamplifikuoja giminingos su *Taxoplasma gondii* DNR, tačiau geba fiksuoti labai mažas *Sarcocystis cruzi* parazito koncentracijas (nuo 10 geno kopijų).

Tanzanijoje atlikto tyrimo metu tikro laiko PGR metodas pritaikytas šešių pirmuonių rūšių aptikimui (*E. dispar*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *C. mesnili*, *Blastocystis* spp., *G. duodenalis*) naudojant TaqMan zondus (Lotz ir kt., 2025). Šio tyrimo metu nustatytos žemos kiekybinio įvertinimo ribos, kurios siekė nuo 2 iki 20 geno kopijų/μL. qPGR sistema pasižymi

aukštu specifiškumu, nes leidžia tiksliai atskirti morfologiškai identišką rūšį, ko neįmanoma padaryti anudojant šviesinę mikroskopiją.

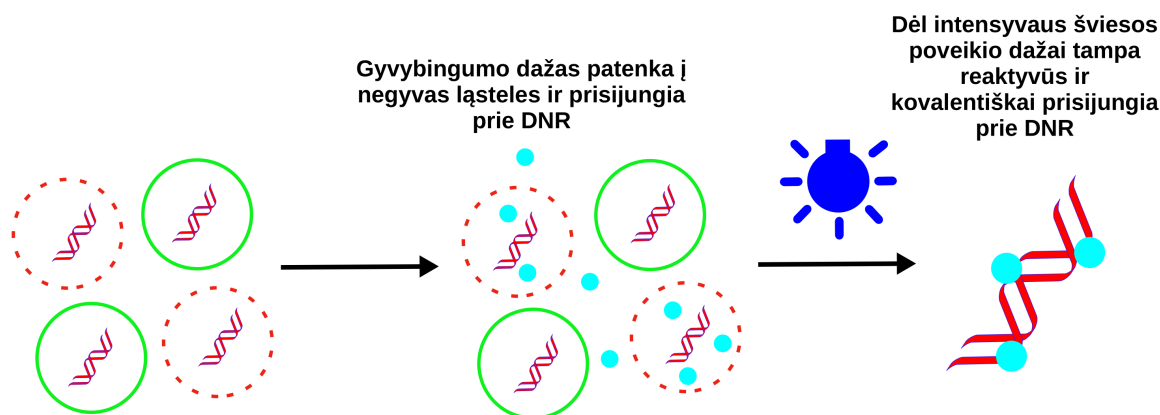
qPGR sistema kartu su TaqMan zondais taip pat pasižymėjo aukštu specifiškumu identifikuojant žmogaus žarnyno pirmuonis: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* ir *Cryptosporidium parvum* (Zhang ir kt., 2022). Tyrimo metu buvo naudojami specifiniai TaqMan zondai ir genų žymenys: *16S-like* SSrRNR (*E. histolytica*), *gdh* (*G. lamblia*), *18S* rRNR (*C. parvum*). Tyrimas neužfiksavo jokių kryžminių reakcijų tarp tikslinių rūšių zondų, o pirmuonių aptikimo riba siekė 500 geno kopijų/μL.

Reikia pabrėžti, kad SYBR Green dažas yra ekonomiškė sprendimas nei TaqMan zondas. Dėl šios priežasties SYBR Green dažnai taikomas pirminiuose tyrimuose tendencijoms identifikuoti, o vėliau gauti rezultatai patvirtinami arba patikslinami naudojant zondus. TaqMan zondai yra specifiškesni nei fluorescenciniai DNR dažai, todėl nereikalauja lydimosi kreivės analizės. Be to, vienas iš pagrindinių TaqMan privalumų yra galimybė atlikti multipleksines reakcijas, o tai leidžia vienoje reakcijoje vienu metu aptikti ir kiekybiškai įvertinti kelis skirtingus patogenus.

1.7. Mikroorganizmų gyvybingumo nustatymo metodai

Vienas iš qPGR metodo apribojimų yra negebėjimas atskirti gyvų ir negyvų ląstelių, nes DNR gali išlikti stabili ir po ląstelių žūties. Siekiant tiksliai įvertinti mikroorganizmų gyvybingumą, qPGR metodas taikomas kartu su papildomais metodais.

Vienas tokių metodų – membranos vientisumo testas, naudojant etidžio monoazidą (EMA-qPGR) arba propidžio monoazidą (PMA-qPGR). Šių metodų principas remiasi selektyviu fotoaktyvių dažų prasiskverbimu į ląstelę. Nepažeista plazminė membrana yra nepralaidi EMA ir PMA molekulėms, o ląstelių su pažeistu apvalkalu viduje šie dažai kovalentiškai prisijungia prie nukleorūgščių. Po fotoaktyvacijos susidaro stabilūs DNR ir dažų kompleksai steriškai trukdo DNR polimerazei, todėl negyvybingų ląstelių DNR nėra amplifikuojama (Tekgül ir Adıgüzel, 2025)(6 pav.).



6 pav. PMA veikimo schema. PMA dažas, veikiamas šviesos, prisijungia prie negyvybingų ląstelių DNR ir taip blokuoja jos amplifikaciją atliekant PGR.

Lyginant su EMA, PMA pasižymi mažesniu toksiškumu ir didesniu selektyvumu, nes jis patenka tik į ląsteles su pažeistomis membranomis (Reyneke ir kt., 2017). Manoma, kad tai gali būti susiję su PMA didesniu teigiamu krūviu (+2) lyginant su EMA (+1), dėl kurio šiam dažui daug sunkiau prasiskverbti pro neigiamai įkrautas gyvybingų bakterijų membranas (Emerson ir kt., 2017).

Nors PMA dažas dažniausiai naudojamas bakterijų gyvybingumui tirti (Schwendener ir kt., 2025; Qin ir kt., 2025), taip pat atlikta tyrimų, kuriuose šis dažas pritaikytas pirmuonių, tokių kaip *Neoparamoeba perurans* (Wynne ir kt., 2024), *Giardia enterica*, *Cryptosporidium parvum* ar *Taxoplasma gondii* (Kim ir kt., 2021) gyvybingumo įvertinimui. PMA-qPGR metodas yra plačiai naudojamas, tačiau turi trūkumų. Dėl netipiškos membranų struktūros ar jų pažeidimų galimi klaidingi rezultatai (Tekgül ir Adıgüzel, 2025). Aplinkos mėginiuose (nuotekose, dirvožemyje) didelis drumstumas ir organinės medžiagos silpnina šviesą, todėl PMA fotoaktyvacija tampa mažiau efektyvi. Tyrimai rodo, kad tokiais atvejais, lyginant su bakterijų suspensijomis iš grynų bakterijų kultūrų, būtina naudoti didesnę PMA koncentraciją ir ilgesnį apšvietimo laiką, norint sėkmingai nuslopinti žuvusių ląstelių DNR.

PMA-qPGR metodui itin svarbus PGR amplikono ilgis. Nustatyta, kad ilgesni amplikonai (≥ 400 bp) kur kas efektyviau nuslopina žuvusių ląstelių DNR signalus nei trumpi fragmentai (< 200 bp) (Martin ir kt., 2013; Wang ir Turechek, 2020). Naujausių tyrimų metu buvo nustatyta, kad amplikono ilgio poveikis PMA-qPGR rezultatams yra kompromisas tarp gyvų ir negyvybingų ląstelių atskyrimo efektyvumo ir PGR reakcijos efektyvumo (Van Holm ir kt., 2021). Nustatyta, kad amplikonai trumpesni nei 200 bp riboja efektyviai atskirti gyvas ląsteles. Optimalus amplikono ilgis bakterijose yra tarp 200 bp ir 400 bp. PGR efektyvumas ir jautrumas pradeda mažėti viršijus 400 bp.

Ląstelių gyvybingumą galima įvertinti naudojant tėkmės citometrijos metodą. Šio metodo pranašumas – gebėjimas greitai atlikti vienos ląstelės analizę. Srauto citometrijoje lazeriai naudojami kaip šviesos šaltiniai, o išsklaidyta ir fluorescencinė šviesa registruojama detektoriais. Šie signalai paverčiami elektroniniais impulsais, kuriuos vėliau apdoroja kompiuteris (McKinnon, 2018). Ląstelių gyvybingumo nustatymas srauto citometrijos metodu yra patikimas ir paprastas metodas. Gyvybingumas įvertinamas pasitelkiant DNR dažus, kurie selektyviai jungiasi prie negyvybingų ląstelių DNR. Dėl nepažeistos membranos gyvos ląstelės lieka nenudažytos, o negyvos ląstelės prisijungia dažus ir tampa aiškiai atskiriamomis. Ląstelių gyvybingumo tyrimuose dažnai naudojami įvairūs citometrijos dažai leidžiantys atskirti gyvybingas ir negyvybingas ląsteles pagal membranos vientisumą arba metabolinį aktyvumą. Dažnai naudojami tokie dažai kaip tripano mėlynasis, propidžio jodidas ir eozinas (Kamiloglu ir kt., 2020). Fluorescuojantys nukleorūgščių dažai, tokie kaip GelRed su SYTO 9 (Zheng ir kt., 2025) ar SYTO 9 kartu su propidžio jodidu (Robertson ir kt., 2019) leidžia atlikti dvigubą ląstelių dažymą. Gyvos ląstelės fluorescuoja žaliai, o negyvybingos ląstelės – raudona spalva. Lyginant su tradiciniu propidžio jodido dažymu, GelRed/SYTO 9 kompleksas pasižymėjo didesniu tikslumu nustatant mažą negyvybingų ląstelių kiekį (Zheng ir kt., 2025).

Srauto citometrijoje taikomi įvairūs fluorescenciniai reagentai, kurie suteikia svarbios infor-

macijos apie ląstelių savybes. Jie skirstomi į pagrindines grupes: fluorescenciniais žymenimis konjuguotus antikūnus, DNR surišančius dažus ir gyvybingumo dažus (McKinnon, 2018). Siekiant palyginti skirtingus mėginius būtina standartizuoti dažymo protokolus, atsižvelgiant į dažų koncentraciją, buferius ir inkubacijos trukmę. Taip pat svarbu naudoti kontrolinius mėginius be dažų, kad būtų galima atskirti mėginio signalą nuo aplinkos sukiamo fono signalo.

Kitame ląstelių gyvybingumo vertinimo metode yra atliekama RNR analizė (Tekgül ir Adıgüzel, 2025). Šis metodas leidžia atskirti gyvas ląsteles nuo žuvusių pasinaudojant trumpa RNR molekulių pusėjimo trukme ir sparčia jų degradacija negyvybingose ląstelėse. Tokie metodai kaip atvirkštinės transkripcijos PGR suteikia informacijos apie metaboliškai aktyvias ląsteles, matuojant metabolinių ar reguliuojančių genų transkripcijos lygį. Vienas šio metodo trūkumų – RNR molekulės pasižymi nestabilumu ir yra lengvai skaidomos, todėl siekiant išvengti klaidingai neigiamų rezultatų, būtina užtikrinti mėginių saugojimo ir ekstrakcijos procedūrų kontrolę.

Mikroorganizmų gyvybingumo vertinimui reikalingi skirtingi metodai, nes tradicinis qPGR neatskiria gyvų ir negyvų ląstelių. PMA-qPGR išlieka viena pagrindinių strategijų, leidžiančių selektyviai amplifikuoti tik vientisą membraną turinčių ląstelių DNR, tačiau jos efektyvumas tiesiogiai priklauso nuo optimalaus amplikono ilgio parinkimo bei mėginio matricių sudėties. Srauto citometrija papildo šiuos tyrimus suteikdama galimybę greitai, vienos ląstelės lygmeniu analizuoti membranos vientisumą naudojant specifinius fluorescencinius dažus. Tuo tarpu RNR analize grįsti metodai, nors ir reikalaujantys itin kruopštaus mėginių paruošimo, yra reikšmingi vertinant ląstelių funkcinį aktyvumą.

Vienaląsčius parazitus iš aplinkos mėginių identifikuoti yra sunku dėl mažos DNR koncentracijos (Strazdaitė-Žielienė ir kt., 2022). Dažniausiai mėginiai iš aplinkos renkami vasarą (Baranauskaitė ir kt., 2022) dėl aktyvios gyvūnų migracijos ir optimalios temperatūros. Iki šiol nėra aišku, kaip temperatūra lemia sporocistų išgyvenamumą aplinkos mėginiuose ir ar tikslinga rinkti vandens mėginius kitais metų laikais, todėl sporocistų gyvybingumo vertinimo tyrimai ir qPGR metodas nustatant parazitų DNR koncentracijas galėtų būti panaudojamas siekiant gauti atsakymus į šiuos iškeltus klausimus.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Darbe naudota įranga

- Centrifuga Centrifuge 5418 (Eppendorf)
- Mini centrifuga/vorteksas FVL-2400N (Biosan)
- Elektros srovės šaltinis EPS 301
- Elektroforezės gelių įvaizdinimo sistema MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems)
- Laminaras – II saugumo klasės (ESCO)
- Purtyklė S0200 (Labnet)
- Termocikleris Swift™ Maxi (ESCO)
- Termocikleris FastGene Ultra Cyclor Gradient (NIPPON Genetics EUROPE)
- Termocikleris Quantstudio5
- Termostatas D1200 (Labnet)
- Termostatas 5320 (Eppendorf)
- Šviesos šaltinis LED (465 – 475 nm)

2.1.2. Darbe naudoti bakterijų kamienai ir plazmidiniai vektoriai

- *Escherichia coli* DH10β
- pJET1.2/blunt

2.1.3. Darbe naudotos bakterijų kultivavimo terpės

- Luria-Bertani (LB) maistinė terpė sudaryta iš 1 % peptono, 1 % NaCl, 0,5 % mielių ekstrakto ir 2 % agaro. Terpė sterilizuojama autoklavu 30 minučių, esant 121 °C temperatūrai. Transformantų kultivavimui į atvėsintą terpę papildomai įdedama ampicilino, galutinė koncentracija – 50 µg/mL.

2.1.4. Pradmenys

1 lentelė. Darbe naudoti pradmenys ir jų sekos.

Pavadinimas	Seka (5'–3')	Ilgis (bp)	Regionas
SUNIF1	ACCTGGTTGATCCTGCCAGT	950	18S rRNR
SUNIR1	TTCGCAGTAGTTCGTCTTTAACA	950	18S rRNR
V2cr1	TACAATGTGCTGTTTACGCTCCA	776	cox1
V2cr2	GCAATCATGATAGTTACGGCAGA	776	cox1
V2cr3c	TCCAAGTACACGGCATTATTTACC	268	cox1
V2cr4	AAACTACTTTACTGCCTACGGTACTC	268	cox1
V2bo4	GCCACATCATTGGTGCTTAGTCT	696	cox1
V2bo5	GCCGCTTGGATCGGTATTACT	696	cox1
V2bo7	GAATCCTGTACATCTGGGCAATC	386	cox1
V2bo8	GATGGTAACCGCAGAGAAGTATG	386	cox1
V2qbF1	CAGTGTTCTGGGCTCCATC	154	cox1
V2qbR4	CATAAGTACGGCACCGGTAAG	154	cox1
V2qcrF2	ACCATCCTGTTCTGTGGTGCT	159	cox1
V2qcrR4	ACCAGAATAAATGCTGATAAAGAAC	159	cox1
pJET1.2Fw	CGACTCACTATAGGGAGAGC	–	pJET1.2
pJET1.2Rw	AAGAACATCGATTTTCCATG	–	pJET1.2

2.1.5. Naudoti rinkiniai ir reagentai

- *Thermo Scientific Genomic DNA Purification Kit™*
- *Thermo Scientific DreamTaq DNA Polymerase*
- *Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix*
- *Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit*
- *Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit*

- *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit*
- *Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit*
- PMA (*Propidium Monoazide*) dye, 20 mM in H₂O
- SYBRTM Green PCR Master Mix
- Rapid Taq Master Mix (2×) (Vazyme)
- DNase I (Thermo Scientific)
- DNase I Buffer (10×) (Thermo Scientific)
- TAE Electrophoresis Buffer (50×)(Thermo Scientific)
- Ampicillin sodium salt (BioChemica)

2.1.6. Restrikcijos endonukleazės

2 lentelė. Darbe naudotos restrikcijos endonukleazės (M = A arba C).

Pavadinimas	Atpažinimo seka (5'–3')	Kirpimo vieta (5'–3')
HindIII	AAGCTT	A↓AGCTT
Eco32I (EcoRV)	GATATC	GAT↓ATC
Csp6I (CviQI)	GTAC	G↓TAC
BfuI (BciVI)	GTATCC	GTATCC(6/5)↓
AccI (XmiI)	GTMKAC	GT↓MKAC
RsaI	GTAC	GT↓AC

2.2. Metodai

2.2.1. Vandens mėginių surinkimas

Vandens mėginiai surenkami naudojant tris sterilias plastikines 1 L talpos taras. Vanduo pasemiamas iš vandens telkinio pakrantės, prieš tai jį sujudinus. Surinktas vanduo transportuojamas ir iškart vykdoma jo filtracija.

2.2.2. *Sarcocystis* spp. sporocistų išskyrimas iš vandens mėginių filtravimo ir koncentravimo metodu

Vandens filtravimui naudojami trys skirtingi filtrai:

- Pirmame filtravimo etape naudojamas metalinis sietelis (porų dydis 1 mm), skirtas pašalinti stambias priemaišas: smėlį, augalų dalis ar dumblius.
- Antrą kartą mėginys filtruojamas naudojant *WhatmanTM 4* klasės sterilų filtravimo popierių, sulaikantį didesnes nei 15 µm ląsteles.
- Trečiajame etape naudojamos *MF-Millipore®* 5 µm porų membranos.

Antrojo ir trečiojo filtravimo etapų metu naudojamas vakuuminis siurblys. Po galutinio filtravimo membrana sterilioje Petri lėkštelėje nuplaunama 2 mL sterilaus vandens. Nuoplovos perkeliama į sterilų 2 mL talpos mėgintuvėlį ir iki genominės DNR (gDNR) išskyrimo laikomos 22 °C, 4 °C ir -20 °C temperatūrose.

2.2.3. PMA gyvybingumo testas

Į mėgintuvėlį įpilama 200 µL tiriamojo mėginio. Mėgintuvėlis uždengiamas folija, siekiant blokuoti šviesą. Tamsoje į mėginį pridedama PMA dažo (galutinė koncentracija – 100 µM). Mėginys 10 min. inkubuojamas tamsoje kambario temperatūroje. Po inkubacijos mėgintuvėlis 15 min. apšviečiamas mėlyna šviesa (fotoaktyvacija). Galiausiai išskiriama genominė DNR ir vykdoma PGR reakcija.

