Genska tipizacija arhiviranih uzoraka nedeterminiranih trakavica i njihovih larvalnih stadija iz domaćih i divljih životinja sekvenciranjem nad i cox gena

Živković, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:710707

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

MONIKA ŽIVKOVIĆ

GENSKA TIPIZACIJA ARHIVIRANIH UZORAKA NEDETERMINIRANIH TRAKAVICA I NJIHOVIH LARVALNIH STADIJA IZ DOMAĆIH I DIVLJIH ŽIVOTINJA SEKVENCIRANJEM NAD I COX GENA

Diplomski rad

Zagreb, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, pod stručnim vodstvom mentora prof. dr. sc. Tatjane Živičnjak i dr. sc. Relje Becka.

Predstojnici:

1. Izv. prof. dr. sc. Dagny Stojčević Jan, Veterinarski fakultet
2. Dr. sc. Relja Beck DVM, Hrvatski veterinarski institut

Mentori:

1. Prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak
2. Dr. sc. Relja Beck DVM

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Dagny Stojčević Jan
2. Prof. dr. sc. Tatjana Živičnjak (mentorica)
3. Dr. sc. Relja Beck DVM (mentor)
4. Doc. dr. sc. Franjo Martinković (zamjena)

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Tatjani Živičnjak i dr. sc. Relji Becku, na strpljenju, pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i cijelom Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti Veterinarskog fakulteta kao i svim djelatnicima Hrvatskog veterinarskog instituta i predivnom osoblju u Laboratoriju za parazitologiju.

Posebne zahvale Dariji Jurković i Mariji Cvetnić na velikoj pomoći u procesu provedbe istraživanja.

Zahvaljujem se i svojim najbližima, posebno majci Staži Živković na pruženoj potpori tijekom cjelokupnog školovanja.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

COX - odsječak citokrom c oksidaze mitohondrijske DNK

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

mtDNK – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NAD – odsječak NADH mitohondrijske DNK

NADH – dihidronikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaza

LPR (*PCR*) – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

pr.br. (pristupni broj) - broj dostupnih DNK sekvenci u banci gena (*GenBank*®)

s - sekunda

s.l. - sensu lato

s.s. - sensu stricto

POPIS PRILOGA

SLIKE

Slika 1. Jajašca trakavica roda *Moniezia*.....3

Slika 2. Jajašce trakavica porodice Taenidae („tenidni tip“).....3

Slika 3. Kukice za fiksaciju trakavice *Taenia martis*.....5

TABLICE

Tablica 1. Rezultati morfološke determinacije i molekularne analize dobivenih sekvenci adulta izoliranih iz tankih crijeva nositelja.....15

Tablica 2. Rezultati morfološke determinacije i molekularne analize sekvenci larvalnih oblika trakavica iz tkiva posrednika.....16

Tablica 3. Nove sekvence 17

Tablica 4. Molekularno determinirane vrste trakavica po skupinama nositelja i posrednika..... 17

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1

1.1. Sistematika i razvojni ciklus trakavica.....2

1.2. Morfologija trakavica.....4

1.3. Opći i specifični ciljevi rada.....5

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA..... 6

2.1. Rod *Moniezia*..... 6

2.2. Rod *Mesocestoides*.....6

2.3. Rod *Taenia*..... 7

2.4. Rod *Echinococcus*.....9

2.5. Rod *Raillietina*..... 10

3. MATERIJALI I METODE..... 10

3.1. Uzorci.....10

3.2. Izolacija DNK 11

3.3. Lančane reakcije polimerazom.....11

3.3.1. Korišteni protokoli..... 11

3.4. Uspješnost umnažanja i sekvenciranje.....12

4. REZULTATI.....13

5. RASPRAVA.....18

5.1. Zaključci.....22

6. LITERATURA.....24

7. SAŽETAK.....35

8. SUMMARY..... 36

9. ŽIVOTOPIS..... 37

1. UVOD

Trakavice su endoparaziti, dorzoventralno plosnatog, izduženog i člankovitog tijela. Svi stadiji parazita su nametnički i ciklus je indirektan (HOBERG, 2002.; SAARI i sur., 2018.). Parazitiraju u tankom crijevu nositelja, a larvalni oblici se nalaze smješteni u različitim tkivima i organima jednog ili više posrednika. Nositelji su kralježnjaci, a posrednici razne vrste beskralježnjaka i kralježnjaka (GUNN i PITT, 2012.). Izvor invazije za posrednike su embrionirana jajašca u izmetu nositelja, kao i kontaminirana hrana ili voda, a za nositelja organi i tkiva posrednika sa larvalnim oblicima (BOWMAN, 2013.).

Značajne su za veterinarsku i humanu medicinu jer parazitiraju kod ljudi i životinja uzrokujući bolesti i ekonomske gubitke (HOBERG, 2002.). Parazitiranje trakavica u crijevima nositelja je često supkliničko (AUER i ASPÖCK , 2014.), ali kod jakih invazija i u mlađih kategorija, osim oduzimanja hranjivih tvari i posljedičnog mršavljenja mogu uzrokovati opstruktivni ileus i perforaciju crijeva (SOULSBI, 1986). Štetni učinak larvalnih oblika trakavica ovisi o njihovom broju i veličini, vrsti posrednika te o organu u kojem se nalaze, a mogu i ugroziti život posrednika (BOWMAN, 2013.).

Diagnostika trakavičavosti za života temelji se na nalazu gravidnih članaka ili jajašaca tijekom parazitološke koprološke pretrage i mikroskopske identifikacije tipa jajašaca ovisno o rodu trakavica (SAARI i sur, 2018.). U dijagnostici se može koristiti i imunoenzimni test za otkrivanje koproantigena (BOWMAN, 2013.). Postmortalno se kod nositelja pretražuju crijeva s ciljem nalaza trakavica. Morfološki kriteriji koji se koriste u determinaciji vrsta trakavica su složeni i zahtijevaju veliko iskustvo, a trakavice se tako najčešće determinira do razine roda (AL-SABI i KAPEL, 2011.; ROELFSEMA i sur., 2016.). Tkiva i organe posrednika treba pretražiti postmortalno da bi se pronašlo larvalne stadije (BOWMAN, 2013.), a morfološka determinacija larvalnih stadija je još zahtjevnija (HRČKOVA i sur., 2011.; REPERANT, 2009.). Molekularnim je metodama moguće pouzdanije dokazivanje vrste trakavica (AL-SABI i sur.; 2018.; NGUYEN i sur., 2016.; SAARI, 2018.), a sekvenciranje specifičnih odsječaka gena omogućilo je i otkrivanje novih vrsta (WAESCHENBACH i sur., 2012.). Za razlikovanje vrsta trakavica molekularnim metodama koriste se analize brojnih genskih markera, a najčešće se primjenjuje

sekvenciranje različitih gena mitohondrijske DNK (mtDNK) (WANSHONG i sur., 2013.).