2.2.4. Genominės DNR išskyrimas

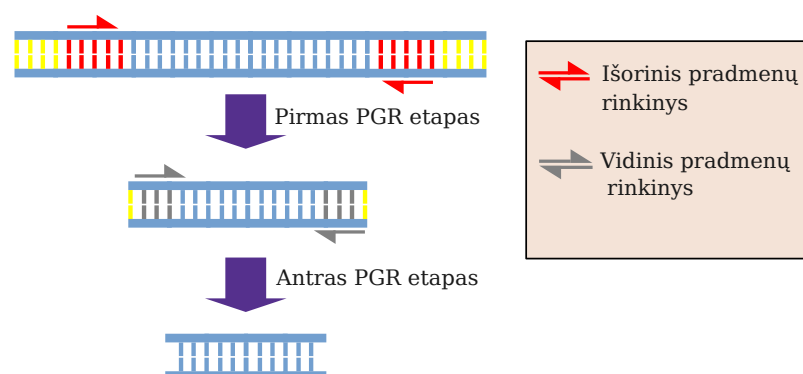
Sarcocystis spp. gDNR buvo išskiriama naudojant *Thermo Scientific Genomic DNA Purification KitTM* rinkinį. Mėgintuvėlyje 200 µL nufiltruoto ir sukonzentruoto vandens mėginio (su PMA dažu arba be jo) sumaišoma su 400 µL lizės buferio ir suvartoma 5 kartus. Įpilama 20 µL proteinazės K, suspenduojama ir sumaišoma apverčiant mėgintuvėlį 5 kartus, po to mėginys 30 min. inkubuojamas termostate 56 °C temperatūroje. Į gautą mišinį pridedama 20 µL RNazės A, sumaišoma ir laikoma 10 min. kambario temperatūroje. Tada įpilama 200 µL 96 % etanolio, išmaišoma ir visas mišinys perkeliama į centrifugavimo kolonėlę, kuri centrifuguojama 1 min. 6 000 g greičiu. Po pirmo centrifugavimo pakeičiamas surinkimo mėgintuvėlis, į kolonėlę užpilama 500 µL pirmo plovimo buferio (*Wash Buffer I*) ir mėginys centrifuguojamas 1 min. 8 000 g greičiu, o supernatantas pašalinamas. Analogiškai į kolonėlę įpilama 500 µL antro plovimo buferio (*Wash Buffer II*), centrifuguojama 3 min. 12 000 g greičiu ir supernatantas vėl pašalinamas. Galiausiai ant kolonėlėje esančio filtro užpilama 25 µL sterilaus dejonizuoto vandens, palaikoma 2 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. 8 000 g greičiu. Ši eliacijos procedūra pakartojama dar kartą su papildomais 25 µL vandens. Išskirta genominė DNR perkeliama į naują sterilų mėgintuvėlį ir iki tolimesnių tyrimų laikoma -20 °C temperatūroje.

2.2.5. Polimerazės grandininė reakcija

Siekiant įvertinti gyvybingų sporocistų kiekį buvo atliktos polimerazės grandininės reakcijos su mėginiais naudojant universalius *18S* rRNR geno pradmenis (1 lentelė). PGR buvo vykdoma su mėginiais bei neigiama ir teigiama kontrolėmis. Paruošiant 50 μ L galutinio tūrio reakcijos mišinį, buvo sumaišyta 25 μ L 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix, po 2 μ L tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų (10 μ M), 5 μ L DNR matricos bei sterilaus vandens iki 50 μ L tūrio. PGR reakcijai paruošti mišiniai talpinami į termociklerį, nustatomi vykdomos reakcijos parametrai. Sąlygos: pirminė denatūracija – 95 °C 5 min., vėliau sekė 40 ciklų, susidedančių iš denatūracijos (95 °C 15 s), pradmenų prilydimo (62 °C 15 s) ir grandinės ilginimo (72 °C 30 s). Reakcijos užbaigimas – 72 °C 10 min. Po amplifikacijos gauti DNR fragmentai analizuoti DNR elektroforezės metodu agaroziniame gelyje.

2.2.6. Lizdinė polimerazės grandininė reakcija

Skirtingų *Sarcocystis* rūšių identifikavimui buvo naudojamas lizdinės polimerazės grandininės reakcijos metodas, susidedantis iš dviejų etapų (7 pav.). Pirmojo etapo metu buvo naudojami specifinės *cox1* geno pradmenų poros (V2cr1/V2cr2; V2bo4/V2bo5) (1 lentelė). Antrame PGR etape buvo naudojami *S. cruzi* ir *S. bovis* rūšims specifinės pradmenų poros, kurios amplifikuoja trumpesnę DNR fragmentą nei pirmame etape naudotos pradmenų poros. PGR buvo vykdoma su gamtiniais mėginiais ir neigiama kontrole. Reakcijos mišinį, kurio galutinis tūris siekė 100 μ L sudarė 5 μ L genominės DNR, 10 μ L 10 $\times$ PGR buferio, 10 μ L dNTP (2 mM), po 1 μ L tiesioginių ir atvirkštinių pradmenų (1 μ M), 1 μ L *DreamTaq* DNR polimerazės (5 U/ μ L), sterilaus vandens iki 100 μ L. Reakcijos sąlygos: pirminė denatūracija – 95 °C 5 min., denatūracija – 95 °C 45 s, pradmenų prilydimas – T °C (temperatūra T priklauso nuo naudojamų pradmenų nukleotidinės sudėties) 45 s, grandinės ilginimo reakcija – 72 °C t min. (laikas t priklauso nuo PGR produkto ilgio), reakcijos užbaigimas – 72 °C 10 min. Pirmame PGR etape 2-4 stadijos kartojamos 30 ciklų. Antrame etape 2-4 stadijos kartojamos 40 ciklų. Po amplifikacijos gauti DNR fragmentai analizuoti DNR elektroforezės metodu agaroziniame gelyje.



7 pav. Lizdinės PGR schema.

2.2.7. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

Elektroforezė agaroziniame gelyje skirta DNR fragmentams atskirti bei nustatyti jų dydį ir koncentraciją. Elektroforezės metu buvo naudojami 1 % agarozės geliai su etidžio bromidu. Šis procesas vykdomas TAE buferyje esant 120 V įtampai. Elektroforezė agaroziniame gelyje buvo vykdoma naudojant horizontalų gel-elektroforezės aparatą. Elektroforetiniai vaizdai stebimi pereinančioje UV šviesoje, naudojant ultravioletinės šviesos transliuinatorių.

2.2.8. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio

DNR fragmentai buvo išgryninami iš agarozės gelio naudojant *GeneJET Gel Extraction Kit*. Agarozės gelio gabalėliai, turintys tikslinius DNR fragmentus, buvo išpjauti steriliu skalpeliu ir perkelti į iš anksto pasvertus 1,5 mL mėgintuvėlius, nustatant gelio masę. Į mėgintuvėlius su geliu buvo pridėtas surišimo buferis (*Binding buffer*) santykiu 1:1 (tūris:masė). Mėginiai buvo inkubuojami 56 °C 10 min. Ištirpęs gelis buvo perkeltas į *GeneJET* gryninimo kolonėlės ir centrifuguojama 1 min. 12000 g. Kolonėlės plaunamos 700 µL *Wash Buffer* tirpalu, centrifuguojama 1 min. 12000 g. Mėginys papildomai centrifuguojamas 1 min. 12000 g, kad būtų pašalintas likęs buferis. Galiausiai ant kolonėlėje esančio filtro užpilama 10 µL sterilaus dejonizuoto vandens, palaikoma 2 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. 12 000 g greičiu. Ši elucijos procedūra pakartojama dar kartą su papildomais 10 µL vandens. Išskirtas DNR fragmentas perkeliamas į naują sterilų mėgintuvėlį ir iki tolimesnių tyrimų laikoma –20 °C temperatūroje.

2.2.9. Plazmidinių vektorių konstravimas naudojant *CloneJET* PGR klonavimo rinkinį

Siekiant sudaryti kalibracines kreives ir įterpti *18S* rRNR geno seką restrikcinei analizei, plazmidiniai vektoriai buvo konstruojami naudojant *CloneJET* (*Thermo Fisher Scientific*) rinkinį. Klonavimui pasirinktas *pJET 1.2/blunt* vektorius, kuriame yra letalus genas. Šis genas išveiklinamas ir į jo vietą įterpiamas tikslinis DNR fragmentas. Modifikuotos ląstelės, kuriose yra šis rekombinantinis vektorius, gali dalintis ir formuoti kolonijas. Taq DNR polimeraze susintetinti produktai turi lipnius DNR fragmentų galus, kurie tarpusavyje nedera su *pJET 1.2/blunt* klonavimo vektoriumi. PGR metu gauti DNR galai yra bukinami. Ši reakcija vykdoma lede. Reakcijos metu naudojama 10 µL 2× reakcijos buferio, 1 µL DNR fragmento, 1 µL DNR galus bukinančio fermento (*DNA Blunting Enzyme*) ir vandens be nukleazų iki 18 µL tūrio. Mėgintuvėlis su šiais komponentais yra vorteksuojamas ir centrifuguojamas 3 – 5 s, perkeliamas į termostatą 70 °C 5 min ir perkeliamas į ledą atvėsitimui. Pridedama 1 µL *pJET 1.2/blunt Cloning Vector* (50 ng/µL) ir 1 µL T4 DNR ligazės. Mėgintuvėlis vorteksuojamas ir centrifuguojamas 3 – 5 s. Ligavimo mišinys inkubuojamas kambario temperatūroje 1 val.

2.2.10. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas ir transformacija

E. coli DH10β bakterijos mikrobiologine kilpele užsėjamos į 5 mL LB terpės, kultivuojamos per naktį 37 °C temperatūroje maišant 100 aps./min. greičiu. 50 µL naktinės ląstelių kultū-

ros inokuliuojama į 5 mL LB terpės ir auginama 37 °C temperatūroje, esant 100 aps./min. greičiui. Ląstelių koncentracijai esant 0,3–0,6 OT (matuojant spektrofotometru esant 600 nm bangos ilgiui) 1,5 mL dienos kultūros perkeliama į atskirą mėgintuvėlį ir centrifuguojama 2 min. 12 000 aps./min. greičiu. Ląstelės suspenduojamos 500 µL šalto CaCl₂ (100 mM). Mėgintuvėlis perkeltas į ledą 10 min. Po to ląstelės dar kartą centrifuguojamos 2 min. 12 000 aps./min. greičiu. Ląstelės suspenduojamos 100 µL šalto CaCl₂ (100 mM) ir pridedama 10 µL ligato mišinio. Mėgintuvėlis perkeltas į ledą ir laikomas 30 min. Vėliau mėgintuvėlis 2 min. laikomas termostate 42 °C temperatūroje ir vėl 2 min. perkeltas į ledą. Gautas mišinys paskleidžiamas ant standžios LB terpės su ampicilinu (50 µg/mL galutinė koncentracija) 12–16 val. inkubuojama 37 °C temperatūroje.

2.2.11. Plazmidinės DNR išskyrimas iš bakterijų

Atrinkus transformantų kolonijas, turinčias rekombinantinę DNR, jos mikrobiologine kilpele perkeliama į 5 ml LB terpę su ampicilinu (50 µg/µL galutinė koncentracija), auginama 24 val. 37 °C temperatūroje, maišant 100 aps./min. greičiu. 1,5 mL užaugintos ląstelių kultūros centrifuguojama 2 min. 12 000 g greičiu. Supernatantas nupilamas, toliau vėl įpilama 1,5 mL ląstelių kultūros ir centrifuguojama 2 min. 12 000 g greičiu. Po centrifugavimo vėl pašalinamas supernatantas.

Toliau plazmidinės DNR, skirta kalibracinių kreivių sudarymui, buvo gryninama naudojant *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* rinkinį. Mėgintuvėlyje esančios ląstelės suspenduojamos su 250 µL resuspendavimo tirpalu (*Resuspension Solution*). Bakterijos turi būti visiškai suspenduotos vortekso pagalba, kol nebelieka ląstelių gumulėlių. Į mišinį dedama 250 µL lizės tirpalo ir sumaišoma. Pridedama 350 µL neutralizavimo tirpalo (*Neutralization Solution*) ir sumaišoma vartant mėgintuvėlį 4–6 kartus. Mėgintuvėlis centrifuguojamas 12 000 g greičiu 5 min. Vengiant baltų nuosėdų supernatantas perkeltas į *GeneJET* centrifugavimo kolonėlę ir centrifuguojama 12 000 g 1 min. Pašalinus surinkimo mėgintuvėlio turinį, jis grąžinamas atgal į kolonėlę. Kolonėlė plaunama du kartus po 500 µL *Wash buffer* tirpalu, abu kartus centrifuguojama 12 000 g greičiu 1 min. Plovimo tirpalo likučiai pašalinami papildomai centrifuguojant tuščią kolonėlę tomis pačiomis sąlygomis. Galiausiai pakeitus surinkimo mėgintuvėlį į naują sterilų mėgintuvėlį atliekama eliacija. Ant kolonėlėje esančio filtro užpilama 25 µL sterilaus dejonizuoto vandens, palaikoma 2 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 1 min. 8 000 g greičiu. Ši eliacijos procedūra pakartojama dar kartą su papildomais 25 µL vandens. Išskirta genomine DNR perkeliama į naują sterilų mėgintuvėlį ir iki tolimesnių tyrimų laikoma –20 °C temperatūroje.

Plazmidinė DNR restrikcinei analizei buvo išskiriama taikant šarminės lizės metodą be komercinių rinkinių. Bakterijų ląstelės buvo suspenduojamos 100 µL 1× TE buferio tirpale. Lizėi vykdyti pridėta 200 µL šviežiai paruošto II tirpalo (0,2 M NaOH, 1 % SDS) ir mišinys inkubuojamas lede 3 min. Neutralizacija atlikta pridėjus 150 µL III tirpalo (3 M natrio acetato, pH 5,2), mėginius papildomai inkubuojant lede 2 min. Po centrifugavimo (14 000 g, 5 min.), supernatantas perkeltas į naują mėgintuvėlį. Priemaišų šalinimui atlikta ekstrakcija organiniais tirpikliais:

į mėginį pridėta po 200 µL chloroformo ir fenolo. Po pakartotinio centrifugavimo (14 000 g, 5 min.), viršutinė vandeninė frakcija perkelta į naują talpą, o plazmidinė DNR nusodinta pridėjus 1000 µL 96 % etanolio. Precipitacija vykdyta 30 min. –20 °C temperatūroje. Susidariusios nuosėdos nusodintos centrifuguojant (14 000 g, 10 min.), supernatantas pašalintas, o mėginiai išdžiovinti. DNR nuosėdos ištirpintos 20 µL demineralizuoto vandens, pridedant 0,5 µL RNazės A (10 mg/mL), ir inkubuotos 30 min. 37 °C temperatūroje. Išskyrimo efektyvumas patikrintas naudojant elektroforezę agarozės gelyje. RNazės pašalinimui mėginio tūris padidintas iki 60 µL pridėjus H₂O, atlikta pakartotinė ekstrakcija fenoliu ir chloroformu (po 30 µL) bei nusodinimas (150 µL 96 % etanolio ir 6 µL 3 M natrio acetato). Po inkubacijos (1 val., –20 °C) ir centrifugavimo (14 000 g, 10 min.), DNR nuosėdos išdžiovintos ir ištirpintos 20 µL demineralizuoto vandens. Plazmidinė DNR iki tolimesnių tyrimų buvo saugoma –20 °C temperatūroje.

2.2.12. DNR restrikcinė analizė

Restrikcinei DNR analizei buvo naudojamos trys restrikcijos endonukleazių poros (2 lentelė).

Pirmosios ir trečiosios restriktazių porų (HindIII/Eco32I ir AccI/RsaI) reakcijų mišiniai buvo paruošiami identiška. 10 µL tūrio mišinys, sudarytas iš 1 µL 10× reakcijos buferio (*Buffer R* naudojamas HindIII/Eco32I restriktazių porai, o *Tango buffer* – AccI/RsaI), 2 µL tiriamosios DNR, po 0,5 µL (10 U/µL) (HindIII ir Eco32I arba AccI ir RsaI) restrikcijos endonukleazių bei demineralizuoto vandens iki galutinio 10 µL tūrio. Reakcijos mišinys inkubuotas 37 °C temperatūroje 1 val.

Antrosios restriktazių poros (Csp6I/BfuI) analizė buvo atliekama dviem etapais. Pirmajame etape paruošiamas 10 µL tūrio mišinys, kurį sudarė 1 µL 10× *Tango buffer*, 4 µL tiriamosios DNR, 0,5 µL (10 U/µL) Csp6I restrikcijos endonukleazės ir demineralizuotas vanduo iki galutinio tūrio. Mišinys inkubuotas 37 °C temperatūroje 1 val. Po inkubacijos į tą patį mėgintuvėlį papildomai įpilta 10 µL reakcijos mišinio, sudaryto iš 3 µL 10× *Tango buffer*, 0,5 µL (5 U/µL) BfuI restrikcijos endonukleazės ir demineralizuoto vandens iki 10 µL tūrio. Mėginys pakartotinai inkubuotas 37 °C temperatūroje 1 val.

2.2.13. Filogenetinė analizė

Filogenetinė analizė buvo atlikta naudojant 18S rRNR geno sekas. Daugiakryptis seku suderinimas buvo atliktas naudojant MEGA12 programoje įdiegtą ClustalW algoritmą. Medis sukonstruotas taikant didžiausios tikimybės metodą (angl., *maximum likelihood*). Evoliuciniai atstumai buvo apskaičiuoti remiantis *General Time-Reversible* modeliu su gama pasiskirstymu ir nekintamųjų vietų proporcija (GTR+G+I). Nustatytos medžio topologijos patikimumas buvo įvertintas taikant *bootstrap* analizę su 1000 pakartojimų.

2.2.14. Kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (qPGR)

Siekiant nustatyti *S. bovis* ir *S. cruzi* sporocistų koncentraciją buvo taikoma kiekybinė polimerazės grandininė reakcija. qPGR metu buvo naudojami rūšiai specifiniai pradmenys.

Tikslinio DNR fragmento pagausinimui paruošiamas reakcijos mišinys, kurį sudaro: 5 μ L genominės DNR, 50 μ L SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L tiesioginių ir 1 μ L atvirkštinių pradmenų (1 μ M), sterilaus vandens iki 100 μ L. Reakcijos sąlygos: pirminė denatūracija – 95 °C 10 min., denatūracija – 95 °C 15 s, pradmenų prilydimas – 60 °C 60 s, grandinės ilginimo reakcija – 60 °C 60 s. Atlikus DNR pagausinimą qPGR metodu, gauti duomenys analizuojami Quant Studio Design & Analysis programa.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

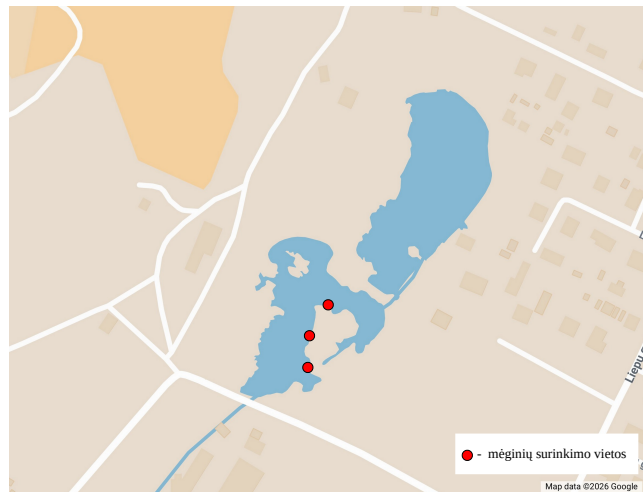
Vanduo yra terpė, kurioje gyvena daugybė mikroorganizmų grupių: bakterijos, grybeliai, vienaląsčiai pirmuonys ir vienaląsčiai dumbliai. Yra atlikta nemažai tyrimų nagrinėjančių jų rūšinę įvairovę, paplitimą ir daromą įtaką kitiems gyviesiems organizmams (Pedrós-Alió, 2006). Tačiau kai kurios vienaląsčių pirmuonių grupės tirtos sąlyginai mažiau, pvz. tarp dažnai tiriamų Apicomplexa tipui priklausančių parazitinių pirmuonių *Eimeria*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* ir *Toxoplasma*, *Sarcocystis* genties parazitų tyrimų yra atlikta mažiausiai (Wieser ir kt., 2024). Mokslinėje literatūroje trūksta ne tik išsamių tyrimų apie *Sarcocystis* sporocistų paplitimą ir rūšinę įvairovę vandens telkiniuose, bet ir atsparumą įvairiems aplinkos veiksniams. Ši problema išlieka aktuali dėl standartizuotų metodų, skirtų įvertinti pirmuonių ląstelių gyvybingumą, trūkumo ir mažos jų koncentracijos vandenyje.