1.1. Sistematika i razvojni ciklus trakavica

Trakavice pripadaju koljenu Platyhelminthes, razred Cestoda. Razred je podijeljen u 18 redova, a u humanoj i veterinarskoj medicini bitni su redovi Cyclophyllidea i Diphyllobothriidea (HOBERG, 2002.). Trakavice reda Diphyllobothriidea u svojem razvojnom ciklusu imaju „vodenu fazu" i prvi posrednici su račići i rakovi, a drugi su ribe, glavonošci ili gmazovi. (BOWMAN, 2013.). Trakavicama reda Cyclophilidea je ciklus vezan isključivo za kopnene kralježnjake, a značajne porodice su: Anoplocephalidae, Dipylidiidae, Davaineidae, Hymenolepididae, Mesocestoididae i Taeniidae (AL QUARISHY i sur.; 2019.; BOBES i sur., 2013.; HOBERG, 2002.).

Nositelji trakavica reda Cyclophyllidea su isključivo kralježnjaci, a posrednici mogu biti kralježnjaci (Taeniidae) ili člankonošci (Anoplocephalidae, Dipylidiidae, Hymenolepididae) (BOWMAN, 2013.). Rod *Mesocestoides* je specifičan, jer su mu za razvoj potrebna dva posrednika. Prvi posrednik još nije u potpunosti poznat (pretpostavlja se da je člankonožac), a drugi su različiti kralježnjaci, kao sisavci, ptice i gmazovi (LITERÁK i sur., 2004.; McALLISTER i sur., 1991.).

Kod reda Cyclophyllidea, ovisno o vrsti trakavice, postoji šest tipova larvalnih oblika. Trakavicama iz roda *Anoplocephala, Moniezia* i *Dipylidium*, posrednici su člankonošci, a u njima je larvalni stadij cisticerkoid (AUER i ASPÖCK, 2014.; SPASKII, 1951.). Cisticerkoid se razvija i u prvom posredniku kod roda *Mesocestoides*, a u drugom posredniku se razvija tetratiridij (ETGES, 1991.; LOOS-FRANK, 1991.; RAUSCH i sur., 1994.). Kod trakavica iz roda *Taenia* postoji više larvalnih oblika ovisno o vrsti: cisticerkus, cenurus i strobilocerkus (HOBERG, 2002.). Larvalni oblik trakavica iz roda *Echinococcus* je ehinokokova cista, a može biti alveolarna (*Echinococcus multilocularis*) ili cistična (*Echinococcus granulosus*) (BOWMAN, 2013.).

Trakavice su pričvršćene za stijenku crijeva nositelja i vrat konstantno proizvodi nove članke. U gravidnim člancima, koji se otkidaju i izlaze pasivno izmetom ili aktivnom migraciom kroz anus, nalaze se embrionirana jajašca (Slika 1. i Slika 2.) koja su invazijski stadij za posrednika (SAARI i sur., 2018.).

Slika 1. Jajašca trakavica roda *Moniezia* (označene strelicom), povećanje 400x

Izvor: dr. sc. Relja Beck, Hrvatski Veterinarski Institut

Slika 2. Jajašce trakavica porodice *Taenidae* („tenidni tip“), povećanje 400x

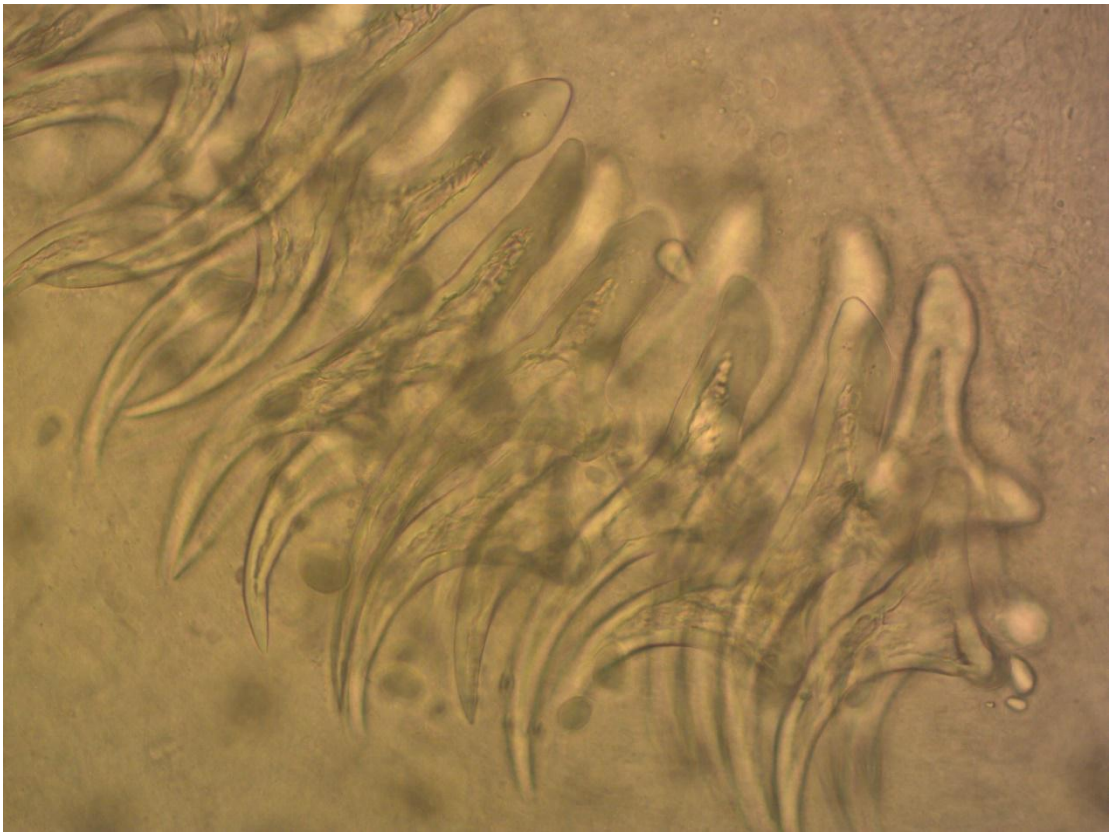
Izvor: dr. sc. Relja Beck, Hrvatski Veterinarski Institut

Posrednik mora unijeti embrionirana jajašca u kojima se nalazi invazijski embrij (onkosfera) (HOBERG, 2002.). Onkosfera ima šest kukica („heksakatni embrij") i nekoliko ovojnica (embriofora) (BOWMAN, 2013.). U probavnom traktu posrednika pod utjecajem probavnih enzima onkosfere se oslobađaju iz embriofore, te kroz stijenku crijeva ulaze u krvotok ili limfotok, te budu razneseni po organizmu (SAARI i sur., 2018.). Ovisno o vrsti trakavice onkosfere će se zadržati u različitim organima ili tkivima (jetri, muskulaturi, mozgu itd.) te započeti rast i razvoj larvalnog stadija (ROELFSEMA i sur., 2016.). Ciklus se zaokružuje kada nositelj unese organe ili tkiva sa larvalnim oblicima iz kojih se razviju trakavice u crijevima (HOBERG, 2002.).