Bakalaurinio darbo metu, taikant molekulinės biologijos metodus, buvo nustatytas *Sarcocystis* genties parazitų paplitimas skirtingais metų laikais (12 mėn.) dviejuose vandens telkiniuose Vilniaus rajono savivaldybėje. Tačiau vienaląsčių pirmuonių sporocistų gyvybingumo įvertinti nepavyko. Sporocistų gyvybingumą vandens mėginiuose buvo bandoma įvertinti, mėginius veikiant PMA dažu ir atliekant tikro laiko PGR. Bakalaurinio darbo tyrimo metu nustatyta, kad PMA dažas nėra tinkamas kiekybiniam *Sarcocystis* parazitų gyvybingumo vertinimui qPGR metodu tiriant gamtinius mėginius. Buvo parodyta, kad atliekant PGR reakcijas su pradmenų poromis, amplifikuojančiomis trumpus specifinius DNR fragmentus (≥ 400 bp), amplifikacija vyksta tiek mėginiuose su PMA dažu, tiek be jo. Priešingai, naudojant pradmenų poras, amplifikuojančias ilgesnius nei 500 bp fragmentus, PGR produktai gaunami tik iš mėginių be PMA dažo (kai ląstelės yra negyvybingos). Ši tendencija išliko nepriklausomai nuo to, ar PGR reakcija buvo atliekama su *Sarcocystis* spp., bakterijų ar mielių gDNR.

Šis magistrinis darbas yra bakalaurinio darbo tęsinys. Dėl PMA dažo panaudojimo ribotumo liko neaišku, kaip temperatūros pokyčiai paveikia vienaląsčių parazitų išgyvenamumą ir kokią įtaką sezoniškumas turi vienaląsčių pirmuonių DNR kopijų skaičiaus dinamikai vandens mėginiuose. Dėl to, magistrinio darbo metu buvo siekiama nustatyti kokį poveikį temperatūra turi vienaląsčių pirmuonių išgyvenamumui ir kiekybiškai įvertinti dviejų *Sarcocystis* rūšių DNR kopijų skaičiaus dinamiką skirtingais sezonais metų eigoje.

3.1. Vandens mėginių analizė

2024-2026 m. laikotarpiu vandens mėginiai buvo renkami iš Bukiškio tvenkinio, Vilniaus rajono savivaldybėje (8 pav.) už šiaurinės Vilniaus miesto ribos. Šalia tvenkinio yra gyvenamųjų namų ir miško teritorijos. Bukiškio tvenkinį jungia kanalas su Bukio ežeru. Gretima miško teritorija sudaro sąlygas laukinių gyvūnų judėjimui prie vandens telkinio, o gyvenamosios teritorijos dalis prisideda prie naminių gyvūnų (šunų, kačių) reguliaraus lankymosi vandens telkinio pakrantės zonoje. Ankstesni Genetikos laboratorijoje atlikti tyrimų rezultatai leidžia teigti, kad sporocistos gali kauptis vandens telkinio dugne, todėl prieš imant mėginius vanduo buvo sumaišomas.



8 pav. Mėginių surinkimo vietos Bukišio tvenkinio teritorijoje.

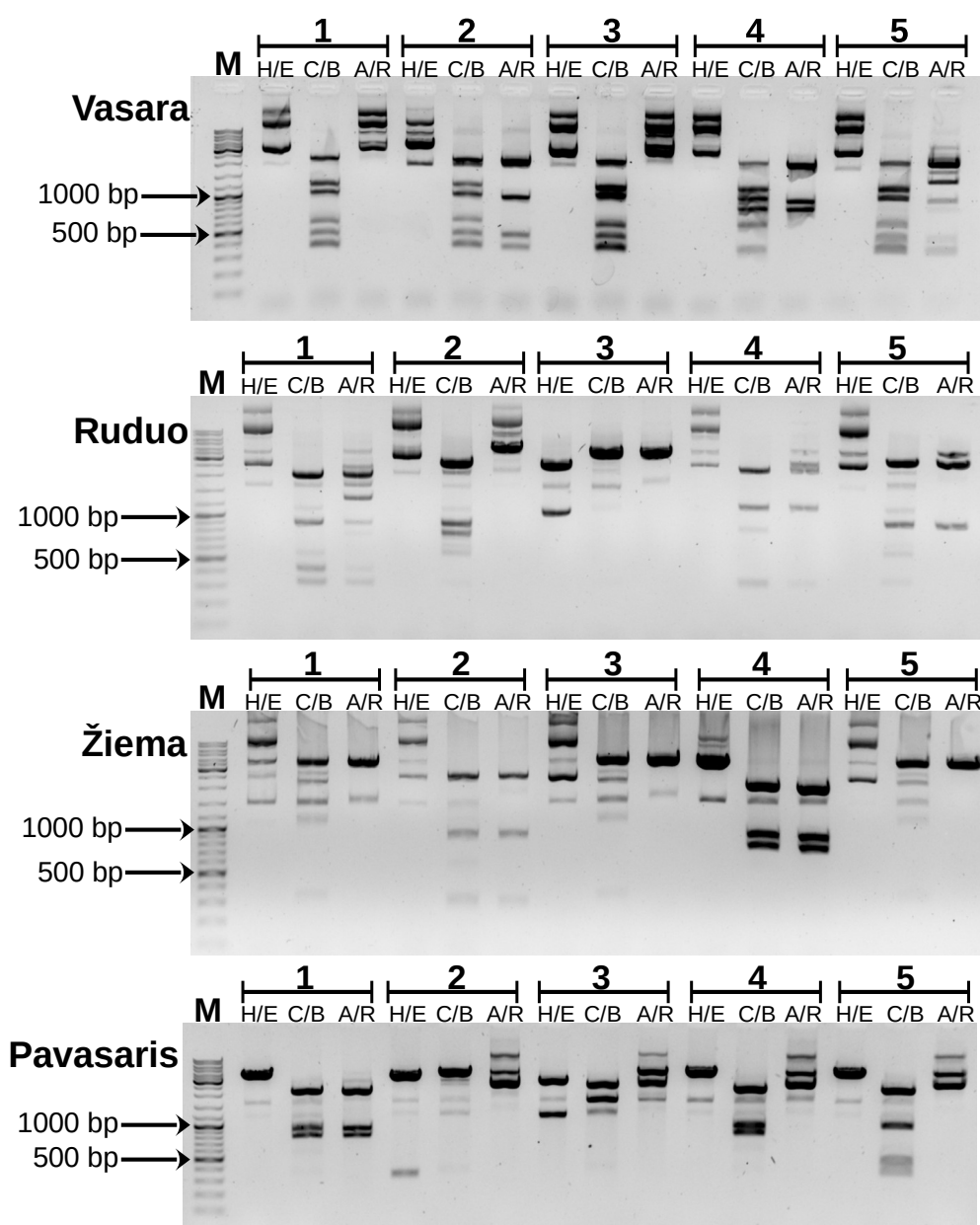
Iki šiol laboratorijoje vykdytų tyrimų metu, mėginiai buvo renkami tik šiltuoju metų sezonu (birželio 24 d. – rugpjūčio 31 d.), nes tuo metu stebima dažniausia gyvūnų migracija ir buvo padaryta prielaida, kad tada didžiausia tikimybė aptikti parazitinius pirmuonis vandens mėginiuose. Bakalaurinio darbo metu buvo nustatyta, kad *Sarcocystis* spp. DNR gali būti aptinkama ištisus metus, todėl norint nustatyti sezoniškumo įtaką tiek vienaląsčių pirmuonių koncentracijai, tiek gyvybingumui vandens mėginiuose buvo nuspręsta mėginius rinkti kartą per mėnesį iš trijų skirtingų tvenkinio vietų (tris biologiniai pakartojimai) ištisus metus. Per dvejus metus buvo surinkti 48 vandens mėginiai (2024-2025 m. – po 3 mėginius kas mėnesį, 2025-2026 m. – po 3 mėginius kartą per sezoną). Dėl itin mažos parazitinių pirmuonių koncentracijos vandens telkiniuose, buvo vykdomas būtinas mėginių koncentravimo etapas. Mėginiai buvo koncentruojami naudojant trijų filtrų sistemą: pirmas buvo naudojamas sterilus metalinis sietelis (porų dydis 1 mm), skirtas pašalinti stambias priemaišas: smėlį, augalų dalis ar dumblius; antras – Whatman™ 4 klasės sterilus filtravimo popierius, sulaikantis didesnes nei 15 µm ląsteles; trečia buvo naudojama MF-Millipore® 5 µm porų membrana, ant kurios buvo sukonzentruojami nuo 5 µm iki 15 µm dydžio mikroorganizmai.

3.2. Vienaląsčių pirmuonių identifikavimas vandens mėginiuose

Surinkus visus vandens mėginius skirtingais metų laikais: pavasarį (balandžio mėn.), vasarą (liepos mėn.), rudenį (spalio mėn.) ir žiemą (sausio mėn.), jie buvo koncentruojami ir skiriama aplinkos DNR (eDNR). Pagrindinė užduotis buvo ištirti kokių vienaląsčių pirmuonių galima aptikti vandens mėginiuose skirtingais metų laikais ir ar jų sudėtis skiriasi priklausomai nuo metų laiko. Šiai užduočiai atlikti buvo pasirinkta klonavimo/sekoskaitos strategija. Visų pirma buvo atliekama standartinė PGR reakcija su universaliu eukariotiniams organizmams *18S* rRNR genetiniu žymeniu. Pasirinkta pradmenų pora (SUNIF1/SUNIR1) buvo sukurta taip, kad būtų universali *Sarcocystis* genties pirmuonių DNR amplifikavimui, bet specifiskai nedaugintų stuburinių gyvūnų, augalų bei kitų *Sarcocystidae* šeimai priklausančių vienaląsčių pirmuonių DNR. Atlikus PGR reakciją, gauti DNR fragmentai buvo išgryninti ir klonuojami

į pJET1.2/blunt vektorių naudojant *CloneJET* (*Thermo Scientific*) rinkinį. Rekombinantinės plazmidės buvo įterptos ir padaugintos naudojant *Escherichia coli* DH10 β laboratorinį kamieną. Siekiant įvertinti ar transformantai turi rekombinantines plazmides buvo atliktas PGR su plazmidiniam vektoriui specifiniais pradmenimis (pJET1.2Fw/ pJET1.2Rw).

Tolimesnei analizei iš kiekvieno sezono mėginių atsitiktinai buvo atrinkti 5 klonai. Iš pasirinktų klonų buvo skiriamos rekombinantinės plazmidės ir atliekama restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo (RFLP) analizė panašių/skirtingų genetinių profilių identifikavimui. RFLP atlikta su 3 restrikcijos endonukleazių (RNazių) fermentų poromis: HindIII ir Eco32I, Csp6I ir BfuI, AccI ir RsaI (2 lentelė). Šios RNazės atrinktos atlikus *Sarcocystis* spp. DNR sekų bioinformatinę analizę. Atlikus restrikcijos reakciją rezultatai vizualizuoti 1% agaroziniame gelyje (9 pav.).



9 pav. Rekombinantinių plazmidžių restrikcijos fragmentų ilgio polimorfizmo analizė. Naudojamos trys restrikcijos fermentų poros: H/E – HindIII ir Eco32I, C/B – Csp6I ir BfuI, A/R – AccI ir RsaI, M – GeneRuler DNA Ladder Mix.

Išanalizavus gautus restrikcinius profilius, nustatyta, kad vasarą surinktuose mėginiuose 1 ir 3, bei 2 ir 5 klonai turi identiškus restrikcinius profilius, tai leidžia daryti prielaidą, kad šie klonai gali priklausyti tam pačiam taksonui, tuo tarpu, 4 klonų restrikcinis profilis yra unikalus. Rudenį surinktų vandens eDNR 1, 4, ir 5 klonų RFLP profiliai yra labai panašūs, todėl galima daryti prielaidą, kad jie gali priklausyti tai pačiai organizmų grupei, o 2 ir 3 klonai turi unikalius restrikcinius profilius, tad galėtų būti skirtingi. Iš žiemos laikotarpiu surinktų mėginių 1, 3 ir 5 klonai turi identiškus restrikcinius profilius, o 2 – unikali. Pavasario laikotarpiu surinktuose mėginiuose yra keturi skirtingi restrikciniai profiliai. Vienintelis atvejis kai DNR restrikciniai profiliai sutampa tarp mėginių rinktų skirtingais metų laikais yra tarp žiemos 4 klonų ir pavasario 1 klonų. Visais kitais atvejais skirtingais metų laikais buvo nustatyti skirtingi RFLP. Išanalizavus 20 klonų buvo nustatyta 12 skirtingų restrikcinių profilių. Tai rodo gamtiniuose vandens mėginiuose esančių vienaląsčių organizmų heterogeniškumą bei leidžia daryti prielaidą, kad skirtingais metų laikais vandens telkinyje aptinkami ne tie patys mikroorganizmai. Atlikus restrikcinį kartografavimą 12 unikalių restrikcinių profilių turinčių mėginių išsiųsti sekoskaitai.

Atlikus sekoskaitos rezultatų bioinformatinę analizę (BLAST), nustatyta, kad visos 18S rRNR genų sekos priklauso Eukaryota domenui (3 lentelė). Gautų sekų panašumas, lyginant su sekomis iš duomenų bazių (NCBI), svyravo nuo 89,41 % iki 99,09 %. Mažiausias sekų tapatumas nustatytas BV3 ir BP5 mėginių – sekos sutapo su *Pararosarium* sp. MZ663824.1 seka atitinkamai 89,44 % ir 89,41 %. Mėginiai BV4, BR2, BZ4 ir BP6 buvo panašiausi į nekultivuojamų pikoplanktonų ar dinoflagelatų 18S rRNR geno sekas (EF196788.1, AY642744.1, KX465156.1). BR4 ir BR5 mėginių sekos geriausiai sutapo su *Colpodella edax* 18S rRNR geno seka (AY234843.1), o BZ3 ir BP4 – su *Woloszynskia* sp. (97,81 %) PQ793414.1 seka. Didžiausias tapatumas (99,09 %) užfiksuotas BP2 mėginyje, jį lyginant su *Borghiella pascheri* (PQ793411.1). Remiantis atlikta analize, mėginius BR5, BZ3, BP2 ir BP4 pavyko identifikuoti iki genties ar net rūšies lygmens, nes jų sekų panašumas viršijo 97 % ribą. Tuo tarpu likusios sekos, kurių panašumas nesiekė 95 %, gali būti priskiriamos tik aukštesniems taksonominiams vienetams.

lentelė 3: Tirtų mėginių 18S rRNR sekų BLAST analizės suvestinė.

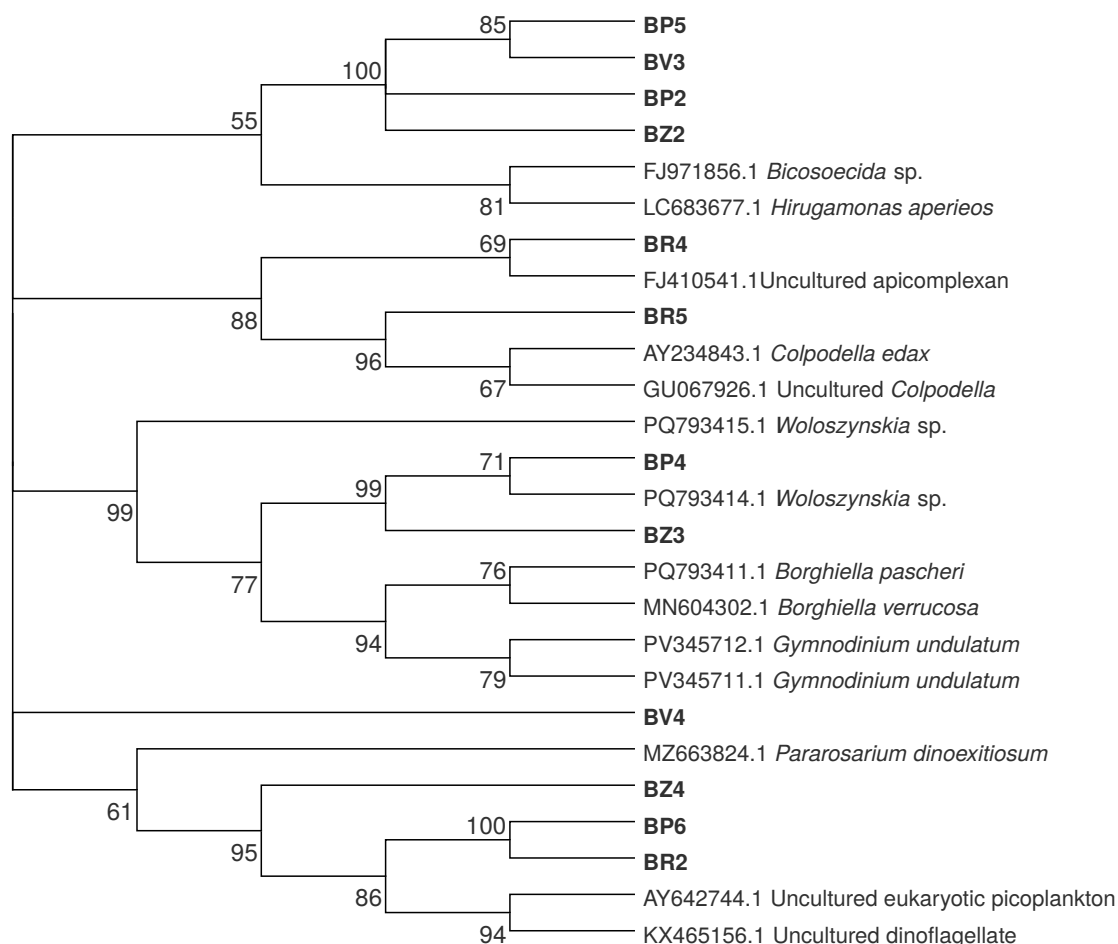
Mėginio ID	Artimiausias atitikmuo NCBI (Organizmas / genas)	NCBI prieigos numeris	Sekų panašumas
BV3	<i>Pararosarium</i> sp. 18S ribosominės RNR genas	MZ663824.1	89,44 %
BV4	Nekultivuojamo eukariotinio pikoplanktono 18S ribosominės RNR genas	EF196788.1	90,67 %
BR2	Nekultivuojamo eukariotinio pikoplanktono 18S ribosominės RNR genas	AY642744.1	93,78 %

Lentelės tęsinys kitame puslapyje

lentelė 3: Tirtų mėginių 18S rRNR sekų BLAST analizės suvestinė. (lentelės tęsinys)

Mėginio ID	Artimiausias atitikmuo NCBI (Organizmas / genas)	NCBI prieigos numeris	Sekų panašumas
BR4	<i>Colpodella edax</i> 18S ribosominės RNR genas	AY234843.1	93,38 %
BR5	<i>Colpodella edax</i> 18S ribosominės RNR genas	AY234843.1	98,82 %
BZ2	<i>Bicosoecida</i> sp. 18S ribosominės RNR genas	FJ971856.1	91,77 %
BZ3	<i>Woloszynskia</i> sp. 18S ribosominės RNR genas	PQ793414.1	97,81 %
BZ4	Nekultivuojamo dinoflagelato 18S ribosominės RNR genas	KX465156.1	93,76 %
BP2	<i>Borghiella pascheri</i> 18S ribosominės RNR genas	PQ793411.1	99,09 %
BP4	<i>Woloszynskia</i> sp. 18S ribosominės RNR genas	PQ793414.1	97,81 %
BP5	<i>Pararosarium</i> sp. 18S ribosominės RNR genas	MZ663824.1	89,41 %
BP6	Nekultivuojamo eukariotinio pikoplanktono 18S ribosominės RNR genas	AY642744.1	93,91 %

Filogenetinė analizė atlikta naudojant MEGA12 programinę įrangą, o sekos sulygiuotos ClustalW algoritmu, papildomai įtraukiant giminingas sekas iš GenBank duomenų bazės. Medis sukonstruotas taikant didžiausios tikimybės metodą (angl., *maximum likelihood*), remiantis 18S rRNR geno sekomis (10 pav.). Sukurtas filogenetinis medis atspindi tirtų izoliatų ir sekų iš duomenų bazių evoliucinius ryšius.