1.2. Morfologija trakavica

Tijelo trakavice *(strobila,* lat.) je izduženo i počinje glavicom *(scolex*, lat.*)*, na kojoj se nalazi više ili manje organa za fiksaciju (rilo, kukice i siske) (SAARI i sur., 2018.). Četiri siske (*acetabula*, lat.) su kružno raspoređene, a na vrhu glavice je rilo (*rostellum*, lat.), mišićni organ oko kojeg se može nalaziti jedan ili više redova ili vjenčića kukica (Slika 3.) (BOWMAN, 2013.). Iza glavice se nastavlja vrat (*collum*, lat.) koji predstavlja nesegmentiranu, proliferativnu zonu iz koje se stvaraju članci (*proglotidae*, lat.). Iza vrata se tako nalaze najmlađi ili spolno nezreli članci, u kojima su samo muški spolni organi, u sredini strobile su hermafroditski ili spolno zreli članci koji sadržavaju osim muških i ženske spolne organe, a na kraju su gravidni članci sa uterusom punim embrioniranih jajašaca (SAARI i sur., 2018.). Najmanji broj članaka trakavice je 3-5 (*Echinococcus granulosus*), a najveći i do 2000 članaka (*Taenia saginata*); mogu biti dugačke od nekoliko milimetara (6 mm – *Echinococcus granulosus*) do nekoliko metara (20 m – *Taenia saginata*) (BOWMAN, 2013.).

Specifične razlike u morfologiji skoleksa, odnosno organa za fiksaciju, oblik i veličina članaka i jajašaca, te izgled larvalnih oblika su kriteriji koji se koriste u morfološkoj determinaciji trakavica (GUNN i PITT, 2012.; HOFER i sur., 2000.). Primjerice, trakavice porodice Taeniidae na skoleksu imaju rilo s dva reda kružno raspoređenih kukica (izuzetak je *Taenia saginata*, koja nema rila niti kukica), dok trakavice porodice Anoplocephalidae i Mesocestoididae ne posjeduju rilo i kukice, ali imaju razvijenije siske koje im omogućuju fiksaciju (BOWMAN, 2013.).



Slika 3. Kukice za fiksaciju trakavice *Taenia martis,* povećanje 400x
Izvor: dr. sc. Relja Beck, Hrvatski Veterinarski Institut

Morfološka determinacija trakavica je manje prikladna kada postoji veliki broj uzoraka, zbog dugotrajnosti i zahtjevnosti izvedbe (AL-SABI i KAPEL, 2011.). Determinacija morfološki sličnih odraslih primjeraka vrsta istoga roda može dovesti do pogrešne identifikacije vrsta zbog izuzetno sitnih razlika (BURLET i sur., 2011.; GALIMBERTI i sur.; 2012.; HRČKOVA i sur., 2011.; REPERANT, 2009.), a uzorci često nisu pogodni za determinaciju (ROELFSEMA i sur., 2016.). Primjerice, trakavice roda *Moniezia* se međusobno razlikuju temeljem morfoloških obilježja interproglotidnih žlijezda, ali to je često zahtjevno u praksi zbog njihovog izostanka u pojedinim primjercima (NGUYEN i sur., 2011.). Također, kod trakavica iz starih ili smrznutih lešina dolazi do dezintegracije dijelova ključnih za njihovu determinaciju (BORGSTEEDE i sur. 2003; HOFER i sur. 2000.).

1.3. Opći i specifični ciljevi rada

Do sada u Hrvatskoj nisu provedena sustavna molekularna istraživanja trakavica, stoga je cilj ovog istraživanja bio provesti molekularnu analizu arhiviranih uzoraka

odraslih oblika i larvalnih stadija trakavica sekvenciranjem COX i NAD gena na području Republike Hrvatske. Za pretpostaviti je da će biti determinirane nove vrste, a karakterizacija larvalnih stadija može determinirati i nove, do sad nepoznate posrednike.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Rod *Moniezia*

Sustavno molekularno istraživanje trakavica iz roda *Moniezia* izoliranih iz domaćih preživača (goveda, ovce i koze) provedeno je u središnjem Vijetnamu. U ovaca (*Ovis aries aries*) i koza (*Capra aegagrus hircus*) je učestalija bila vrsta *Moniezia expansa*, a *Moniezia benedeni* u goveda (*Bos taurus*) (NGUYEN i sur., 2011.). Molekularna analiza primjeraka iz ovaca u gradu Al Diwaniyah (Irak) također potvrđuje vrstu *Moniezia expansa* dominantnom u malih preživača i ukazuje na postojanje dva soja s najvećom sličnosti trakavicama iz Kine (ALKHALED i sur., 2018.).

2.2. Rod *Mesocestoides*

Smatralo se da su vrste *Mesocestoides lineatus* i *Mesocestoides litteratus* podjednako rasprostranjene u Europi, ali zbog morfološke sličnosti postoji mogućnost da su pogrešno determinirane klasičnim metodama (HRČKOVA i sur., 2011.). Podaci provedenih molekularnih istraživanja pokazuju veću zastupljenost *Mesocestoides litteratus* (ZALEŚNI i HILDEBRAND, 2011.). Veći postotak invadiranosti ovom vrstom potvrđuju molekularne analize adulta u lisica (*Vulpes vulpes*) prikupljeni s raznih lokacija iz Poljske, Španjolske, Češke i Slovačke (HRČKOVA i sur., 2011.; LITERÁK i sur., 2006.), a izolirana je iz 1,1% uzoraka u pasa (*Canis lupus familiaris*) sa jugoistoka Poljske (KARAMON i sur., 2019.) Također, svi larvalni stadiji (tetratiridiji) iz guštera (*Lacerta agilis*) u Češkoj te iz glodavaca (*Apodemus agrarius* i *Myodes glarolus*) u Poljskoj su bili identični kao i dostupne sekvence *Mesocestoides litteratus* (LITERÁK i sur., 2006.; ZALEŚNI i HILDEBRAND, 2011.).

2.3. Rod *Taenia*

Taenia arctos je po prvi puta, nakon primjene molekularnih metoda opisana kao zasebna vrsta 2011. godine, a do tada je bila opisivana kao "vrsta slična *Taenia krabbei*" (LAVIKAINEN i sur., 2010.). Analizom sekvenci gena izoliranih iz adulta iz smeđeg medvjeda (*Ursus arctos*), te larvalnih oblika iz euroazijskog jelena (*Alce alces)* prikupljenih iz raznih područja Finske, Svaldbardskog otočja i Švedske, pokazalo se da se radi o novoj vrsti kod koje su nositelji isključivo medvjedi (HAUKISALMI i sur., 2011.; LAVIKAINEN i sur. 2011.). Dvije godine kasnije, po prvi puta je opisana i u grizlija (*Ursus arctos horribilis*), te američkog smeđeg medvjeda (*Ursus americanus*) u Kanadi (CATALANO i sur., 2013.), što ukazuje na široku rasprostranjenost ove vrste.

Taenia crassiceps je molekularno dokazana u 0,6% uzoraka iz vukova (*Canis lupus*) sa sjevera Italije (GORI i sur., 2015.) te 0,7% uzoraka iz pasa sa jugoistoka Poljske (KARAMON i sur., 2019.), a larvalni stadij *Cysticercus longicollis* je nedavno po prvi puta dokazan u lisice u Hrvatskoj (KONJEVIĆ i sur., 2016.). Vrsta je i zoonoza. Bilježe se pojedinačni slučajevi invazije ljudi u Francuskoj, Kanadi, Njemačkoj, SAD-u i Švicarskoj kod kojih su ličinke pronađene i potvrđene molekularnom analizom uzorka iz potkožja, oka i mozga. Češće invazije su potvrđene u imunokomprimiranih pacijenata starih između 30 i 40 godina (LESCANO i ZUNT, 2013.; TAPPE i sur., 2016.).

Taenia hydatigena je globalno proširena, a molekularnim metodama je potvrđena kod vukova u Finskoj i Švedskoj, sa nešto nižom prevalencijom od *Taenia krabbei* (AL-SABI i sur., 2018.; LAVIKAINEN i sur., 2011.), dok je u vukova na sjeveru Italije i Nacionalnom parku Foreste Casentinesi bila dominantna, s prevalencijom od 19,6%, odnosno 22,2% (GORI i sur., 2015.; POGLAYEN i sur., 2017.). Vrstu se smatra enzootskom u Italiji, a to osim spomenutih istraživanja u vukova potvrđuje i molekularna analiza adulta iz psa, larvalnih oblika *Cysticercus tenuicollis* s prevalencijom od 2,9% u divljih svinja (*Sus scrofa*), te kod ekstenzivno držanih ovaca i koza (BOUFANA i sur., 2015.; PAOLETTI i sur., 2018.; SCALA i sur., 2015.). Prevalencija *Cysticercus tenuicollis* u janjadi na Sardiniji iznosila je 14,6% (SCALA i sur., 2015.), a zabilježena je i u 3 mjeseca starog običnog jelena (*Cervus elaphus*) u Turskoj (CENGIZ i sur., 2019.). Posljednja molekularna istraživanja koja su

provođena na jugoistoku Poljske pokazuju prevalenciju od 5,9% u pasa te 1,5% u domaćih mačaka (*Felis silvestris catus*) (KARAMON i sur., 2019.).

Taenia krabbei je prevladavala u svim molekularno pretraženim uzorcima iz vukova iz Finske i Švedske (AL-SABI i sur., 2018.; LAVIKAINEN i sur., 2011.). U vukova na sjeveru Italije je bila druga po zastupljenosti sa prevalencijom od 4,5%, a u Nacionalnom parku Foreste Casentinesi prevalencija je bila 1,8%. Pojedinačni slučajevi otkriveni su u arktičke lisice (*Vulpes lagopus*) u Norveškoj, te kod pasa u Italiji (FORMENTI i sur., 2017.; GORI i sur., 2015.; LAVIKAINEN i sur., 2011.; POGLAYEN i sur., 2017.). Larvalni oblici iz losova (*Alces americanus*) i sobova (*Rangifer tarandus caribou*) na Aljasci, te srna (*Capreolus capreolus*) na sjeveru Italije analizirani molekularnim metodama su odgovarali genomu vrste *Taenia krabbei* (FORMENTI i sur., 2017.; LAVIKAINEN i sur., 2011.).

Kao *Taenia martis* su molekularnim metodama determinirani adulti iz kuna (*Martes foina*) u Italiji, Belgiji, Poljskoj i Bjelorusiji, te iz lisica u Njemačkoj. Larvalni oblici iz glodavaca su izolirani i molekularno analizirani sa potvrdom genoma *Taena martis* u raznim dijelovima Europe (KORNAŚ i sur., 2013.; MATHY i sur., 2009.; MILLAN i sur., 2001). Opisana je invazija ličinkama ove vrste i u ljudi, pa je do sada opisano i molekularno potvrđeno nekoliko slučajeva invazije s *Taenia martis* u Francuskoj i Njemačkoj, najčešće kod imunokomprimiranih pacijenata. U opisanim slučajevima manifestirala se kao solitarna lezija u mozgu, peritoneumu i u oku (KOCH i sur., 2016.; DEPLAZES i sur., 2019.).

Za *Hydatigera taeniaeformis* sensu lato se do 2012. godine smatralo da predstavlja jedinstvenu vrstu. Do tada je opisana u lisica iz Litve (BRUŽINSKAITĖ-SCHMIDHALTER i sur., 2011.), a sljedeće godine u divljih mačaka (*Felis silvestris silvestris*). Kod slobodno držanih domaćih mačaka u Italiji je također zabilježena visoka invadiranosti. Većina sekvenci je odgovarala dostupnima u bazi gena, ali se dio nije poklapao, iako je pokazivao veliku sličnost ovoj liniji (GALIMBERTI i sur., 2012.). Nakon toga, molekularnim metodama je potvrđeno da *Hydatigera taenieformis* s.l. predstavlja veću skupinu i uključuje više vrsta trakavica (WANSHONG i sur., 2012.; NAKAO i sur., 2013.). Jedna predstavlja vrstu *Hydatigera taeniformis* sensu stricto kod koje *Cysticercus fasciolaris* parazitira u miševa (*Mus musculus*) i štakora (*Rattus rattus*), druga je *Hydatigera kamiyai,* čiji još neimenovani larvalni oblici parazitiraju u voluharica (*Myodes glareolus*) (NAKAO i sur., 2013.) te treća potencijalna vrsta genetski veoma bliska *Hydatigera kamiyai,* čiji