10 pav. Vienaląsčių pirmuonių filogenetiniai ryšiai. Filogenetinis medis sudarytas remiantis 18S rRNR geno sekoskaitos duomenimis.

Gauti rezultatai leidžia daryti prielaidą apie labai didelį tirtų mėginių genetinį heterogeniškumą – izoliatai pasiskirsto į kelis diskretiškus klasterius. Viršutinėje medžio dalyje BP5, BV3, BP2, BZ2 izoliatai formuoja filogenetiškai stabilų klasterį (100 % *bootstrap*), kas rodo labai artimą giminingumą. Ši grupė filogenetiškai jungiasi su FJ971856.1 *Bicosoecida* sp. bei LC683677.1 *Hirugamonas aperieos* formuodami klasterį. Tiek *Bicosoecida* sp., tiek *Hirugamonas aperieos* mikroorganizmai priklauso Stramenopiles grupei, kurie aptinkami visame pasaulyje vandens telkinių ekosistemose. Izolatas BR4 sudaro bendrą šaką su nekultivuojamu Apicomplexa tipo atstovu (FJ410541.1) (*bootstrap* 69 %), o BR5 mėginys nustatytas kaip evoliuciškai artimiausias *Colpodella edax* (AY234843.1) bei nekultivuojamos *Colpodella* (GU067926.1) sekoms (*bootstrap* 96 %). *Colpodella* gentis yra žinoma kaip laisvai gyvenantys arba parazitiniai alveolatai, dažni gėlavandenėse ekosistemose. Aukštos *bootstrap* reikšmės indikuoja patikimą identifikaciją molekuliniu lygmeniu ir patvirtina metodikos patikimumą. BP4 glaudžiai grupuojasi su *Woloszynskia* sp. ir BZ3 sekomis (*bootstrap* 99 %). Šie rezultatai rodo, kad eDNR analizė leidžia aptikti žinomus, taksonomiškai aprašytus protistus. BV4 mėginys užima tarpinę poziciją, evoliuciškai nutolęs nuo pagrindinių klasterių. Mėginiai BP6 ir BR2 formuoja filogenetiškai stabilų klasterį (*bootstrap* 100 %), giminingą nekultivuojamam eukariotiniam pikoplanktonui (AY642744.1). Tuo tarpu izolatas BZ4 užima tarpinę poziciją tarp šio klasterio bei nekultivuojamo šarvuotojo

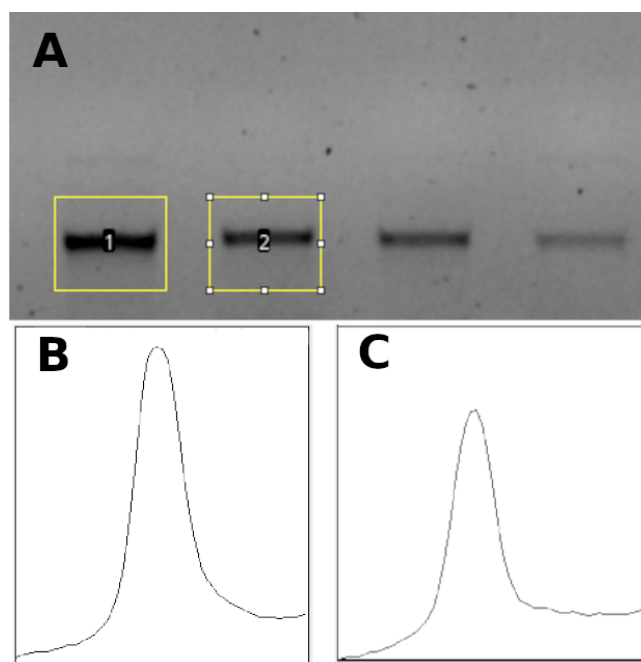
dumblio (KX465156.1) ir nekultivuojamo pikoplanktono (AY642744.1). Remiantis filogenetiniu medžiu, galima teigti, kad tirtuose vandens mėginiuose dominuoja alveolatai, kurie yra svarbūs mikrobino tinklo nariai, plėšrūs, parazitiniai arba miksotrofiniai organizmai. Aptinkama didelė eukariotinių mikroorganizmų įvairovė, net ir be kultivavimo, eDNA metodas leidžia aptikti tiek žinomus, tiek nekultivuojamų mikroorganizmų taksonus, potencialiai dar neaprašytas ar menkai ištirtas linijas.

Apibendrinant gautus duomenis, buvo nustatyta, kad visais metų laikais vandens telkinyje vyraavo įvairūs eukariotiniai mikroorganizmai iš kurių didžiausia dauguma buvo priskirta SAR supergrupei priklausantiems vienaląsčiams organizmams. Toliau buvo tiriamas jų gyvybingumas skirtingais metų laikais ir esant skirtingoms temperatūroms.

3.3. Vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo kaita skirtingomis temperatūros sąlygomis

Bakalaurinio darbo metu buvo nustatyta, kad tyrime taikyti qPGR pradmenys (<200 bp) nėra tinkami mikroorganizmų gyvybingumo tyrimams gamtiniuose mėginiuose kartu su PMA dažų ir tikro laiko PGR metodu. Dėl to, vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo vertinimui pasirinkta standartinė PGR reakcija su PMA dažų paveiktais ir nepaveiktais (kontroliniais) mėginiais bei universaliais *18S* rRNR genui pradmenimis (SUNIF1/SUNIR1) (1 lentelė). Po amplifikavimo gaunamas 950 bp ilgio fragmentas. Gautų PGR fragmentų ryškumas elektroforetiniuose vaizduose analizuojamas naudojant ImageJ programinę įrangą. Gyvybingumas vertinimas lyginant santykinis fluorescencijos intensyvumo skirtumus: PMA dažas, per pažeistas membranas patekęs į ląstelių vidų kovalentiškai prisijungia prie DNR ir slopina PGR amplifikaciją, todėl negyvų ląstelių mėginiuose stebimas ženklus juostelės ryškumo sumažėjimas (11 pav. C) lyginant su mėginiu be dažo (11 pav. B). Santykinis ląstelių gyvybingumas (%) apskaičiuotas lyginant PMA paveiktų mėginių juostelių intensyvumą su PMA nepaveiktomis (kontrolinėmis) grupėmis pagal žemiau pateiktą lygtį.

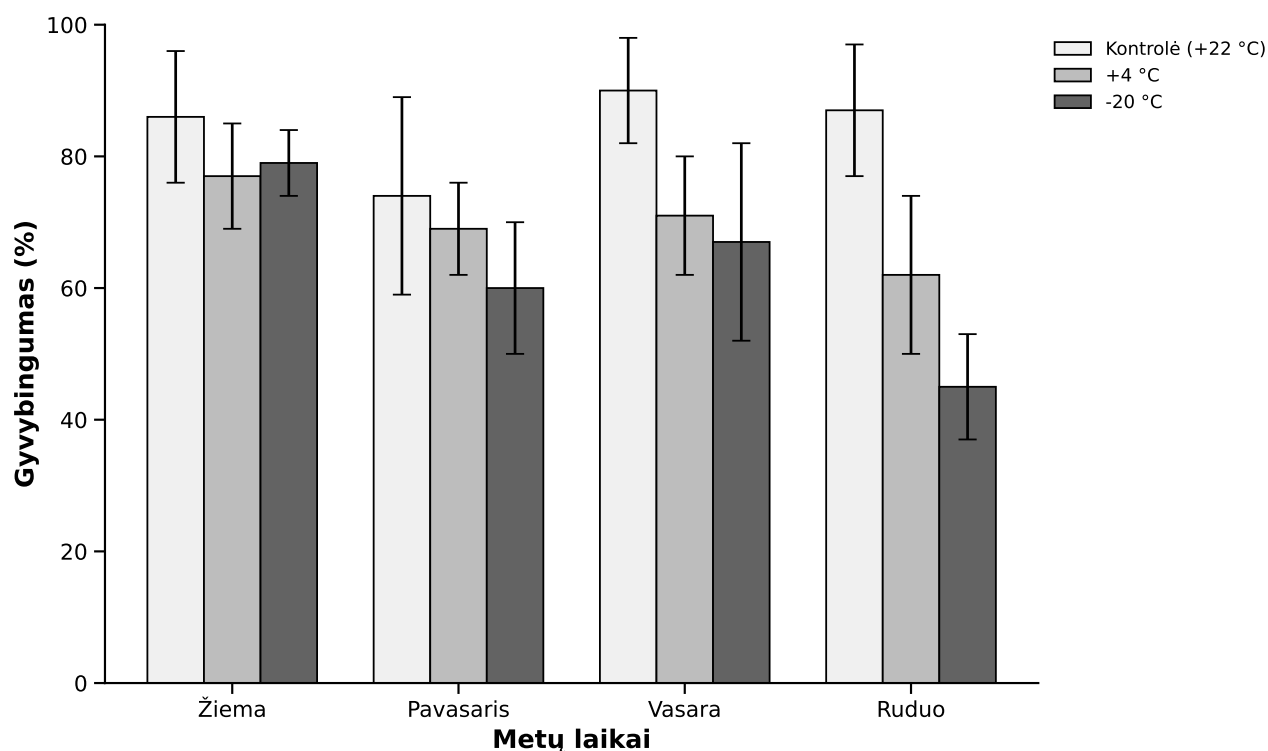
$$\text{Gyvybingumas (\%)} = \frac{I_{\text{PMA}}}{I_{\text{kontrolė}}} \times 100$$



11 pav. Vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo įvertinimas su ImageJ programa. A – apibrėžiamos sritys aplink tiriamas DNR juosteles, B – išmatuojamas mėginio be PMA dažo optinis tankis, C – išmatuojamas mėginio su PMA dažu optinis tankis.

Surinkti ir sukonzentruoti vandens mėginiai 24 val. buvo inkubuojami 22°C , 4°C ir -20°C temperatūrose. Šios trys temperatūros buvo pasirinktos tam, kad būtų imituojamos skirtingos mėginių laikymo sąlygos, kurios gali turėti įtakos ląstelių membranų vientisumui. Tai yra kritinis veiksnys PMA-PGR metodu vertinant gyvybingumą. Po paros dalis mėginių sumaišoma su PMA dažu, o kita dalis – kontroliniai mėginiai – lieka be dažo. Išskyrus gDNR vykdoma PGR. Išanalizavus gautus rezultatus (12 pav.) ir apskaičiavus fluorescencijos intensyvumo skirtumo santykį tarp PGR fragmentų, nustatyta, kad pirmuonių gyvybingumas 22°C temperatūroje buvo nuo 74 % pavasario laikotarpiu iki 90 % vasaros. Padaryta prielaida, kad šioje temperatūroje pirmuonių gyvybingumas išlieka stabilus. Tuo tarpu temperatūros mažėjimas turi neigiamą įtaką gyvybingumui. Lyginant su kontroline grupe, vienaląsčių išgyvenamumas esant 4°C temperatūrai mažėja. Žiemos sezoną surinktuose mėginiuose vienaląsčių pirmuonių išgyvenamumas buvo 77 %, o rudenį 62 %. Mažiausias vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo rodiklis stebimas -20°C temperatūroje. Nors žiemos laikotarpiu stebimas sąlyginai aukštas gyvybingumas 79 %, vėlesniais sezonais jis mažėja pasiekdamas minimumą rudens laikotarpiu, kai vienaląsčių gyvybingumas siekia 45 %. Mažiausiais skirtumas tarp visų temperatūrų grupių buvo nustatytas mėginiuose surinktuose žiemos laikotarpiu. Iš gautų rezultatų galime daryti prielaidą, kad žiemos laikotarpiu vandenyje esantys vienaląščiai pirmuonys yra atspariausi šalčio poveikiui. Žiema vandens temperatūra išlieka ganėtinai pastovi, greičiausiai vandenyje išlieka tik šalčiui atspariausi mikroorganizmai. Rudenį nustatytas didžiausias skirtumas tarp trijų temperatūrų grupių, kurį gali lemti po vasaros išlikusi didesnė mikroorganizmų įvairovė, mažiau atspari žemoms temperatūroms. Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad vienaląsčių mikroorganizmų išgyvenamumas buvo didžiausias mėginius laikant 22°C temperatūroje, sumažinus temperatūrą iki 4°C gyvybingumas šiek tiek sumažėjo, o -20°C gyvybingumas buvo mažiau-

sias. Taip pat buvo pastebėtas ir sezoniškumas – vasara vienaląsčių pirmuonių gyvybingumas buvo didžiausias lyginant su pavasario ir vasaros mėginiais.



12 pav. Vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo kaita skirtingais metų laikais po 24 val. inkubacijos skirtingose temperatūrose.

Siekiant įvertinti gautų rezultatų patikimumą, buvo nuspręsta atlikti statistinę vienfaktorinę ANOVA analizę, rodančią ar skirtingos temperatūros poveikis mėginiais turi statistiškai reikšmingą įtaką jų gyvybingumui. Atlikta statistinė vertinimo analizė patvirtino dėsningą temperatūrinio veiksnio įtaką tirtų mėginių fiziologiniam stabilumui. Taikant vieno faktoriaus dispersinės analizės (ANOVA) metodą, nustatyta, kad temperatūros poveikis turi statistiškai reikšmingus gyvybingumo rodiklių pokyčius ($F = 26,52, p < 0,001$). Gautos vertės leidžia teigti, kad variacija tarp kontrolinės grupės ir šalčio stresą patyrusių mėginių yra nulemta tyrimo sąlygų, o ne atsitiktinių imties svyravimų. Detalesnis porinis grupių lyginimas, atliktas naudojant Tukey HSD testą. Nustatyta, kad abi žemos temperatūros grupės pasižymi statistiškai reikšmingu gyvybingumo lygio kritimu, lyginant su kontroline grupe (22 °C). Tiek veikiant 4 °C temperatūrai, tiek –20 °C šalčiui, gauta p-reikšmė ($p < 0,001$) indikavo akivaizdų neigiamą poveikį vienaląsčių gyvybingumui (4 lentelė). Vidutinis gyvybingumo sumažėjimas, lyginant su kontrole, buvo nuo ~15 % (4 °C grupėje) iki ~22 % (–20 °C grupėje).

4 lentelė. Temperatūros poveikio grupių palyginimo statistinio reikšmingumo įvertinimas.

Lyginamos grupės	<i>p</i> -reikšmė
22 °C ir –20 °C	< 0,001
22 °C ir 4 °C	< 0,001
–20 °C ir 4 °C	0,064

Statistiškai reikšmingo skirtumo tarp 4 °C ir –20 °C temperatūrų poveikio nenustatyta ($p = 0,064$). Nors gauti duomenys rodo tendenciją į didesnę gyvybingumo slopinimą esant –20 °C temperatūrai, statistinė analizė leidžia daryti prielaidą, kad vienaląsčių gyvybingumo lygis nesikeičia temperatūrai mažėjant nuo 4 °C iki –20 °C. Dėl šių priežasčių, galima teigti, kad vandens telkiniuose aptinkamiems vienaląsčiams pirmuonims net ir nedidelis atšalimas iki 4 °C sukelia fiziologinį stresą. Tuo tarpu tolesnis temperatūros mažėjimas iki –20 °C, nors ir išlieka žalingas, nesukelia proporcingai stipresnio poveikio, kuris būtų laikomas statistiškai patikimu. Kadangi tyrime buvo naudojami gamtiniai mėginiai, turintys natūralią sezoninę dinamiką, kiekvienu metų laiku aptinkama vienaląsčių bendrųjų rūšinė kompozicija gali skirtis. Dėl šios priežasties tiesioginis gyvybingumo rodiklių lyginimas tarp skirtingų sezonų naudojant ANOVA testą nėra tinkamas. Skirtingos vienaląsčių rūšys yra nevienodai atsparios temperatūriniam stresui, todėl stebimi pokyčiai gali atspindėti ne tik sezoniškumo įtaką, bet ir rūšinę sudėtį.

3.4. *Sarcocystis* rūšių paplitimo įvertinimas skirtingais metų mėnesiais lizdinio PGR metodu

Ištyrus vienaląsčių pirmuonių atsparumą skirtingoms temperatūroms visais metų laikais, toliau buvo siekiama įvertinti kaip keičiasi DNR molekulių aptikimas priklausomai nuo sezono. Šiam uždaviniui įvykdyti vandens mėginiai buvo renkami ištisus metus kiekvieną mėnesį su trimis biologiniais pakartojimais. Molekuliniai tyrimai, skirti *Sarcocystis* spp. identifikavimui vandens mėginiuose kol kas yra mažai naudojami pasauliniu mastu – iki šiol yra atlikti tik keli tokie tyrimai (Lee, 2019; Shahari ir kt., 2016). Lietuvoje molekuliniai tyrimai su gamtiniais mėginiais vykdomi nuo 2019 metų, siekiant optimizuoti tyrimų metodus bei nustatyti vienaląsčių parazitų paplitimą Lietuvoje (Baranauskaitė ir kt., 2022) ir Baltijos jūros ekosistemoje (Baranauskaitė ir kt., 2024).

Tyrimui buvo pasirinktos dvi *Sarcocystis* rūšys, kurios dažniausiai buvo identifikuotos bakalaurinio darbo metu: *Sarcocystis cruzi* ir *Sarcocystis bovifelis*. *S. cruzi* tarpiniai šeimininkai yra galvijai, o galutiniai – šuniniai gyvūnai (Florin-Christensen ir Schnittger, 2018). Lietuvoje potencialūs šios rūšies galutiniai šeimininkai yra naminiai šunys, lapės ir vilkai. *S. bovifelis* tarpiniai šeimininkai taip pat yra galvijai, o galutiniai šeimininkai – katinių šeimos gyvūnai (Heydorn ir kt., 1975). Lietuvoje dažniausias katinių šeimos atstovas yra naminės katės. Ka-

dangi dėl urbanizuotos aplinkos aplink tiriamą Bukiškio tvenkinį dažnai vedžiojami šunys ir lankosi katės, kurie yra galutiniai šių parazitų šeimininkai, buvo iškelta hipotezė, jog telkinyje bus aptinkamos minėtų rūšių sporocistos. Atlikus lizdinę PGR su rūšims specifiniais pradmenimis, buvo nustatyta, kad *S. cruzi*, ir *S. bovifelis* rūšys vandenyje aptinkamos beveik ištisus metus (5 lentelė). Tyrimo metu nustatyta, kad *S. cruzi* vandens mėginiuose aptinkama dažniau – identifikuota 10 iš 12 mėginių (83,3 %) nei *S. bovifelis* – identifikuotas 8 iš 12 mėginių (66,7 %). Abi rūšys vienu metu identifikuotos rudens (rugsėjis-lapkritis), pavasario (balandis-gegužė) bei žiemos (gruodis-sausis) mėnesiais. Vasario ir kovo mėnesiais tvenkinyje aptikta tik *S. cruzi*, o birželio mėnesį – tik *S. bovifelis*. Rugpjūtis buvo vienintelis mėnuo, kai mėginiuose identifikuoti šių *Sarcocystis* rūšių nepavyko.

5 lentelė. *S. cruzi* ir *S. bovifelis* aptikimas skirtingais mėnesiais Bukiškio tvenkinyje.

Mėnesis	Rūšys
Gruodis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Sausis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Vasaris	<i>S. cruzi</i>
Kovas	<i>S. cruzi</i>
Balandis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Gegužė	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Birželis	<i>S. bovifelis</i>
Liepa	<i>S. cruzi</i>
Rugpjūtis	–
Rugsėjis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Spalis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>
Lapkritis	<i>S. cruzi</i> , <i>S. bovifelis</i>

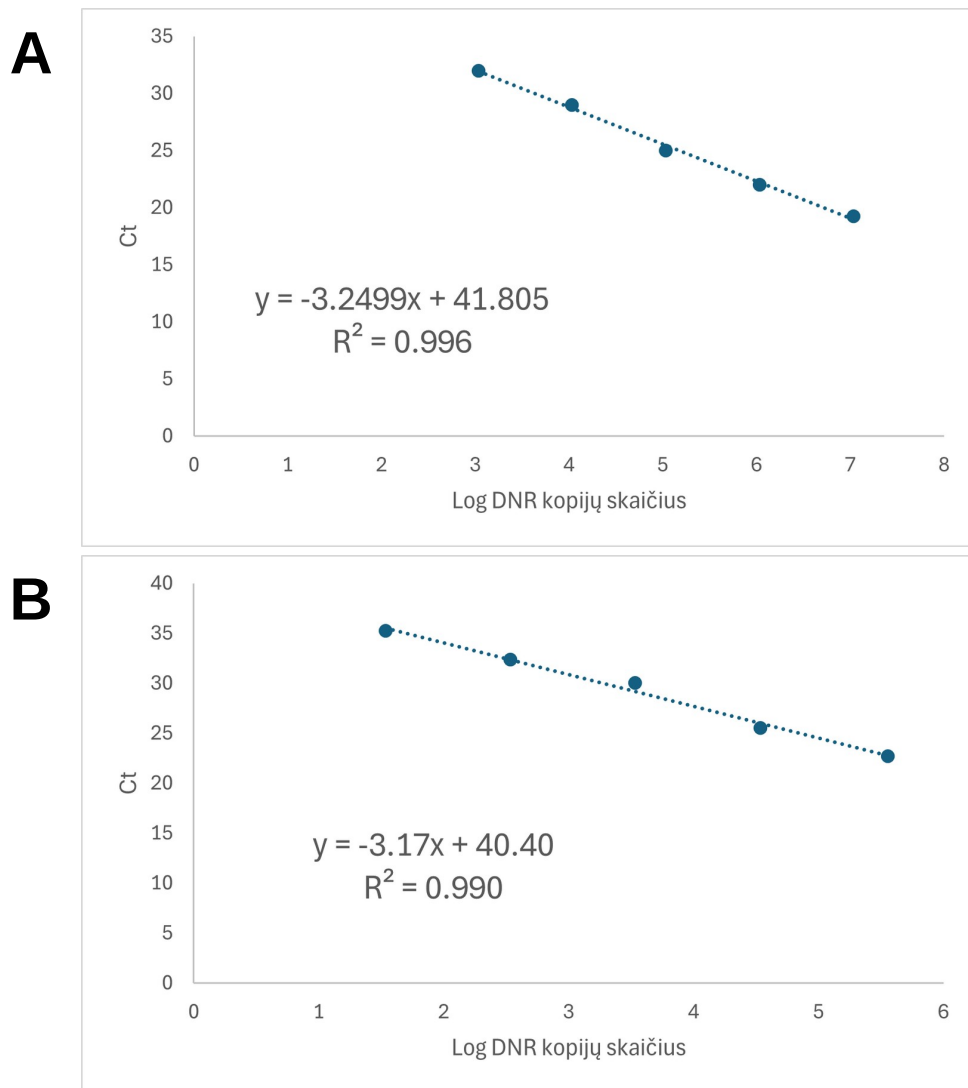
Tikėtina, kad urbanizuota aplinka ir naminių šunų ar kitų laukinių šuninių šeimos atstovų populiacija gali sukurti palankesnes sąlygas *S. cruzi* sporocistų kaupimuisi vandenyje, lyginant su *S. bovifelis*, kurio sporocistų paplitimas priklauso nuo katinių šeimos gyvūnų. Išanalizavus gautus rezultatus galima teigti, kad sporocistos į vandens telkinius patenka atsitiktinai. Tai gali priklausyti nuo meteorologinių sąlygų (kritulių intensyvumo, sniego ar ledo dangos, vėjo) ir/arba galutinių šeimininkų paplitimo, mitybinio režimo ir aktyvumo gyvenvietėje. Šio tyrimo metu gDNR buvo amplifikuota tiek iš gyvybingų, tiek iš negyvybingų sporocistų, todėl ne-

įmanoma įvertinti aptiktų vienaląsčių gyvybingumo ir užsikrėtimo rizikos. Dėl šios priežasties, siekiant nustatyti sporocistų gyvybingumą, būtina taikyti papildomus metodus, leidžiančius atskirti gyvas sporocistas nuo negyvų.

3.5. *Sarcocystis* rūšių gDNR koncentracijos įvertinimas qPGR metodu

Norint įvertinti kaip keičiasi DNR kopijų skaičius skirtingais metų laikais buvo vykdoma qPGR su *S. cruzi* ir *S. bovifelis* citochromo c oksidazės I subvieneto (*cox1*) genui specifiniais pradmenimis ir SYBR Green. *cox1* genas yra koduojamas mitochondrijose ir yra molekulinis žymuo naudojamas kalibracinių kreivių sudarymui, siekiant įvertinti parazitų koncentraciją. Dėl didelio kopijų skaičiaus mitochondrijų *cox1* genas užtikrina jautrų ir tikslų nustatymą (Gjerde, 2013).

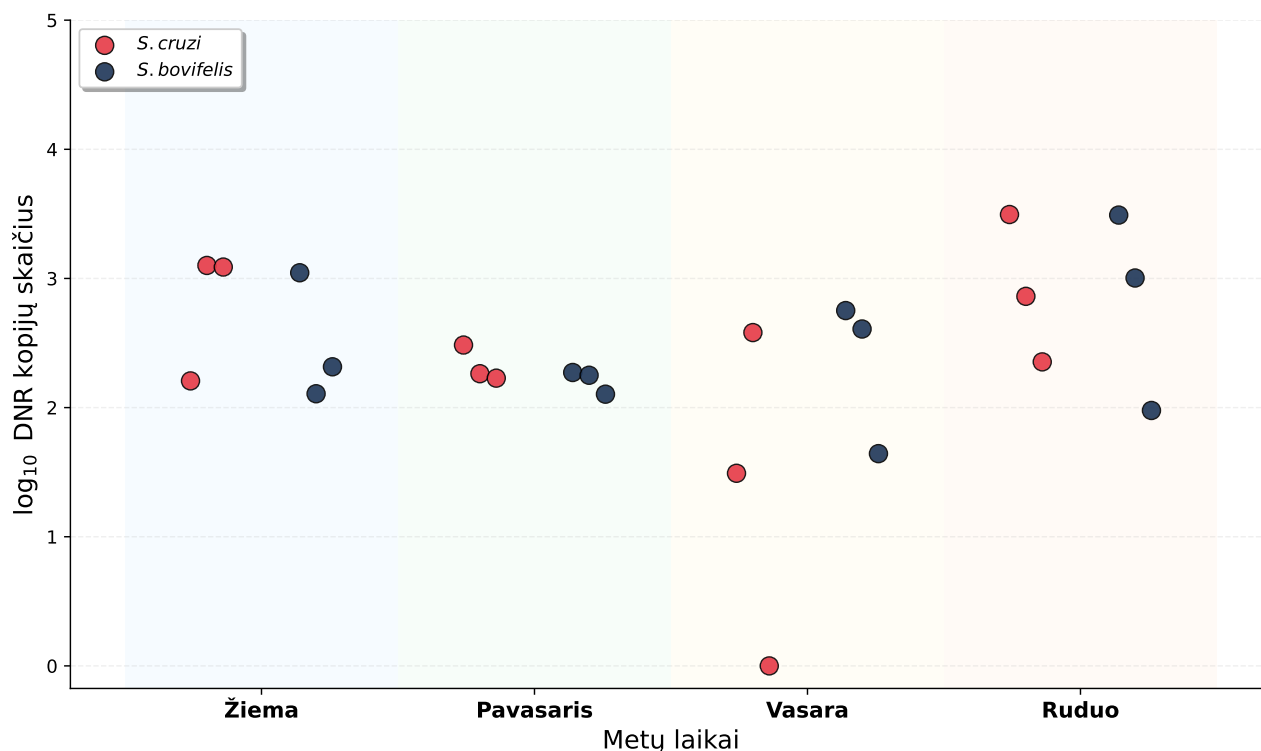
Visų pirma, buvo sudarytos kalibracinės kreivės. Kontrolinė (*S. cruzi* ir *S. bovifelis*) DNR buvo išskirta iš izoliuotų vienos rūšies sarkocistų (gautų iš Molekulinės ekologijos laboratorijos, VMTI GTC). Ši DNR buvo padauginta su specifiniais pradmenimis (*S. cruzi* – V2cr1/V2cr2, *S. bovifelis* – V2bo1/V2bo2) (1 lentelė) ir įklonuota į pJET 1.2 vektorių. Gautos rekombinantinės plazmidės padaugintos *E. coli* DH10β. Nustatyta pradinė plazmidžių koncentracija kontroliniuose mėginiuose: *S. cruzi* – 282,45 ng/μL, *S. bovifelis* – 231,95 ng/μL. Kalibracinių kreivių sudarymui buvo pasirinkti 5 taškai. Taikant serijinio skiedimo metodą *S. cruzi cox1* geno fragmentą turinčios rekombinantinės plazmidės buvo skiedžiamos nuo 1×10^{-6} iki 1×10^{-10} , o *S. bovifelis* nuo 1×10^{-5} iki 1×10^{-9} . Standartinių kreivių patikimumas įvertinamas pagal determinacijos koeficientą (R^2) ir reakcijos efektyvumą ($Eff\%$). Gautos R^2 reikšmės: *S. bovifelis* $R^2 = 0,996$ (13 pav. A), *S. cruzi* $R^2 = 0,990$ (13 pav. B). Determinacijos koeficiento reikšmės rodo aukštą tiesinę priklausomybę tarp logaritminio DNR kopijų skaičiaus ir C_t verčių. Reakcijos efektyvumo rodikliai naudojant SYBR Green patenka į rekomenduojamą optimalų 90% – 110% intervalą: *S. cruzi* $Eff\% = 106,0$, *S. bovifelis* = 104,9. Šie parametrai patvirtina, kad optimizuota qPGR sistema užtikrina aukštą preciziškumą bei analitinį jautrumą, todėl parengtos kalibracinės kreivės yra tinkamos norint nustatyti tikslų *Sarcocystis* spp. gDNR kopijų skaičių vandens mėginiuose.



13 pav. Standartinė kreivės. A – su *S. bovis* pIDNR; B – su *S. cruzi* pIDNR.

Visais metų laikais iš skirtingų Bukišio tvenkinio vietų buvo paimti trys vandens mėginiai. Trijų mėginių rinkimas iš skirtingų vandens telkinio vietų leidžia įvertinti natūralų duomenų kintamumą, bei sumažinti atsitiktinių veiksnių įtaką gautų rezultatų statistiniam patikimumui. Šių mėginių analizės metu nustatyta, kad parazitai ekosistemoje pasiskirstę netolygiai. Siekiant suvienodinti duomenų skales ir vizualizuoti skirtingų eilių dydžius, pradinės gDNR kopijų vertės buvo transformuotos į logaritminę skalę ($\log_{10}$) (14 pav.). *S. bovis* rūšis buvo sėkmingai identifikuota visuose trijuose biologiniuose pakartojimuose kiekvieno sezono metu. Didžiausias *S. bovis* DNR kopijų skaičius buvo fiksuojamas rudenį (iki 3094 kopijų), o mažiausia – vasaros laikotarpiu (43 kopijos). Išanalizavus *S. cruzi* trijų biologinių pakartojimų duomenis, nustatyta, kad didžiausias DNR kopijų skaičius taip pat buvo užfiksuotas rudens sezono metu. Šiuo sezonu gDNR kiekis mėginiuose buvo nuo 225 iki 3125 kopijų ($\log_{10} \approx 3,5$). Žiemos ir pavasario sezonais visuose trijuose mėginiuose rūšies gDNR kiekis išliko santykinai stabilus, aptinkamas DNR kopijų skaičius nuo 160 iki 1260 kopijų. Vasaros laikotarpiu užfiksuotas minimalus *S. cruzi cox1* DNR kopijų skaičius: viename iš mėginių šios rūšies gDNR nebuvo

aptikta (0 kopijų), o kituose mėginiuose nustatyta 30 ir 380 DNR kopijų.



14 pav. *Sarcocystis* spp. DNR kopijų skaičiaus sezoninė kaita.

Tikro laiko PGR buvo atliekama naudojant SYBR Green fluorescentinį dažą. Kadangi šis dažas pasižymi nespecifiniu jungimusi prie bet kurios dvigrandės DNR molekulės, jis gali sąveikauti ne tik su tiksline seka, bet ir su pradmenų dimerais ar šalutiniais reakcijos produktais. Siekiant patikrinti reakcijos specifiškumą, po amplifikacijos ciklą buvo atliekama lydymosi kreivių analizė. Šio etapo metu stebima tiriamai sekai būdinga lydymosi temperatūra, kurioje dvigrandžiai DNR produktai disocijuoja į viengrandę DNR. Tiek *S. cruzi*, tiek *S. bovifelis* rūšių lydymosi kreivėse buvo stebima po vieną temperatūros viršūnę su nežymiomis paklaidomis (6 lentelė.). Gauti rezultatai patvirtina, kad reakcijos metu buvo amplifikuojami tik tikslinės DNR fragmentai, o pašaliniai produktai nesusiformavo.

6 lentelė. *S. cruzi* ir *S. bovifelis* lydymosi kreivės viršūnės temperatūrų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai.

Rūšis	Lydymosi kreivės viršūnės temperatūra (°C)
<i>S. bovifelis</i>	80,05 ± 0,22
<i>S. cruzi</i>	80,98 ± 0,25

Siekiant įvertinti ar sezoniniai DNR kopijų skaičiaus svyravimai yra dėsningi, buvo atlikta vienfaktorinė ANOVA analizė (7 lentelė). Nepaisant vizualiai matomų koncentracijos pikių

tendencijų rudenį ir žiemą, statistinė analizė parodė, kad nė vienas sezoninis palyginimas nėra statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$). Lyginant *S. bovifelis* gDNR kiekį tarp žiemos ir pavasario sezonų, gauta $p = 0,37$ reikšmė, o atlikus visų sezonų porinę analizę pastebėta dar didesnė variacija. Pavyzdžiui, lyginant žiemos ir vasaros laikotarpius, *S. bovifelis* p reikšmė siekė net 0,70. Analogiška situacija stebima ir *S. cruzi* atveju, kur p reikšmės buvo nuo 0,12 iki 0,65.

7 lentelė. ANOVA analizės p reikšmės lyginant *Sarcocystis* spp. gDNR kiekį tarp skirtingų sezonų.

Lyginami sezonai (<i>S. cruzi</i>)	p reikšmė
Žiema / pavasaris	0,14
Pavasaris / vasara	0,56
Vasara / rudenio	0,25
Žiema / vasara	0,12
Žiema / rudenio	0,65
Pavasaris / rudenio	0,27
Lyginami sezonai (<i>S. bovifelis</i>)	p reikšmė
Žiema / pavasaris	0,37
Pavasaris / vasara	0,32
Vasara / rudenio	0,30
Žiema / vasara	0,70
Žiema / rudenio	0,38
Pavasaris / rudenio	0,24

Išanalizavus gautus rezultatus galima teigti, kad, nors tvenkinio vanduo nuolat yra veikiamas *Sarcocystis* spp. sporocistų taršos, jos intensyvumas neturi aiškiai išreikšto ir statistiškai reikšmingo sezoniškumo ($p > 0,05$). Tai rodo, kad parazitų patekimas į vandens telkinį yra atsitiktinis procesas, labiausiai priklausantis nuo aplinkos veiksnių, tokių kaip kritulių kiekis, tirpsmo vandens srautai ar galutinių šeimininkų (šunų ir kačių) fekalinės taršos dažnumas pakrantėse. Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti, kad vandens telkinio tarša sporocistomis nėra sezoninis reiškinys: mėginių rinkimas Bukiškio tvenkinyje gali būti vykdomas nepriklausomai nuo metų laiko.

3.6. Gautų duomenų apibendrinimas ir analizė

Vienaląsčiai pirmuonys vandens telkiniuose randami visame pasaulyje įvairiose ekosistemose (jūrų, pakrančių ar gėlo vandens). Vandens telkiniuose Apicomplexa tipui priklausančių vienaląsčių parazitų gDNR koncentracijos yra labai mažos, o jiems aptikti naudojami jautrūs molekuliniai detekcijos metodai: lizdinis (Monis, 2001) arba qPGR (Lotz ir kt., 2025). Lietuvoje gamtiniuose vandens mėginiuose aptinkamos *Sarcocystis* genties vienaląsčių pirmuonių rūšys, iš kurių dažniausiai identifikuojamos *S. arieticanis*, *S. cruzi* ir *S. bertrami* (Baranauskaitė ir kt., 2024). Šio darbo metu buvo siekiama įvertinti vienaląsčių parazitų įvairovę bei gyvybingumą vandens mėginiuose, bei taikant tikro laiko PGR metodą, nustatyti DNR kopijų skaičiaus dinamiką skirtingais metų laikais.