je taksonomski položaj i dalje nepoznat (LAVIKAINEN i sur., 2016.). Ovu tezu potvrdilo je istraživanje provedeno na Danskom otočju Zealand 2013. godine, gdje je analizom ličinaka iz jetre miševa i štakora potvrđena vrsta *Hydatigera taeniaefirmis* s.s. sa 9,25% prevalencijom i najvećom zastupljenosti u gradskim parkovima / šumama, te naseljenim poljoprivrednim područjima (AL-SABI i KAPEL, 2011.; AL-SABI i sur., 2013.). Vrsta je nešto kasnije potvrđena i analizom sekvenci adulta iz vukova na sjeveru Italije (GORI i sur., 2015.). Smatra se da ima određeni zooonotski potencijal jer postoje zabilježeni slučajevi invazije ljudi larvalnim oblicima. Uzorci izolirani iz ljudi su determinirani klasičnim metodama, a do danas ne postoje molekularne potvrde (COOK i sur., 2003.; FICHET-CALVET i sur., 2003.; KUMAR i sur., 2006.; LIN i sur., 1990.; STERBA i BARUS, 1976.).

2.4. Rod *Echinococcus*

Unutar trakavica roda *Echinococcus* su vrste *Echinococcus granulosus* sensu lato i *Echinococcus multilocularis* (BOWMAN, 2013.). Vrsta *Echinococcus multilocularis* se rjeđe javlja, ali je patogenija (AUER i ASPÖCK, 2014.). Unutar vrste *Echinococcus granulosus* s.l. postoji 10 genotipova (G1-G10), a pripadnost pojedinom genotipu je definirana manje morfološkim, a više biološkim razlikama (DYBICZ i sur., 2013.). Sojevi značajni u Hrvatskoj grupirani su u dvije skupine: *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1, G2 i G3) i *Echinococcus canadensis* (G6-G10) (PAOLETTI i sur., 2018.). Molekularna istraživanja pokazuju kako je genotip *Echinococcus canadensis* globalno zastupljen u silvatičkom i u ruralnom ciklusu. Opisan je u silvatičkom ciklusu između vukova i jelena na Aljasci, Kanadi i SAD-u (KAZACOS, 2003.). U gotovo svim dijelovima Europe se također održava između vukova i jelena (NAKAO i sur., 2013.), ali sve je veća zastupljenost spomenutog genotipa i u ruralnom ciklusu u područjima sa tradicionalnom proizvodnjom svinja i ovaca. Molekularnim je metodama potvrđen u malih preživača na Peloponezu (ROINIOTI i sur., 2016.). U Litvi i Poljskoj je opisan i molekularno potvrđen u ciklusu koji se održava između pasa i domaćih svinja (*Sus scrofa domesticus*) (BRUŽINSKAINTĖ-SCHMIDHALTER i sur., 2009.; CARMENA i CARDONA, 2014.), a u Srbiji i Moldaviji izoliran je i genetski potvrđen u domaćih svinja (DEBELJAK i sur., 2016.; UMHANG i sur., 2019.). Molekularnim je metodama potvrđen u tkivima ljudi s raznih područja, a posljednji slučajevi su opisani i

molekularno potvrđeni u Moldaviji (UMHANG i sur., 2019.). U svih pacijenata invazija se očitovala nalazom ehinokokovih cisti u različitim unutarnjim organa, najčešće u jetri i slezeni (DIBYCZ i sur 2013.).

2.5. Rod *Raillietina*

Prema klasičnim morfološkim metodama determinacije, vrste *Raillietina echinobothrida* i *Raillietina tetragona* smatraju se dominantnima u domaće peradi (PERMIN i HANSEN, 2003.). Najveći je broj molekularnih metoda i sekvenciranje potpune mDNK provedeno upravo na primjercima spomenutih vrsta (LIANG i LIN, 2015.; RAMNATH i sur., 2012.). Sustavna molekularna analiza primjeraka crijevnih parazita u domaćih kokoši (*Gallus gallus domesticus*) provedena je na Tajlandu gdje su potvrđene miješane invazije vrstama *Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona i Raillietina cesticillus* (BUTBOONCHOO i WONGSAVAD sur., 2016.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Istraživanjem su obuhvaćene trakavice ili larvalni oblici trakavica pronađeni kod 47 životinja (od 38 životinja su dostavljene cijele trakavice, od tri gravidni članci, a od šest larvalni stadiji). Svaki uzorak je imao dodijeljen broj životinje iz koje je izdvojen. Trakavice ili članci su porijeklom iz crijeva po jedne divlje mačke i kune, dva čaglja, po tri mačke i psa, po četiri kokoši i ovce, šest lisica i 17 medvjeda. Larvalni stadiji su pronađeni u tkivu tri divlje svinje, te u po jednoj domaćoj svinji, ovci i srni (Tablica 1. i Tablica 2.). Uzorci su čuvani posljednjih 20 godina u Laboratoriju za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, a dostavljani su zbog determinacije nakon razudbe u Laboratoriju za opću patologiju Hrvatskog veterinarskog instituta. Dostavljeni uzorci su potom najčešće bili determinirani do razine roda, a nakon toga su bili pohranjeni. Trakavice iz divlje mačke (TR32), članci iz lisice (TR33) i domaće mačke (TR24) te larvalni stadiji iz svinje (TR25) su bili pohranjeni u 10% formalinu, a ostatak uzoraka je čuvan u 96% etanolu.

3.2. Izolacija DNK

Izdvajanje DNK iz 20 mg uzorka učinjeno je pomoću komercijalnog kita *DNAeasy Blood and tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputama proizvođača uz korištenje automatskog sustava za izdvajanje DNK; *QIAcube* (Qiagen, Hilden, Germany). Kit omogućava kvalitetno izdvajanje DNK iz krvi i različitih tkiva, a ujedno i iz patogenih organizama. Ovako izdvojena DNK je najpogodnija za daljnje postupke analize. Za kontrolu kvalitete izdvajanja DNK, odnosno kontrolu moguće kontaminacije uzoraka korištena je destilirana voda u svakom dvanaestom uzorku, odnosno po jednom ciklusu automatskog izdvajanja DNK. Nakon završetka automatske izolacije dobiveno je 200 µl izdvojene DNK koja je korištena u analizi lančanom reakcijom polimerazom (LRP) (engl. *polymerase chain reaction*, PCR).