Žinodami, kad Apicomplexa tipui ir *Sarcocystis* genčiai priklausančių organizmų aptikimas yra sudėtingas dėl jų mažos koncentracijos vandens mėginiuose buvo nuspręsta nustatyti kokie eukariotiniai mikroorganizmai vyrauja Bukiškio tvenkinyje skirtingais sezonais. Šiam darbui atlikti buvo pasirinkta eDNR klonavimo/sekoskaitos strategija. Prieš tai, kitame Genetikos laboratorijoje atliktame darbe, buvo panaudota tokia pat tyrimo strategija, tačiau PGR buvo vykdomas su mėginiais gautais iš galutinių šeimininkų žarnynų (buvo skiriamos sporocistos), po klonavimo nustačius rekombinantinių plazmidžių DNR sekas didžioji dalis buvo priskirtos Apicomplexa grupės parazitiniams organizmams (pvz. *Cryptosporidium* sp., *Cystoisospora* sp., *Colpodella* sp. ir pan.). Naudojant tuos pačius universalius 18S DNR žymens pagrindu sukurtus pradmenis buvo tikimasi vandens mėginiuose aptikti *Sarcocystis* genčiai ar bent Apicomplexa tipui priklausančių parazitinių pirmuonių DNR sekas. Nustatyta, kad tirtuose vandens mėginiuose visais metų laikais dominuoja įvairūs eukariotiniai mikroorganizmai iš kurių dauguma buvo priskirti SAR supergrupei alveolatų klasteriui priklausančioms vienaląsčiams pirmuonims. Tik kelias sekas pavyko identifikuoti iki genties lygmens: *Borghiella*, *Woloszynskia* ir *Colpodella*. *Borghiella* genčiai priklausančios vienaląsčiai pirmuonys dažnai aptinkami gėlo vandens telkiniuose visoje Europoje, o jų specifinė savybė, kad tai yra šalčiamėgiai (kriofiliniai) mikroorganizmai (Moestrup ir kt., 2008). Jie vandens telkiniuose atsiranda rudenį ir gausiausiai aptinkami žiema. Mūsų darbe šios genties atstovas aptiktas pavasarį, tačiau Lietuvoje 2025 ir 2026 m. pavasaris buvo labai vėsus, tad šio eukariotinio mikroorganizmo aptikimas neatsitiktinis. *Woloszynskia* genties dinoflagelatai paplitę visame pasaulyje gėlo vandens telkiniuose. Kaip ir *Borghiella* dauguma *Woloszynskia* rūšių yra prisitaikiusios prie šalto vandens ir žiemos viduryje, kai tirpsta ledas, gali pasiekti didelį tankumą užšalusiuose paviršiniuose vandenyse (Nicholls, 2017). Mūsų darbe *Woloszynskia* sp. aptikta žiemą ir pavasarį surinktuose mėginiuose. *Colpodella* genties pirmuonys yra artimi Apicomplexa tipo parazitams. Šie vienaląsčiai maitinasi kitais pirmuoniais ir neretai aptinkami vandens telkiniuose (Zhao ir kt., 2025). Šiame darbe *Colpodella* sp. atstovai vandens mėginiuose aptikti rudens laikotarpiu. Tyrimo metu *Sarcocystis* genčiai priklausančių sekų nenustatyta. Šis rezultatas leidžia daryti keletą prielaidų apie taikytos metodikos ribotumus. Viena pagrindinių priežasčių, kodėl taikant eDNR klonavimo/sekoskaitos metodiką nebuvo aptiktos *Sarcocystis* spp. sekos gali būti nedidelė klonų imtis (po 5 klonus iš kiekvieno sezono). Atsižvelgiant į tai, kad šių parazitų koncentracija aplinkos

vandens mėginiuose įprastai yra labai maža, atsitiktinė klonų atranka galėjo būti per mažos apimties *Sarcocystis* rūšims aptikti. Kitas svarbus metodo trūkumas – pasirinkto *18S* rRNR žymens nepakankamas specifiskumas tiriamajai grupei. Gautas tirtų sekų panašumas su duomenų bazėse esančiomis sekomis buvo labai įvairus: nuo labai panašių sekų, kurių identiškas buvo 99 % iki labai mažo panašumo ≤ 90 %. Tai leidžia daryti prielaidą, kad naudota pradmenų pora nespecifiškai jungiasi prie įvairių eukariotinių mikroorganizmų eDNR, taip apsunkindama vienaląsčių pirmuonių identifikaciją žemesniuose taksoniniuose vienetuose. Vienas iš šios problemos sprendimo variantų galėtų būti kito genetinio žymens pasirinkimas arba *18S* rRNR geno amplifikuojamo fragmento prailginimas (kuo ilgesnė seka, tuo specifiškiau galima priskirti organizmą konkrečiam taksoniniam vienetai). Apibendrinant galima teigti, kad eukariotinių mikroorganizmų įvairovė vis dar menkai ištirta, ypač gėlo vandens telkiniuose.

Vienas iš pagrindinių PGR ribotumų yra negebėjimas diferencijuoti DNR, išskirtos iš gyvų ir negyvybingų mikroorganizmų. Siekiant nustatyti vienaląsčių pirmuonių gyvybingumą buvo naudojamas propidžio monoazido dažas. Po fotoaktyvacijos PMA selektyviai prisijungia prie DNR, esančios ląstelėse su pažeistomis membranomis. DNR su prisijungusiu dažu negali būti amplifikuojama atliekant PGR. Tyrimui buvo naudojama standartinė PGR su pradmenimis, amplifikuojančiais 950 bp fragmentą, o gauti rezultatai vertinami pasitelkiant ImageJ programinę įrangą elektroforetinių juostų intensyvumo analizei. Tačiau šis metodas turi keletą trūkumų. Standartinė PGR nėra optimizuota tiksliai pradinės DNR koncentracijos nustatymui, nes išsekus reagentams arba susikaupus šalutiniams produktams, DNR amplifikacijos eksponentinis augimas sustoja, todėl skirtingos pradinės koncentracijos mėginių juostos gelyje gali atrodyti vienodo intensyvumo. Tai sukelia riziką nuvertinti realius parazitų gyvybingumo skirtumus. Be to, rezultatų tikslumui didelę įtaką turi techniniai veiksniai, ypač pipetavimo paklaidos. Kadangi kiekvieno PGR ciklo metu DNR kiekis teoriškai dvigubėja, net ir minimalūs tūrio nuokrypiai ankstyvosiose stadijose gali sukelti reikšmingas galutinio produkto kiekio variacijas. Šios paklaidos dar labiau apsunkina vaizdų intensyvumo interpretaciją. Tiriant vienaląsčių pirmuonių gyvybingumą skirtingose temperatūrose buvo pasirinktos trys temperatūros: 22 °C, 4 °C, –20 °C. Šios trys temperatūros imituoja realias mėginių laikymo sąlygas – nuo nešaldytų (22 °C), atšaldomų iki 4 °C (šioje temperatūroje dažnai laikomas sukonzentruotas vandens mėginys iki eDNR skyrimo) iki užšaldomų (–20 °C laikomi mėginiai, kurie naudojami tik gDNR skyrimui), kurios gali turėti įtakos ląstelių membranų vientisumui. Kadangi PMA dažas patenka tik į ląsteles su pažeista membrana, tokia tyrimo schema suteikia galimybę įvertinti kaip temperatūros pokytis gali paveikti gyvybingumą. Be to, 22 °C temperatūra gali būti laikoma kontroline, o kitos dvi temperatūros imituoti natūralią vandens telkinio temperatūrą skirtingais sezonais. 4 °C temperatūra reprezentuoja būdingą vandens temperatūrą šaltuoju metų laiku (rudeni, žiemą ir pavasari), o –20 °C temperatūra imituoja ekstremalias žiemiško sezono sąlygas ir visišką vandens užšalimą. Išanalizavus gautus rezultatus nustatyta, kad trumpalaikis minusinės temperatūros poveikis (–20 °C) sukėlė ryškiausią gyvybingumo sumažėjimą, todėl galima daryti prielaidą, kad susidarant ledo kristalams vienaląsčių pirmuonių membranos yra pažeidžiamos. Palaikius mėginius 4 °C temperatūroje buvo stebimas nežymus

gyvybingumo sumažėjimas, todėl galima teigti, kad ši temperatūra sukelia pirmuonims šalčio stresą, tačiau membranų akivaizdžiai nepažeidžia. Tuo tarpu 22 °C temperatūroje laikytuose mėginiuose pirmuonys buvo gyvybingiausi, taigi trumpalaikis laikymas kambario temperatūroje membranų vientisumo nepažeidžia. Vienfaktorinė ANOVA analizė patvirtino, kad temperatūra turi statistiškai reikšmingą poveikį vienaląsčių gyvybingumui ($F = 26,52$, $p < 0,001$). Žema temperatūra (4 °C ir –20 °C) sumažino gyvybingumą atitinkamai 15 % ir 22 %, tačiau skirtumas tarp šių dviejų šalčio grupių nebuvo statistiškai reikšmingas ($p = 0,064$). Gauti rezultatai rodo, kad vandens telkinių vienaląščiai jautrūs net ir nedideliame vandens atšalime, tačiau tolesnis temperatūros mažėjimas nesukelia proporcingai stipresnio poveikio. Sezoniniai pirmuonių gyvybingumo skirtumai yra susiję su jų rūšine įvairove. Vienos rūšys yra atsparesnės temperatūros įtakai nei kitos, pvz., yra nustatyta, kad *Apicomplexa* tipui priklausančių parazitinių pirmuonių sporocitų sienelės yra sudarytos iš daugiasluoksnės, daug cisteino turinčių baltymų matricos su kryžminiais disulfidiniais ryšiais, užtikrinančiais atsparumą tiek mechaniniam, tiek cheminiam poveikiui (Freppel ir kt., 2019). Kitoje publikacijoje minima, kad sporocistos patekusios į aplinką yra infektyvios nepriklausomai nuo oro sąlygų ir išlieka gyvybingos aplinkoje daugelį mėnesių. Jos yra atsparios šalčiui, šilumai ir daugeliui dezinfekcinių medžiagų (įskaitant ir chlorą) (Weir ir kt., 2002).

Norint identifikuoti vandens telkiniuose esančias *Sarcocystis* rūšis ir ištirti jų aptikimą skirtingais metų laikais, buvo vykdomas lizdinis PGR metodas panaudojant rūšims specifinių pradmenų poras. Tiksliniai parazitai pasirinkti atsižvelgiant į vandens telkinio aplinką (šalia gyvenvietė ir miškas). Tyrimo metu vandens mėginiuose iš Bukiškio tvenkinio nustatytos dvi rūšys: *S. cruzi* (tarpiniai šeimininkai – galvijai, galutiniai šeimininkai – katiniai ir šuniniai gyvūnai) ir *S. bovisfelis* (tarpiniai šeimininkai – galvijai, galutiniai šeimininkai – katiniai gyvūnai). *Sarcocystis* spp. DNR vandens mėginiuose nustatyta visais metų mėnesiais, išskyrus rugpjūtį. Tikėtina, kad tai galėjo įvykti dėl gamtinių mėginių atsitiktinės imties: sporocitų koncentracija vandens telkiniuose yra labai maža, jų pasiskirstymas yra netolygus, o patekimas į vandens telkinį gali priklausyti tiek nuo meteorologinių sąlygų (kritulių intensyvumo, sniego ar ledo dangos, vėjo), tiek nuo galutinių šeimininkų buvimo bei jų aktyvumo tiriamoje aplinkoje.

Siekiant kiekybiškai įvertinti *S. cruzi* ir *S. bovisfelis* DNR kopijų skaičiaus kitimą Bukiškio tvenkinio vandenyje skirtingais metų laikais, buvo atlikta tikro laiko PGR. Taikant vienfaktorinę dispersinės analizės (ANOVA) metodą nustatyta, kad DNR kopijų skaičiaus skirtumai tarp skirtingų metų laikų yra statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$). Buvo padaryta prielaida, kad tirtų *Sarcocystis* rūšių paplitimas vandens telkinyje yra santykinai stabilus ištisus metus, todėl aplinkos mėginių surinkimas yra tikslingas ir reprezentatyvus bet kuriuo metų sezonu. Vertinant gautus rezultatus, būtina atsižvelgti į taikyto SYBR Green dažo specifiką. Priešingai nei TaqMan zondai, SYBR Green dažas nėra specifinis sekai ir jungiasi prie bet kurios dvigrandės DNR, todėl kyla nespecifinių produktų susidarymo rizika, galinti iškreipti kiekybinius rodiklius. Siekiant užtikrinti duomenų patikimumą, po kiekvienos reakcijos buvo atliekama lydimosi kreivių analizė. Tikslinių produktų lydimosi temperatūros stabilumas patvirtino, kad amplifikuota seka buvo specifinė, o pašaliniai produktai neturėjo reikšmingos įtakos galutiniams

skaičiavimams. Dar vienas svarbus veiksnys interpretuojant duomenis – pasirinktas genetinis žymuo. Šiame tyrime naudota mitochondrinio *cox1* geno seka pasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumu, tačiau genas yra daugiakopijinis. Kadangi skirtingų *Sarcocystis* rūšių genomuose *cox1* geno kopijų skaičius gali varijuoti (Xiao ir kt., 2018), tiesioginis skirtingų rūšių gausumo lyginimas pagal aptiktą kopijų skaičių nėra korektiškas. Todėl gautais duomenimis galime įvertinti kaip konkrečių rūšių DNR kopijų skaičius kinta keičiantis sezonams, tačiau negalime objektyviai palyginti skirtingų rūšių gausumo tarpusavyje.

Apibendrinant šio darbo rezultatus galime teigti, kad nors eDNR klonavimo/sekoskaitos metodika buvo sėkmingai pritaikyta identifikuojant SAR supergrupės vienaląsčių pirmuonių įvairovę Bukiškio tvenkinyje, tačiau šis metodas neefektyvus *Sarcocystis* parazitų aptikimui dėl jų mažos koncentracijos ir nepakankamo 18S rRNR žymens specifiškumo. Gyvybingumo vertinimas, atliktas naudojant standartinę PGR kartu su PMA dažu, patvirtino, kad vandens temperatūros pokyčiai daro tiesioginę įtaką pirmuonių fiziologinei būklei. Nustatyta, kad net ir nedidelis atšalimas iki 4 °C sukelia ląstelėms šalčio stresą, o ekstremalus užšalimas (–20 °C) statistiškai reikšmingai mažina jų gyvybingumą, pažeisdamas ląstelių membranų vientisumą. Tiesioginis *Sarcocystis* spp. gyvybingumo įvertinimas gamtiniuose mėginiuose išlieka sudėtingas dėl kitų mikroorganizmų didesnių genominės DNR kiekių vandens aplinkoje ir optimizuotos metodikos stokos. Tolesniems *Sarcocystis* spp. tyrimams būtų tikslinga panaudoti specifiškesnius genetinius žymenis, ilgesnius PGR fragmentus arba alternatyvius metodus, tokius kaip tekmės citometrija, kurie leistų atskirti tikslinius parazitus nuo kitų vandens telkinio mikroorganizmų ir tiksliai įvertinti jų sezoninę gyvybingumo dinamiką gamtinėje aplinkoje.

Išvados

1. Taikant molekulinis metodus, vandens mėginiuose nustatytos tiek laisvai gyvenančių vienaląsčių pirmuonių *Borghiella pascheri*, *Woloszynskia* sp., *Colpodella edax*, tiek nekultivuojamų ir taksonomiškai neapibrėžtų eukariotinių mikroorganizmų rūšys.
2. Mažėjant temperatūrai vienaląsčių pirmuonių gyvybingumas statistiškai reikšmingai mažėja.
3. Atlikus lizdinį PGR dėsningo vienaląsčių parazitų DNR aptikimo skirtingais metų laikais nenustatyta, o *S. cruzi* (83,3 %) Bukiškio tvenkinyje aptinkama dažniau nei *S. bovifelis* (66,7 %).
4. Kiekybinės analizės duomenimis, didžiausias *S. cruzi* ir *S. bovifelis* DNR kopijų skaičius nustatytas rudens laikotarpiu – atitinkamai 3125 ir 3094 kopijos, o mažiausias – vasarą – atitinkamai 0 ir 43 kopijos.
5. Sezonų kaita nedaro statistiškai reikšmingos įtakos vandenyje aptinkamų parazitinių pirmuonių *Sarcocystis cruzi* ir *Sarcocystis bovifelis* DNR kopijų skaičiui.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Modestas Petrauskas

Magistro baigiamasis darbas

**Vienaląsčių pirmuonių identifikavimas vandens mėginiuose ir jų
gyvybingumo analizė skirtingais metų laikais**

SANTRAUKA

Vienaląščiai pirmuonys yra neatsiejama vandens ekosistemų dalis, tačiau parazitinių rūšių, ypač *Sarcocystis* genties atstovų, paplitimas ir gyvybingumas skirtingais metų laikais aplinkos mėginiuose išlieka menkai ištirtas. Šio magistrinio darbo tikslas – įvertinti vienaląsčių parazitų gyvybingumą ir rūšinę įvairovę vandens mėginiuose, bei taikant tikro laiko PGR metodą, ištirti DNR kopijų skaičiaus dinamiką skirtingais metų laikais.

Tyrimas buvo vykdomas Bukiškio tvenkinyje, Vilniaus rajono savivaldybėje. Dviejų metų laikotarpyje (2024-2026) vandens mėginiai renkami iš trijų skirtingų tvenkinio vietų kas mėnesį. Vienaląsčių pirmuonių rūšinei įvairovei nustatyti taikyti eDNR klonavimo ir seko-skaitos metodai, naudojant universalų *18S* rRNR genetinį žymenį. Nustatyta, kad tirtuose vandens mėginiuose vyrauja įvairūs eukariotiniai mikroorganizmai, iš kurių daugelis priklausė SAR supergrupei. Vienaląsčių pirmuonių gyvybingumo įvertinimui taikytas propidžio monoa-zido (PMA) ir standartinės PGR metodų derinys. Buvo nustatyta, kad temperatūra statistiškai reikšmingai veikia vienaląsčių pirmuonių gyvybingumą. Mažėjant temperatūrai nuo 22 °C iki 4 °C ir –20 °C, gyvybingumas sumažėjo atitinkamai ~15 % ir ~22 %.

S. cruzi ir *S. bovis* rūšių paplitimui vandens telkinyje skirtingais metų mėnesiais vertinti naudotas lizdinis PGR metodas su rūšims specifiniais *cox1* geno pradmenimis. *S. cruzi* DNR nustatyta 10 iš 12 mėnesių mėginių (83,3 %), o *S. bovis* – 8 iš 12 (66,7 %). Rugpjūtis buvo vienintelis mėnuo, kai nė vienos rūšies DNR nenustatyta. Kiekybinei analizei taikyta tikro laiko (PGR) su SYBR Green dažu. Didžiausias DNR kopijų skaičius abiejų rūšių mėginiuose fiksuotas rudenį, tačiau vienfaktorinė ANOVA analizės rezultatai atskleidė, kad sezoniniai skirtumai yra statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$). Buvo padaryta išvada, kad *Sarcocystis* sporocistų paplitimas vandens telkinyje yra atsitiktinis, nuo sezoniškumo nepriklausantis procesas, kurį lemia lokalūs veiksniai: galutinių šeimininkų mityba, aktyvumas vandens telkinio pakrantėje ir meteorologinės sąlygos.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Modestas Petrauskas

Master's thesis

Identification of Unicellular Protozoa in Water Samples and Analysis of Their Viability at Different Times of the Year

ABSTRACT

Unicellular protozoa are an integral part of aquatic ecosystems. However, the seasonal prevalence and viability of parasitic species, particularly members of the genus *Sarcocystis*, in environmental samples remain poorly understood. The aim of this master's thesis was to evaluate the viability and species diversity of unicellular parasites in water samples and to investigate the dynamics of DNA copy numbers across different seasons using real-time PCR.

The study was conducted at Bukiškis pond, located in the Vilnius district. Over a two-year period (2024–2026), water samples were collected monthly from three distinct locations within the pond. To determine the species diversity of unicellular protozoa, eDNA cloning and sequencing methods were applied using the universal *18S* rRNA genetic marker. The analysis revealed that various eukaryotic microorganisms were prevalent in the studied water samples, the majority of which belonged to the SAR supergroup. A combination of propidium monoazide (PMA) treatment and standard PCR was used to assess the viability of the unicellular protozoa. It was determined that temperature has a statistically significant effect on the viability of these microorganisms. As the temperature decreased from 22°C to 4°C and -20°C, viability decreased by approximately 15% and 22%, respectively.

The prevalence of *S. cruzi* and *S. bovifelis* in the water body during different months of the year was evaluated using nested PCR with species-specific *cox1* gene primers. *S. cruzi* DNA was detected in samples from 10 out of 12 months (83.3%), while *S. bovifelis* was identified in 8 out of 12 months (66.7%). August was the only month in which DNA from neither species was detected. Quantitative analysis was performed using real-time PCR (qPCR) with SYBR Green dye. The highest DNA copy numbers for both species were recorded in autumn; however, one-way ANOVA results revealed that these seasonal differences were statistically non-significant ($p > 0.05$). It was concluded that the prevalence of *Sarcocystis* sporocysts in the water body is a random process independent of seasonality, driven by local factors such as the diet and activity near the shoreline of definitive hosts, as well as meteorological conditions.

Padėka

Nuoširdžiai dėkoju prof. dr. Elenai Servienei už suteiktą galimybę baigiamąjį magistro darbą rengti Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Gamtos tyrimų centro Genetikos laboratorijoje. Ypatingą padėką skiriu darbo vadovei dr. Živilei Strazdaitei-Žielienei už neįkainojamą pagalbą, profesionalius patarimus, kantrybę ir nuolatinį palaikymą viso darbo rengimo metu. Taip pat dėkoju visiems Genetikos laboratorijos kolegoms už draugišką aplinką, kolektyvines žinias ir paramą, kuri prisidėjo prie mano profesinio bei asmeninio tobulėjimo.

Literatūros sąrašas

- Adams, G. (2020, June). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48–53. doi: [10.1042/BIO20200034](https://doi.org/10.1042/BIO20200034)
- Arafa, M. I., Nagieb, B., Tawfik, M. S., Abd-El-Malek, A. M., ir Heneter, A. M. (2025, January). Study the effect of some processing methods on the viability of sarcocystis cysts by using vital staining techniques. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 15(1), 35–40.
- Badri, M., Olfatifar, M., Zaki, L., Hatam-Nahavandi, K., Modarresnia, L., Adamopoulos, I., ... Eslahi, A. V. (2026, February). Global Prevalence and Future Prediction of Sarcocystis Infection in Pigs: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Parasitologica*, 71(1), 14. doi: [10.1007/s11686-025-01204-x](https://doi.org/10.1007/s11686-025-01204-x)
- Baldursson, S., ir Karanis, P. (2011, December). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Research*, 45(20), 6603–6614. doi: [10.1016/j.watres.2011.10.013](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013)
- Baranauskaitė, A., Prakas, P., Butkauskas, D., Servienė, E., ir Strazdaitė-Žielienė, Ž. (2024, May). Diversity of Sarcocystis parasites in southeastern Baltic Sea catchment ecosystems. *Parasitology Research*, 123(5), 214. doi: [10.1007/s00436-024-08234-w](https://doi.org/10.1007/s00436-024-08234-w)
- Baranauskaitė, A., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Servienė, E., Butkauskas, D., ir Prakas, P. (2022, December). Molecular Identification of Protozoan Sarcocystis in Different Types of Water Bodies in Lithuania. *Life*, 13(1), 51. doi: [10.3390/life13010051](https://doi.org/10.3390/life13010051)
- Belli, S. I., Smith, N. C., ir Ferguson, D. J. (2006, September). The coccidian oocyst: A tough nut to crack! *Trends in Parasitology*, 22(9), 416–423. doi: [10.1016/j.pt.2006.07.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.07.004)
- Berto, B. P., McIntosh, D., ir Lopes, C. W. G. (2014, March). Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(1), 1–15. doi: [10.1590/S1984-29612014001](https://doi.org/10.1590/S1984-29612014001)
- Bezerra, T. L., Soares, R. M., ir Gondim, L. F. P. (2023, November). Sarcocystis Species (Apicomplexa, Eucoccidiorida) Parasitizing Snakes. *Parasitologia*, 3(4), 327–347. doi: [10.3390/parasitologia3040032](https://doi.org/10.3390/parasitologia3040032)
- Bock, C., Olefeld, J. L., Vogt, J. C., Albach, D. C., ir Boenigk, J. (2022, June). Phylogenetic and functional diversity of Chrysophyceae in inland waters. *Organisms Diversity & Evolution*, 22(2), 327–341. doi: [10.1007/s13127-022-00554-y](https://doi.org/10.1007/s13127-022-00554-y)
- Butz, H., ir Patócs, A. (2019). Brief Summary of the Most Important Molecular Genetic Methods (PCR, qPCR, Microarray, Next-Generation Sequencing, etc.). In P. Igaz ir A. Patócs (red.), *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes* (Vol. 111, pp. 33–52). Cham: Springer International Publishing. doi: [10.1007/978-3-030-25905-1_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-25905-1_4)

- Buxton, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: Recent advances. *Veterinary research*, 29(3-4), 289-310.
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., ir Schnetzer, A. (2012, January). Marine Protistan Diversity. *Annual Review of Marine Science*, 4(1), 467-493. doi: [10.1146/annurev-marine-120709-142802](https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142802)
- Cruaud, P., Vigneron, A., Fradette, M.-S., Dorea, C. C., Culley, A. I., Rodriguez, M. J., ir Charette, S. J. (2019, October). Annual Protist Community Dynamics in a Freshwater Ecosystem Undergoing Contrasted Climatic Conditions: The Saint-Charles River (Canada). *Frontiers in Microbiology*, 10, 2359. doi: [10.3389/fmicb.2019.02359](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02359)
- Del Campo, J., Heger, T. J., Rodríguez-Martínez, R., Worden, A. Z., Richards, T. A., Massana, R., ir Keeling, P. J. (2019, October). Assessing the Diversity and Distribution of Apicomplexans in Host and Free-Living Environments Using High-Throughput Amplicon Data and a Phylogenetically Informed Reference Framework. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2373. doi: [10.3389/fmicb.2019.02373](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02373)
- Doi, R., Oba, M., Furuya, T., Mizutani, T., ir Takemae, H. (2023). Development of a new quantification method of *Sarcocystis cruzi* through detection of the acetyl-CoA synthetase gene. *Journal of Veterinary Medical Science*, 85(1), 105-110. doi: [10.1292/jvms.22-0481](https://doi.org/10.1292/jvms.22-0481)
- Dubey, J., Howe, D., Furr, M., Saville, W., Marsh, A., Reed, S., ir Grigg, M. (2015, April). An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*, 209(1-2), 1-42. doi: [10.1016/j.vetpar.2015.01.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.026)
- Dubey, J., ir Rosenthal, B. (2023, August). Bovine sarcocystosis: *Sarcocystis* species, diagnosis, prevalence, economic and public health considerations, and association of *Sarcocystis* species with eosinophilic myositis in cattle. *International Journal for Parasitology*, 53(9), 463-475. doi: [10.1016/j.ijpara.2022.09.009](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.09.009)
- Dubey, J. P. (1976, November). A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 169(10), 1061-1078.
- Dubey, J. P., Calero-Bernal, R., Rosenthal, B. M., Speer, C. A., ir Fayer, R. (2016). *Sarcocystosis of animals and humans* (2nd ed ed.). Boca Raton: CRC press.
- Dumètre, A., ir Dardé, M.-L. (2003, December). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples? *FEMS Microbiology Reviews*, 27(5), 651-661. doi: [10.1016/S0168-6445\(03\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00071-8)
- Eiseheid, A. C. (2011, December). SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 4(1), 263. doi: [10.1186/1756-0500-4-263](https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-263)

- Emerson, J. B., Adams, R. I., Román, C. M. B., Brooks, B., Coil, D. A., Dahlhausen, K., ... Rothschild, L. J. (2017, December). Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5(1), 86. doi: [10.1186/s40168-017-0285-3](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0285-3)
- Esteban, G. F., ir Maberly, S. C. (2023, February). Introduction to the Special Issue: Bland J. Finlay: Uncovering the Unseen World of Microbes. *Protist*, 174(1), 125926. doi: [10.1016/j.protis.2022.125926](https://doi.org/10.1016/j.protis.2022.125926)
- Fayer, R. (2004, October). *Sarcocystis* spp. in Human Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 894–902. doi: [10.1128/CMR.17.4.894-902.2004](https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.894-902.2004)
- Fayer, R., Esposito, D. H., ir Dubey, J. P. (2015, April). Human Infections with *Sarcocystis* Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 295–311. doi: [10.1128/CMR.00113-14](https://doi.org/10.1128/CMR.00113-14)
- Feng, Y., Guo, R., Sang, X., Zhang, X., Li, M., Li, X., ... Jiang, T. (2023, July). A Systematic Meta-Analysis of Global *Sarcocystis* Infection in Sheep and Goats. *Pathogens*, 12(7), 902. doi: [10.3390/pathogens12070902](https://doi.org/10.3390/pathogens12070902)
- Florin-Christensen, M., ir Schnittger, L. (red.). (2018). *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Cham: Springer International Publishing. doi: [10.1007/978-3-319-70132-5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5)
- Freppel, W., Ferguson, D. J., Shapiro, K., Dubey, J. P., Puech, P.-H., ir Dumètre, A. (2019, December). Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. *The Cell Surface*, 5, 100016. doi: [10.1016/j.tcs.2018.100016](https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.100016)
- Garner, R. E., Kraemer, S. A., Onana, V. E., Huot, Y., Gregory-Eaves, I., ir Walsh, D. A. (2022, August). Protist Diversity and Metabolic Strategy in Freshwater Lakes Are Shaped by Trophic State and Watershed Land Use on a Continental Scale. *mSystems*, 7(4), e00316-22. doi: [10.1128/msystems.00316-22](https://doi.org/10.1128/msystems.00316-22)
- Gjerde, B. (2013, June). 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. doi: [10.1016/j.ijpara.2013.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.004)
- Harris, V. C., Van Vugt, M., Aronica, E., De Bree, G. J., Stijnis, C., Goorhuis, A., ir Grobusch, M. P. (2015, August). Human Extraintestinal *Sarcocystosis*: What We Know, and What We don't Know. *Current Infectious Disease Reports*, 17(8), 42. doi: [10.1007/s11908-015-0495-4](https://doi.org/10.1007/s11908-015-0495-4)
- He, L., Peng, N., Ran, Z., Rong, X., ir Chen, Z. (2026, February). qPCR-melting curve analysis in molecular diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, 581, 120753. doi: [10.1016/j.cca.2025.120753](https://doi.org/10.1016/j.cca.2025.120753)
- Heydorn, A. O., Gestrich, R., Mehlhorn, H., ir Rommel, M. (1975). Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 48(2), 73–82. doi: [10.1007/BF00389639](https://doi.org/10.1007/BF00389639)

- Hoeve-Bakker, B., Van Der Giessen, J., ir Franssen, F. (2019, October). Molecular identification targeting *cox1* and *18S* genes confirms the high prevalence of *Sarcocystis* spp. in cattle in the Netherlands. *International Journal for Parasitology*, 49(11), 859–866. doi: [10.1016/j.ijpara.2019.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.05.008)
- Honda, M., Sawaya, M., Taira, K., Yamazaki, A., Kamata, Y., Shimizu, H., ... Sugita-Konishi, Y. (2018). Effects of temperature, pH and curing on the viability of *Sarcocystis*, a Japanese sika deer (*Cervus Nippon centralis*) parasite, and the inactivation of their diarrheal toxin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(8), 1337–1344. doi: [10.1292/jvms.18-0123](https://doi.org/10.1292/jvms.18-0123)
- Hu, J. J., Huang, S., Wen, T., Esch, G. W., Liang, Y., ir Li, H. L. (2017, October). Morphology, Molecular Characteristics, and Demonstration of a Definitive Host for *Sarcocystis rommeli* from Cattle (*Bos taurus*) in China. *Journal of Parasitology*, 103(5), 471–476. doi: [10.1645/16-187](https://doi.org/10.1645/16-187)
- Kamata, Y., Saito, M., Irikura, D., Yahata, Y., Ohnishi, T., Bessho, T., ... Sugita-Konishi, Y. (2014, May). A Toxin Isolated from *Sarcocystis fayeri* in Raw Horsemeat May Be Responsible for Food Poisoning. *Journal of Food Protection*, 77(5), 814–819. doi: [10.4315/0362-028X.JFP-13-351](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-351)
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., ir Capanoglu, E. (2020, September). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. doi: [10.1002/fft2.44](https://doi.org/10.1002/fft2.44)
- Kim, M., Shapiro, K., Rajal, V. B., Packham, A., Aguilar, B., Rueda, L., ir Wuertz, S. (2021, October). Quantification of viable protozoan parasites on leafy greens using molecular methods. *Food Microbiology*, 99, 103816. doi: [10.1016/j.fm.2021.103816](https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103816)
- Kirillova, V., Prakas, P., Calero-Bernal, R., Gavarāne, I., Fernández-García, J. L., Martínez-González, M., ... Kirjušina, M. (2018, December). 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. doi: [10.1186/s13071-018-2694-y](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2694-y)
- Lamu, D., Qian, L., Hu, Z., Xu, L., Deng, S., Tao, J., ... Hu, J. (2026, January). *First identification of Sarcocystis medusiformis in Chinese sheep (Ovis aries): Morphological and molecular characterization*. In Review. doi: [10.21203/rs.3.rs-8423378/v1](https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8423378/v1)
- Lee, F. C. H. (2019, June). Finding *Sarcocystis* spp. on the Tioman Island: 28S rRNA gene next-generation sequencing reveals nine new *Sarcocystis* species. *Journal of Water and Health*, 17(3), 416–427. doi: [10.2166/wh.2019.124](https://doi.org/10.2166/wh.2019.124)
- Lotz, C. N., Schneeberger, P. H. H., Concu, M., Ali, S. M., Mrimi, E. C., ir Keiser, J. (2025, April). Implementation of real-time PCR assays for diagnosing intestinal protozoa infections. *Parasitology Research*, 124(4), 40. doi: [10.1007/s00436-025-08483-3](https://doi.org/10.1007/s00436-025-08483-3)
- Maddocks, S., ir Jenkins, R. (2017). Quantitative PCR. In *Understanding PCR* (pp. 45–52). Elsevier. doi: [10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6)

- Mahrt, J. L., ir Colwell, D. D. (1980, October). Sarcocystis IN WILD UNGULATES IN ALBERTA. *Journal of Wildlife Diseases*, 16(4), 571–576. doi: [10.7589/0090-3558-16.4.571](https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.4.571)
- Mai, K., Sharman, P. A., Walker, R. A., Katrib, M., Souza, D. D., McConville, M. J., ... Smith, N. C. (2009, March). Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2), 281–289. doi: [10.1590/S0074-02762009000200022](https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200022)
- Marciano, M. A. M., Silva, R. A., Barbosa, M. L., Ferreira, A. R. S., ir Pereira-Chiocola, V. L. (2020). Determination of the viability of Toxoplasma gondii oocysts by PCR real-time after treatment with propidium monoazide. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62, e84. doi: [10.1590/s1678-9946202062084](https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062084)
- Martin, B., Raurich, S., Garriga, M., ir Aymerich, T. (2013, April). Effect of Amplicon Length in Propidium Monoazide Quantitative PCR for the Enumeration of Viable Cells of Salmonella in Cooked Ham. *Food Analytical Methods*, 6(2), 683–690. doi: [10.1007/s12161-012-9460-0](https://doi.org/10.1007/s12161-012-9460-0)
- McKinnon, K. M. (2018, January). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1). doi: [10.1002/cpim.40](https://doi.org/10.1002/cpim.40)
- Miller, M., Gardner, I., Kreuder, C., Paradies, D., Worcester, K., Jessup, D., ... Conrad, P. (2002, July). Coastal freshwater runoff is a risk factor for Toxoplasma gondii infection of southern sea otters (Enhydra lutris nereis). *International Journal for Parasitology*, 32(8), 997–1006. doi: [10.1016/S0020-7519\(02\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00069-3)
- Moestrup, Ø., Hansen, G., ir Daugbjerg, N. (2008, January). Studies on woloszynskioid dinoflagellates III: On the ultrastructure and phylogeny of Borghiella dodgei gen. et sp. nov., a cold-water species from Lake Tovel, N. Italy, and on B. tenuissima comb. nov. (syn. Woloszynskia tenuissima). *Phycologia*, 47(1), 54–78. doi: [10.2216/07-32.1](https://doi.org/10.2216/07-32.1)
- Moniot, M., Combes, P., Costa, D., Argy, N., Durieux, M.-F., Nicol, T., ... Poirier, P. (2025, March). Simultaneous Detection of Sarcocystis hominis , S. heydorni , and S. sigmoideus in Human Intestinal Sarcocystosis, France, 2021–2024. *Emerging Infectious Diseases*, 31(3). doi: [10.3201/eid3103.241640](https://doi.org/10.3201/eid3103.241640)
- Monis, P. (2001, May). Development of a nested-PCR assay for the detection of cryptosporidium parvum in finished water. *Water Research*, 35(7), 1641–1648. doi: [10.1016/S0043-1354\(00\)00426-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00426-7)
- Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Moreno, Y., ir Alonso, J. (2022, July). Simultaneous detection of less frequent waterborne parasitic protozoa in reused wastewater using amplicon sequencing and qPCR techniques. *Journal of Environmental Management*, 314, 115029. doi: [10.1016/j.jenvman.2022.115029](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115029)
- Murata, R., Suzuki, J., Hyuga, A., Shinkai, T., ir Sadamasu, K. (2018). Molecular identification and characterization of Sarcocystis spp. in horsemeat and beef marketed in Japan. *Parasite*, 25, 27. doi: [10.1051/parasite/2018026](https://doi.org/10.1051/parasite/2018026)

- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M., ir Solera, J. (2015, January). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250. doi: [10.1016/j.cca.2014.10.017](https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017)
- Nicholls, K. H. (2017, January). Introduction to the biology and ecology of the freshwater cryophilic dinoflagellate *Woloszynskia pascheri* causing red ice. *Hydrobiologia*, 784(1), 305–319. doi: [10.1007/s10750-016-2885-5](https://doi.org/10.1007/s10750-016-2885-5)
- Olias, P., Gruber, A. D., Hafez, H. M., Heydorn, A. O., Mehlhorn, H., ir Lierz, M. (2010, February). *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. domestica) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): Light and electron microscopical characteristics. *Parasitology Research*, 106(3), 577–585. doi: [10.1007/s00436-009-1701-9](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1701-9)
- Ortiz-Álvarez, R., Triadó-Margarit, X., Camarero, L., Casamayor, E. O., ir Catalan, J. (2018, March). High planktonic diversity in mountain lakes contains similar contributions of autotrophic, heterotrophic and parasitic eukaryotic life forms. *Scientific Reports*, 8(1), 4457. doi: [10.1038/s41598-018-22835-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22835-3)
- Pedrós-Alió, C. (2006, June). Marine microbial diversity: Can it be determined? *Trends in Microbiology*, 14(6), 257–263. doi: [10.1016/j.tim.2006.04.007](https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.04.007)
- Pestechian, N., Yousefi, H. A., Kalantari, R., Jafari, R., Khamesipour, F., Keshtkar, M., ir Esmailifallah, M. (2021, June). Molecular and Microscopic Investigation of *Sarcocystis* Species Isolated from Sheep Muscles in Iran. *Journal of Food Quality*, 2021, 1–6. doi: [10.1155/2021/5562517](https://doi.org/10.1155/2021/5562517)
- Petersen, E., Vesco, G., Villari, S., ir Buffolano, W. (2010, February). What Do We Know About Risk Factors for Infection in Humans with *Toxoplasma gondii* and How Can We Prevent Infections? *Zoonoses and Public Health*, 57(1), 8–17. doi: [10.1111/j.1863-2378.2009.01278.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01278.x)
- Portella, L. P., Fernandes, F. D., Rodrigues, F. D. S., Minuzzi, C. E., Sangioni, L. A., Flores, M. M., ir 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. doi: [10.1590/s1984-29612021050](https://doi.org/10.1590/s1984-29612021050)
- Prakas, P., Butkauskas, D., Rudaitytė, E., Kutkienė, L., Sruoga, A., ir Pūraitė, I. (2016, August). Morphological and molecular characterization of *Sarcocystis taeniata* and *Sarcocystis pilosa* n. sp. from the sika deer (*Cervus nippon*) in Lithuania. *Parasitology Research*, 115(8), 3021–3032. doi: [10.1007/s00436-016-5057-7](https://doi.org/10.1007/s00436-016-5057-7)
- Prakas, P., Kutkienė, L., Butkauskas, D., Sruoga, A., ir Žalakevičius, M. (2014, January). Description of *Sarcocystis lari* sp. n. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the great black-backed gull, *Larus marinus* (Charadriiformes: Laridae), on the basis of cyst morphology and molecular data. *Folia Parasitologica*, 61(1), 11–17. doi: [10.14411/fp.2014.002](https://doi.org/10.14411/fp.2014.002)