3.3. Lančane reakcije polimerazom

Lančana reakcija polimerazom je korištena kako bi se umnožili ciljani odsječci mitohondrijskih COX i NAD gena. Za dokazivanje DNK uzočnika korištena su dva različita protokola (BOWLES i sur., 1992.; TRACHSEL i sur., 2007.).

Za umnažanje specifičnih DNK odsječka lančanom reakcijom polimeraze uz izdvojenu DNK, korištene su početnice koncentracije 10 mol/µl uz korištenje *GoTaq®G2 Hot Start Colorless Master Mix* (Promega Corporation, Madison, USA) i toplokružnici *Veriti®96-well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), *SureCycler 8800* (Agilent Technologies) i *PCRmax®Alpha cycler* (Fisher Scientific).

Ukupan volumen po PCR reakciji bio je 50 µl. Pri umnažanju ciljanih odsječaka COX i NAD gena mtDNK uzročnika korištene su pozitivne i negativne kontrole.

3.3.1. Korišteni protokoli

A) COX

Za dokazivanje mtDNK korišten je protokol umnažanja prema BOWLES i sur. (1992.) kojim se umnaža ciljani odsječak od oko 470 parova baza korištenjem prednje početnice JB3 5′-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3′ i stražnje početnice JB4.5 5′-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3′.

Reakcija se sastojala od inicijalne dvominutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako slijedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 30 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 53°C kroz 30 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 45 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta. Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

B) NAD

Za dokazivanje mtDNK korišten je protokol umnažanja prema TRACHSEL i sur. (2007.) kojim se umnaža ciljani odsječak od oko 529 parova baza korištenjem prednje početnice JB11 5´-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3´ i stražnje početnice JB12 5´-ACCACTAACTAATTCACTTTC-3´.

Reakcija se sastojala od inicijalne triminutne denaturacije, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa kako slijedi:

1. denaturacija pri temperaturi od 94°C kroz 30 s;
2. prihvaćanje početnica pri temperaturi od 50°C kroz 30 s;
3. produženje pri temperaturi od 72°C kroz 60 s.

Nakon posljednjeg ciklusa, produženje je provedeno na 72°C tijekom sedam minuta. Reakcija je automatski zaustavljena pri temperaturi od 4°C.

3.4. Uspješnost umnažanja i sekvenciranje

Uspješnost umnažanja provjerena je vizualizacijom korištenjem kapilarne elektroforeze na *QIAxcel sistemu* (Qiagen, Hilden, Njemačka). Radi svrhe sekvenciranja umnoženi odsječci pročišćeni su pomoću *ExoSAP-IT® PCR Clean-Up Reagent* kita (USB Corporation, Cleveland, USA), prema uputama proizvođača. Sekvenciranje u oba smjera izvršeno je u kompaniji Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska). Dobivene sekvence poravnate su pomoću računalnog programa *Lasergene* i potprograma *SeqMan* i *EditSeq* (DINASTAR, Madison WI, USA) i uspoređene su sa dostupnim sekvencama u banci gena *GenBank®* (PubMed) putem tražilice *BLAST*.

4. REZULTATI

Od ukupno analiziranih 47 uzoraka, niti sa jednim protokolom nismo uspjeli umnožiti specifičan odsječak DNK iz četiri uzorka (8,51%) koji su bili pohranjeni u 10% formalinu (TR24, TR25, TR32 i TR33).

Od preostala 43 uzorka (91,49 %), kod 33 su umnožena oba odsječka (70,21 %), u osam samo COX (17,02 %), a kod dva samo NAD odsječak (4,26 %), (Tablica 1. i Tablica 2.).

Sekvence trakavica iz čagljeva (uzorci TR5 i TR21) koje su morfološki determinirane kao *Taenia* sp., za COX gen su nakon *BLAST* analize pokazale 99,75 % sličnosti sa sekvencom *Taenia krabbei* (pristupni broj: KX058192) izoliranom iz vuka (Tablica 1.) a ista sekvenca je potvrđena analizom larvalnog stadija iz uzorka TR43 (KX058192) iz mišića srne, morfološki determiniranog kao „cisticerk“ (Tablica 2.).

Uzorak s oznakom TR30 iz kune je morfološki bio determiniran kao *Taenia* sp., (Tablica 1.), larvalni oblik iz srne (TR43) kao „cisticerk“ (Tablica 2.), a uzorak TR42 iz divlje svinje uopće nije bio morfološki determiniran (Tablica 2.). Sekvence adulta iz kune (TR30) i larvalnih oblika iz mišića srne (TR43), te jetre, mezenterija i pluća divlje svinje (TR42) su podudarne sa 99,78% sličnosti sa sekvencom NAD gena vrste *Taenia martis* (pr. br. EU544606). Sekvencom COX gena potvrđena je *Taenia martis* (pr.br. EU544553) u crijevu kune, dok je kod larvalnog oblika iz divlje svinje COX sekvenca bila jednaka s *Taenia hydatigena* (pr.br. KT258027), a larvalni oblik u srne je sa 99,75 % sličnosti odgovarao sekvenci *Taenia krabbei* (pr.br. KX058192). (Tablica 1. i Tablica 2.).

Kod uzorka s oznakom TR3 iz mačke, koji je morfološki determiniran kao *Hydatigera taeniaeformis* s.l. i uzorka TR41 iz lisice, koji je morfološki determiniran kao *Taenia* sp., su dokazane identične sekvence za COX (pr.br. KF702312) i NAD (pr.br. EU861479) gene, koje su sa 99,8% i 99,45% sličnosti odgovarale sekvencama vrste *Hydatigera taenieformis* s.s. izoliranim iz domaće mačke (Tablica 1.).

Sekvence adulta iz crijeva lisice (oznaka TR12), morfološki determiniranog kao *Taenia* sp., su analizom NAD gena sa 99,75% sličnosti odgovarale sekvenci *Mesocestoides litteratus* (pr.br. MH998123) izoliranoj iz divlje mačke (Tablica 1.).

Uzorci TR8 i TR10 iz lisica su morfološki determinirani kao *Taenia multiceps,* dok su analize sekvenci oba gena, COX (pr.br. KY321321) i NAD (pr.br. EU544603) potvrdile vrstu *Taenia crassiceps* (Tablica 1.).

Svi primjerci trakavica iz crijeva medvjeda morfološki su determinirani kao *Taenia* sp., a sve sekvence tih uzoraka su međusobno bile jednake i pokazale 99,8% sličnosti sa sekvencama NAD gena vrste *Taenia arctos* (pr.br. GU252132), dokazanih u smeđih medvjeda i finskog euroazijskog jelena. Sve sekvence COX gena su također bile jednake i to sa 99,24% sličnosti sa *Taenia arctos* u bazi gena (pr.br. GU252131) (Tablica 1.).