- Prakas, P., Strazdaitė-Žielienė, Z., Januškevičius, V., Chiesa, F., Baranauskaitė, A., Rudaitytė-Lukošienė, E., ... Butkauskas, D. (2020, December). 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. doi: [10.1186/s13071-020-04473-9](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04473-9)
- Qin, Y., Xiong, R., Zhao, Y., Zhang, Z., ir Yin, Y. (2025, June). An Integrated PMA Pretreatment Instrument for Simultaneous Quantitative Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in Aquatic Products. *Foods*, *14*(13), 2166. doi: [10.3390/foods14132166](https://doi.org/10.3390/foods14132166)
- Reed, S., Furr, M., Howe, D., Johnson, A., MacKay, R., Morrow, J., ... Witonsky, S. (2016, March). Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *30*(2), 491–502. doi: [10.1111/jvim.13834](https://doi.org/10.1111/jvim.13834)
- Reyneke, B., Ndlovu, T., Khan, S., ir Khan, W. (2017, October). Comparison of EMA-, PMA- and DNase qPCR for the determination of microbial cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(19), 7371–7383. doi: [10.1007/s00253-017-8471-6](https://doi.org/10.1007/s00253-017-8471-6)
- Robertson, J., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F., ir Swift, S. (2019, April). Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 801. doi: [10.3389/fmicb.2019.00801](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00801)
- Rosenthal, B. M. (2021, May). Zoonotic Sarcocystis. *Research in Veterinary Science*, *136*, 151–157. doi: [10.1016/j.rvsc.2021.02.008](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.02.008)
- Rudaitytė-Lukošienė, E. (2020). *SARCOCYSTIS SPECIES RICHNESS IN MEMBERS OF THE FAMILY CERVIDAE* (Unpublished doctoral dissertation). Vytautas Magnus University, Vilnius.
- Rudaitytė-Lukošienė, E., Prakas, P., Butkauskas, D., Kutkienė, L., Vepškaitė-Monstavičė, I., ir Servienė, E. (2018, May). Morphological and molecular identification of *Sarcocystis* spp. from the sika deer (*Cervus nippon*), including two new species *Sarcocystis frondea* and *Sarcocystis nipponi*. *Parasitology Research*, *117*(5), 1305–1315. doi: [10.1007/s00436-018-5816-8](https://doi.org/10.1007/s00436-018-5816-8)
- Salazar-Ardiles, C., Asserella-Rebollo, L., ir Andrade, D. C. (2022, January). Free-Living Amoebas in Extreme Environments: The True Survival in our Planet. *BioMed Research International*, *2022*(1), 2359883. doi: [10.1155/2022/2359883](https://doi.org/10.1155/2022/2359883)
- Savini, G., Robertson, I., ir Dunsmore, J. (1996, December). Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. *Veterinary Parasitology*, *67*(3-4), 153–160. doi: [10.1016/S0304-4017\(96\)01046-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01046-1)
- Schwendener, S., Flury, M., Jenzer, J., Thurnheer, T., ir Karygianni, L. (2025, June). PMA-qPCR to quantify viable cells in multispecies oral biofilm after disinfectant treatments. *Biofilm*, *9*, 100281. doi: [10.1016/j.biofilm.2025.100281](https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2025.100281)

- Shahari, S., Tengku-Idris, T. I. N., Fong, M. Y., ir Lau, Y. L. (2016, December). Molecular evidence of *Sarcocystis nesbitti* in water samples of Tioman Island, Malaysia. *Parasites & Vectors*, 9(1), 598. doi: [10.1186/s13071-016-1883-9](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1883-9)
- Shams, M., Shamsi, L., Asghari, A., Motazedian, M. H., Mohammadi-Ghalehbin, B., Omidian, M., ... Sadrebazzaz, A. (2022, September). Molecular Epidemiology, Species Distribution, and Zoonotic Importance of the Neglected Meat-Borne Pathogen *Sarcocystis* spp. in Cattle (*Bos taurus*): A Global Systematic Review and Meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 67(3), 1055–1072. doi: [10.1007/s11686-022-00563-z](https://doi.org/10.1007/s11686-022-00563-z)
- Sidstedt, M., Rådström, P., ir Hedman, J. (2020, April). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2009–2023. doi: [10.1007/s00216-020-02490-2](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2)
- Singer, D., Seppey, C. V., Lentendu, G., Dunthorn, M., Bass, D., Belbahri, L., ... Lara, E. (2021, January). Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems. *Environment International*, 146, 106262. doi: [10.1016/j.envint.2020.106262](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106262)
- Sneideris, D., Stalpes, M., Butkauskas, D., ir Prakas, P. (2022, July). A novel RFLP method for identification of morphologically similar avian *Sarcocystis* species. *Parasitology Research*, 121(7), 2161–2166. doi: [10.1007/s00436-022-07553-0](https://doi.org/10.1007/s00436-022-07553-0)
- Strazdaitytė-Žielienė, Z., Baranauskaitė, A., Butkauskas, D., Servienė, E., ir Prakas, P. (2022, August). Molecular Identification of Parasitic Protozoa *Sarcocystis* in Water Samples. *Veterinary Sciences*, 9(8), 412. doi: [10.3390/vetsci9080412](https://doi.org/10.3390/vetsci9080412)
- Tajadini, M., Panjehpour, M., ir Javanmard, S. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*, 3(1), 85. doi: [10.4103/2277-9175.127998](https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998)
- Tang, K., Lamu, D., Qin, T., Liao, Z., Zhang, M., Wu, Z., ... Hu, J. (2023, November). Prevalence and Genetic Characterization of Morphologically Indistinguishable *Sarcocysts* of *Sarcocystis cruzi* in Cattle and *Sarcocystis poephagicanis* in Yaks. *Diversity*, 15(11), 1136. doi: [10.3390/d15111136](https://doi.org/10.3390/d15111136)
- Tekgöl, Z. B., ir Adıgüzel, A. (2025, December). Microbial viability assessment with PMA-qPCR: Challenges, opportunities, and future directions. *Archives of Microbiology*, 207(12), 343. doi: [10.1007/s00203-025-04552-4](https://doi.org/10.1007/s00203-025-04552-4)
- Thomas, V., ir Dissanaïke, A. (1978, January). Antibodies to *Sarcocystis* in Malaysians. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(3), 303–306. doi: [10.1016/0035-9203\(78\)90211-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90211-0)

- Toaleb, N. I., Shaapan, R. M., Elaadli, H., Abdel Megeed, K. N., ir Aboelsoued, D. (2025, July). Sarcocystis species: Molecular identification and seroprevalence in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *BMC Veterinary Research*, 21(1), 482. doi: [10.1186/s12917-025-04933-3](https://doi.org/10.1186/s12917-025-04933-3)
- Van Holm, W., Ghesquière, J., Boon, N., Verspecht, T., Bernaerts, K., Zayed, N., ... Teughels, W. (2021, February). A Viability Quantitative PCR Dilemma: Are Longer Amplicons Better? *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), e02653-20. doi: [10.1128/AEM.02653-20](https://doi.org/10.1128/AEM.02653-20)
- Wang, H., ir Turechek, W. W. (2020, April). Detection of Viable *Xanthomonas fragariae* Cells in Strawberry Using Propidium Monoazide and Long-Amplicon Quantitative PCR. *Plant Disease*, 104(4), 1105–1112. doi: [10.1094/PDIS-10-19-2248-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2248-RE)
- Wassermann, M., Raisch, L., Lyons, J. A., Natusch, D. J. D., Richter, S., Wirth, M., ... Jäkel, T. (2017, November). Examination of Sarcocystis spp. of giant snakes from Australia and Southeast Asia confirms presence of a known pathogen – Sarcocystis nesbitti. *PLOS ONE*, 12(11), e0187984. doi: [10.1371/journal.pone.0187984](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187984)
- Weir, S. C., Pokorny, N. J., Carreno, R. A., Trevors, J. T., ir Lee, H. (2002, May). Efficacy of Common Laboratory Disinfectants on the Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2576–2579. doi: [10.1128/AEM.68.5.2576-2579.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2576-2579.2002)
- Wieser, S. N., Giuliano, S. M., Reategui Ordoñez, J., Barriga Marcapura, X., Olivera, L. V. M., Chavez Fumagalli, M. A. C., ... Florin-Christensen, M. (2024, February). Sarcocystis spp. of New and Old World Camelids: Ancient Origin, Present Challenges. *Pathogens*, 13(3), 196. doi: [10.3390/pathogens13030196](https://doi.org/10.3390/pathogens13030196)
- Wolf-Baca, M., ir Siedlecka, A. (2019, August). Detection of pathogenic bacteria in hot tap water using the qPCR method: Preliminary research. *SN Applied Sciences*, 1(8), 840. doi: [10.1007/s42452-019-0533-1](https://doi.org/10.1007/s42452-019-0533-1)
- Wynne, J. W., Rusu, A. G., Maynard, B. T., Rigby, M. L., ir Taylor, R. S. (2024, December). Dead reckoning of protist viability with propidium monoazide (PMA)-quantitative PCR; a case study using *Neoparamoeba perurans*. *Protist*, 175(6), 126068. doi: [10.1016/j.protis.2024.126068](https://doi.org/10.1016/j.protis.2024.126068)
- Xiao, P., Niu, L., Zhao, Q., Chen, X., Wang, L., Li, L., ... Zhong, T. (2018). New insights into mitogenomic phylogeny and copy number in eight indigenous sheep populations based on the ATP synthase and cytochrome c oxidase genes. *Animal*, 12(7), 1341–1349. doi: [10.1017/S175173111700297X](https://doi.org/10.1017/S175173111700297X)
- Xue, B., Zhang, H., Yan, X., Su, X., Zhou, Y., Xie, J., ... Li, L. (2025, May). A TaqMan qPCR for precise detection and quantification of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 15(1), 16728. doi: [10.1038/s41598-025-96960-1](https://doi.org/10.1038/s41598-025-96960-1)

- Yuan, G., Chen, Y., Wang, Y., Zhang, H., Wang, H., Jiang, M., ... Yuan, S. (2024, April). Responses of Protozoan Communities to Multiple Environmental Stresses (Warming, Eutrophication, and Pesticide Pollution). *Animals*, 14(9), 1293. doi: [10.3390/ani14091293](https://doi.org/10.3390/ani14091293)
- Zhang, Y., Chen, J., Pan, H., Ma, X., Jiang, L., Zhu, Q., ... Wang, Z. (2022, April). Development and Preliminary Application of a Triplex Real-Time Quantitative PCR Assay for the Simultaneous Detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 888529. doi: [10.3389/fmicb.2022.888529](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.888529)
- Zhao, Y., Cao, Z., Li, S., Du, C., ir Jiang, J. (2025, August). Biological characteristics and epidemiological insights into the zoonotic potential of *Colpodella* spp.: A scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, 14(1), 91. doi: [10.1186/s40249-025-01361-1](https://doi.org/10.1186/s40249-025-01361-1)
- Zhendong, W., Hao, Y., Lumen, C., ir Yufeng, L. (2025, December). Establishment of a TaqMan multiplex quantitative PCR method for detecting three different serovars of *Glaesserella parasuis* serovars 5/12, 7 and 11. *BMC Veterinary Research*, 22(1), 8. doi: [10.1186/s12917-025-05165-1](https://doi.org/10.1186/s12917-025-05165-1)
- Zheng, Y., Sun, J., Li, X., Qiu, H., Liao, L., ir He, S. (2025, April). Cell viability assessment by using GelRed/SYTO 9-based double staining. *Methods and Applications in Fluorescence*, 13(2), 025001. doi: [10.1088/2050-6120/ad4a4e](https://doi.org/10.1088/2050-6120/ad4a4e)

Priedai

Priedas A. Mokslinių pasiekimų sąrašas

1. Ucar, A. M., Paliovkinas, D., Strazdaitė-Žielienė, Ž., **Petrauskas, M.**, Servienė, E., & Lukša-Žebelovič, J. (2026). Cross-Kingdom Antagonistic Interactions Between Environmental Antibiotic-Resistant Bacteria and Yeasts in Pastoral Ecosystems. *Microorganisms*, 14(5), 991. <https://doi.org/10.3390/microorganisms14050991>
2. Baranauskaitė, A., Prakas, P., **Petrauskas, M.**, Rubiola, S., Servienė, E., & Strazdaitė-Žielienė, Ž. (2025). Detection of Sarcocystis parasites in environmental samples from Lithuanian farms. *Food and Waterborne Parasitology*, 39, e00267. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2025.e00267>
3. **Petrauskas M.**, Prakas P., Servienė E., Strazdaitė-Žielienė Ž. Determination of the viability of *Sarcocystis* spp. oocysts by real-time PCR after treatment with propidium monoazide. 2025. „International conference The COINS 2025“, March 17-20, Vilnius, Lithuania. Book of Abstracts, 64.
4. **Petrauskas M.**, Prakas P., Servienė E., Strazdaitė-Žielienė Ž. Conditional efficiency of propidium monoazide in real-time PCR-based viability testing of *Sarcocystis* spp. oocysts. 2025. „FEBS3+ Baltics“, April 23-25, Vilnius, Lithuania. Book of Abstracts, 126.

Priedas B. Publikacijos sertifikatas 2026



Priedas C. Mokslinio straipsnio santrauka 2026



microorganisms



Article

Cross-Kingdom Antagonistic Interactions Between Environmental Antibiotic-Resistant Bacteria and Yeasts in Pastoral Ecosystems

Alper Melih Ucar ^{1,2}, Deividas Paliokinas ^{1,2}, Živilė Strazdaitė-Žielienė ¹, Modestas Petrauskas ¹, Elena Servienė ^{1,2,*} and Juliana Lukša-Žebelovič ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Genetics, State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Akademijos Str. 2, LT-08412 Vilnius, Lithuania

² Department of Chemistry and Bioengineering, Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical University (VILNIUS TECH), Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius, Lithuania

* Correspondence: elena.serviene@gamtc.lt (E.S.); juliana.luksa@gamtc.lt (J.L.-Ž.)

Abstract

Pasture-based farming systems remain understudied as a source of antibiotic-resistant bacteria and antagonistic yeasts under low-input management. In this study, soil, feed, and freshwater samples from Lithuanian farms were analyzed to characterize resistance phenotypes and inhibitory interactions among cultivable microorganisms. Bacterial and yeast isolates, representing 14 and 9 genera, respectively, were identified using molecular methods. Bacterial isolates recovered under antibiotic-selective conditions exhibited resistance to at least one of four antibiotics (ampicillin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol), with 41% showing multidrug resistance and the highest frequencies observed for ampicillin (59%) and streptomycin (48%). Microbial distribution was habitat-specific, with soil containing the highest diversity of antibiotic-resistant bacteria and feed samples harboring the greatest abundance of yeasts. Functional assays demonstrated consistent antagonistic activity of several *Wickerhamomyces anomalus* strains against susceptible yeasts and antibiotic-resistant *Bacillus* spp. These findings highlight the coexistence of resistance and antagonistic traits in pasture-associated microbiota and suggest their potential interaction under controlled conditions.

Keywords: antibiotic-resistant bacteria; agricultural ecosystems; antagonistic yeast; microbial interactions; biocontrol yeast

Priedas D. Mokslinio straipsnio santrauka 2025

Food and Waterborne Parasitology 39 (2025) e00267



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Waterborne Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fawparDetection of *Sarcocystis* parasites in environmental samples from Lithuanian farms[☆]Agnė Baranauskaitė^{a,*}, Petras Prakas^a, Modestas Petrauskas^a, Selene Rubiola^b, Elena Servienė^a, Živilė Strazdaite-Žielienė^a^a State Scientific Research Institute Nature Research Centre, Akademijos st. 2, Vilnius 08412, Lithuania^b Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Grugliasco, Torino 10095, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Sarcocystis
Environmental samples
Zoonotic transmission
Molecular detection
cox1

ABSTRACT

Most studies on apicomplexan *Sarcocystis* spp. in domestic animals have primarily focused on examining animal carcasses using both morphological and molecular methods. However, to accurately assess the risk of *Sarcocystis* infections in livestock and to develop effective prevention strategies, it is essential to investigate the environmental reservoirs of these parasites. The aim of this study was to identify *Sarcocystis* species with domestic animals as intermediate hosts by analysing environmental samples (water, hay, and soil) collected from Lithuanian farms and to compare their occurrence across different sample types. In total, 90 environmental samples were collected over 3 years and analysed for the presence of *Sarcocystis* spp. using nested polymerase chain reactions targeting the *cox1* gene. The results indicated that livestock are most likely to acquire infections via the ingestion of contaminated water or feed, while soil posed a lower risk of transmission. An assessment of species distribution across sampled farms revealed that the type of livestock raised did not influence the diversity of *Sarcocystis* spp. Notably, at least six of seven target species (*S. arieticanis*, *S. bertrami*, *S. bovifelis*, *S. capracanis*, *S. cruzi*, *S. miescheriana*, *S. tenella*) were detected at least once on eight of 10 farms. Additionally, two zoonotic *Sarcocystis* species, *S. hominis* and *S. suihominis*, were identified in environmental samples. This study emphasises the potential risk of livestock infection through contaminated environmental and feed sources and highlights the critical role of environmental monitoring in preventing the transmission of *Sarcocystis* spp. to farm animals.

Priedas E. Tarptautinės konferencijos „The COINS 2025“ sertifikatas



International Conference
The COINS 2025
March 17th-20th

Certificate Of Excellence
Certificate is presented to:

MODESTAS PETRAUSKAS

For participating in the International Life Sciences Conference "The COINS 2025" and for delivering an excellent poster presentation, receiving more than 85% of the total score based on the evaluation criteria.

Executive Project Manager
Aistė Židonytė

Priedas F. Tarptautinės konferencijos „FEBS3+ Baltics“ sertifikatas



FEBS3+ Baltics
Biochemistry at the Fore Line

April 23-25, 2025



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

Modestas Petrauskas

has participated in conference
FEBS3+ Baltics: Biochemistry at the Fore Line

Vilnius, Lithuania,
April 23-25, 2025

Chair of organizing committee
President of Lithuanian Biochemical Society
prof. Saulius Serva

SERVA