Adulti iz jedne ovce (TR4) su morfološki determinirani kao *Moniezia expansa,* dok su uzorci s oznakama TR39 i TR48 također iz ovaca, determinirani kao *Moniezia* sp. Sve sekvence COX gena spomenutih uzoraka su nakon analize bile jednake i sa 99,06% sličnosti odgovarale vrsti *Moniezia expansa* (pr.br. AB821393) izoliranoj iz ovaca i koza u Senegalu i Etiopiji. Analiza sekvence NAD gena je sa 99,79% sličnosti potvrdila vrstu *Moniezia expansa* (pr.br. MG189627) (Tablica 1.).

Sekvence za uzorke TR6 i TR22 vrste *Dipylidium caninum* su za oba gena pokazale više od 99% sličnosti sa sekvencom (pr.br.NC021145) izoliranom iz crijeva psa što se podudara i sa rezultatima morfološke determinacije (Tablica 1.).

Larvalni oblici morfološki determinirani kao *Cysticercus tenuicolis* koji su izolirani iz visceralnih organa ovce (TR31) i divlje svinje (TR27), su sa 99,41% sličnosti odgovarale sekvenci NAD gena vrste *Taenia hydatigena* (pr.br. HQ204204), a sekvence COX gena su bile identične (pr.br. KT258027) i potvrdile spomenutu vrstu (Tablica 2.).

Analiza sekvence NAD gena uzorka TR46, morfološki determiniranog kao „ehinokokova cista“ iz (nezabilježenog) tkiva domaće svinje, sa 99,81% sličnosti odgovara genotipu *Echinococcus canadensis* (pr.br. KX010889) (Tablica 2.).

Tablica 1. Rezultati morfološke determinacije i molekularne analize dobivenih sekvenci adulta izolirani iz tankih crijeva nositelja

NOSITELJ	OZNAKA I MORFOLOŠKA DETERMINACIJA	STADIJ PARAZITA	TKIVO	PCR	
				COX	NAD
ČAGALJ	TR5, TR21 *Taenia* sp.	adult	tanko crijevo	*Taenia krabbei* *KX058192*	/
DIVLJA MAČKA	TR32 *Mesocestoides* sp.	adult	tanko crijevo	/	/
KUNA	TR30 *Taenia* sp.	adult	tanko crijevo	*Taenia martis* EU544553	*Taenia martis* *EU544606*
LISICA	TR8, TR10 *Taenia multiceps*	adult	tanko crijevo	*Taenia crassiceps* *KY321321*	*Taenia crassiceps* *EU544603*
LISICA	TR12 *Taenia* sp.	adult	tanko crijevo	/	*Mesocestoides litteratus* MH998123
LISICA	TR33 /	članci	tanko crijevo	/	/
LISICA	TR41 *Taenia* sp.	adult	tanko crijevo	*Hydatigera taenieformis* s.s. KF702312	*Hydatigera taenieformis* s.s. EU861479
MAČKA	TR3 *Hydatigera taenieformis* s.l.	adult	tanko crijevo	*Hydatigera taenieformis* s.s. KF702312	*Hydatigera taenieformis* s.s. EU861479
MAČKA	TR24 *Dipylidium caninum*	članci	tanko crijevo	/	/
MEDVJED	TR1 ,TR9, TR11, TR13 ,TR14, TR15, TR16, TR18, TR20, TR26, TR34, TR35, TR36, TR37, TR38, TR40, TR49 *Taenia* sp..	adult	tanko crijevo	*Taenia arctos* GU252131	*Taenia arctos* GU252132
OVCA	TR39, TR48 *Moniezia* sp.	adult	tanko crijevo	*Moniezia expansa* *AB821393*	*Moniezia expansa* MG189627
OVCA	TR4 *Moniezia expansa*	adult	tanko crijevo	*Monezia expansa* *AB821393*	/
PAS	TR6, TR22 *Dipylidium caninum*	adult	tanko crijevo	*Dipylidium caninum* NC021145	*Dipylidium caninum* *NC021145*

Tablica 2. Rezultati morfološke determinacije i molekularne analize sekvenci larvalnih oblika trakavica iz tkiva posrednika

POSREDNIK	OZNAKA I MORFOLOŠKA DETERMINACIJA	TKIVO	PCR	
			COX	NAD
OVCA	TR31 *Cysticercus tenuicolis*	sirište	*Cysticercus tenuicolis* (*Taenia hydatigena*) *KT258027*	*Cysticercus tenuicolis* (*Taenia hydatigena*) HQ204204
SRNA	TR43 „cisticerki“	mišić	*(Taenia krabbei) KX058192*	(*Taenia martis*) *EU544606*
DIVLJA SVINJA	TR25 „cisticerki“	jetra	/	/
DIVLJA SVINJA	TR27 *Cysticercus tenuicolis*	jetra	*Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena*) *KT258027*	*Cysticercus tenuicolis* (*Taenia hydatigena*) *HQ204204*
DIVLJA SVINJA	TR42 /	pluća, jetra, mezenterij	*Cysticercus tenuicollis* (*Taenia hydatigena*) *KT258027*	(*Taenia martis*) *EU544606*
DOMAĆA SVINJA	TR46 „ehinokokova cista“	/	/	*(Echinococcus canadensis)* KX010889

Kod 8 uzoraka (oznake TR7, TR17, TR19, TR23, TR28, TR29, TR44, TR47) umnožene sekvence COX i NAD gena su nakon *BLAST* analize pokazale sličnost manju od 90 % sa dostupnim sekvencama stoga nije bilo moguće ustanoviti o kojim se vrstama radi (Tablica 3.).

Oba gena su uspješno umnožena za dva uzorka iz domaće kokoši (TR19, TR29) i uzorka iz lisice (TR7). Kod druga dva uzorka iz domaće kokoši (TR17, TR28), te iz po jednog iz mačke (TR44), ovce (TR23) i psa (TR47) je uspješno umnožen COX gen, dok umnažanje NAD gena nije bilo uspješno. Po jedna nova sekvenca dobivena je za uzorke TR19 i TR29 iz domaće kokoši, druga za uzorke TR17 i TR28 također iz domaće kokoši, treća iz lisice (TR7), četvrta iz mačke (TR44), peta iz ovce (TR23) i šesta iz psa (TR47) (Tablica 3).

Sekvence uzoraka iz domaće kokoši (TR17, TR19, TR28, TR29) koji su morfološki bili determinirani kao *Raillietina* sp., molekularno su pokazale podudarnost manju od 87% sa svim dostupnim sekvencama.

Za sekvence iz lisice, mačke, ovce i psa podudarnost je iznosila između 75% i 90% sa poznatim sekvencama. Uzorak TR7 iz lisice je morfološki determiniran kao trakavica

iz roda *Taenia,* uzorak TR44 iz mačke i uzorak TR47 iz psa kao *Dipilidyum caninum* te uzorak TR23 iz ovce kao *Moniezia expansa* (Tablica 3.).

Tablica 3. Nove sekvence

NOSITELJ	OZNAKA I MORFOLOŠKA DETERMINACIJA	STADIJ PARAZITA	TKIVO	PCR	
				COX	NAD
KOKOŠ	TR19, TR29 *Raillietina sp.*	adult	tanko crijevo	nova sekvenca	nova sekvenca
KOKOŠ	TR17, TR28 *Raillietina sp.*	adult	tanko crijevo	nova sekvenca	/
LISICA	TR7 *Taenia sp.*	adult	tanko crijevo	nova sekvenca	nova sekvenca
MAČKA	TR44 *Dipylidium caninum*	članci	tanko crijevo	nova sekvenca	/
OVCA	TR23 *Moniezia expansa*	adult	tanko crijevo	nova sekvenca	/
PAS	TR47 *Dipylidium caninum*	adult	tanko crijevo	nova sekvenca	/

Tablica 4. Molekularno determinirane vrste trakavica po skupinama nositelja i posrednika

NOSITELJ	MOLEKULARNA DETERMINACIJA
ČAGALJ	*Taenia krabbei*
KUNA	*Taenia martis*
LISICA	*Mesocestoides litteratus*
	Taenia crassiceps
	Hydatigera taeniaeformis s.s.
MAČKA	*Hydatigera taeniaeformis* s.s.
MEDVJED	*Taenia arctos*
OVCA	*Monezia expansa*
PAS	*Dipylidium caninum*
POSREDNIK	**MOLEKULARNA DETERMINACIJA**
OVCA	*Taenia hydatigena*
SRNA	*Taenia krabbei*
DIVLJA SVINJA	*Taenia martis*
DOMAĆA SVINJA	*Echinococcus canadensis*

Molekularnim je metodama dokazano ukupno 10 vrsta trakavica (Tablica 4.). Pored *Monezia expansa, Mesocestoides litteratus, Dipylidium caninum* i *Echinococcus canadensis*, većina je pripadala tzv. velikim tenijama (*Taenia* sp.) i to vrste *Taenia arctos, Taenia crassiceps, Taenia hydatigena, Taenia krabbei, Taenia martis* i *Hydatigera taeniformis* sensu stricto.

Adulti i larvalni oblici vrsta *Taenia martis* i *Taenia krabbei* dokazani su kod nositelja (čagalj i kuna) i posrednika (srna i divlja svinja), dok su ostale vrste zabilježene samo kao adulti u nositelja ili larvalni oblici u posrednika.

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem smo po prvi puta molekularnim metodama dokazali različitost faune trakavica u nositelja i posrednika u Hrvatskoj.

Moniezia expansa je dobro poznata trakavica preživača (NGUYEN i sur., 2011.), no do sada nije provedena genska tipizacija u Hrvatskoj. Analizom sekvenci oba gena za sve je primjerke potvrđena vrsta *Moniezia expansa.* Prema dostupnim podacima molekularnih istraživanja se čini da se taj izolat *Moniezia expansa* u Europu, pa tako i u Hrvatsku proširio iz Afrike jer se sekvence razlikuju u jednom paru baza s onima iz Senegala i Etiopije izdvojenih iz koza i ovaca (DIOP i sur., 2013.).

Dipylidium caninum je determiniran morfološki i dokazan analizom sekvenci oba gena, te je jednak i drugim sekvencama iz Europe. Ovi rezultati pridonose spoznaji da je vrsta homogena, odnosno da ne postoje značajnije genetske varijante (AUER i ASPÖCK , 2014.).

Usporedbom dobivenih sekvenci potvrđena je trakavica *Taenia krabbei* u čaglja (TR5 i TR21), kao i larvalni oblik kod srne (TR43). Ovaj nalaz identičnih sekvenci oba gena potvrđuje istraživanje AL-SABI i sur. (2013.) da su divlji kanidi nosioci vrste *Taenia krabbei*, a posrednici su cervidi. Adulti su prethodno morfološki determinirani kao *Taenia* sp., a larvalni oblici su determinirani kao „cisticerki*"*. Također, vrsta *Taenia krabbei* je morfološki veoma slična vrsti *Taenia ovis,* iako su genetski veoma različite (PRIEMER i sur., 2002.) stoga se teško mogu razlikovati na osnovu morfologije. Potrebno je provesti molekularnu analizu uzoraka iz većeg broja vrsta, kako bi se razjasnio značaj *Taenia krabbei* u rurarnom ciklusu kod domaćih životinja jer je molekularnom tipizacijom COX odsječka *Taenia krabbei* po prvi puta izolirana

i iz crijeva pasa lutalica u Italiji (FORMENTI i sur., 2017.). Prema dosadašnjim spoznajama *Taenia krabbei* ne predstavlja opasnost za zdravlje ljudi (HOBERG, 2002.), a jaka invadiranost trupa larvalnim oblicima za posljedicu ima odbacivanje trupova divljači (LAAKSONEN i PAULSEN, 2015.). Naši rezultati ukazuju na potrebu istraživanja širenja ovog parazita, te potvrde drugih nositelja i posrednika uključenih u životni ciklus *Taenia krabbei*.

Nalazom identičnih sekvenci oba gena kod trakavice iz kune (TR30) i larvalnog stadija iz divlje svinje (TR42), potvrđena je kod nas prisutnost vrste *Taenia martis,* koja je tek 2008. godine opisana kao zasebna vrsta u Danskoj i potvrđena genetski (LAVIKAINEN i sur., 2008.). Primjerak iz kune je prethodno morfološki determiniran kao *Taenia* sp., a larvalni oblik je u ovome istraživanju ostao nedeterminiran. Larvalni oblici vrste *Taenia martis* do sada još nisu imenovani jer se tradicionalno smatralo da ličinke poput onih u svinje iz trbušne i grudne šupljine (jetra, mezenterij, pluća) pripadaju vrsti trakavice *Taenia hydatigena*, odnosno ličinki *Cysticercus tenuicollis*, stoga je i sekvencama pridruženo ime *Taenia hydatigena.* Nema mnogo podataka o njezinoj proširenosti u Europi, a ovim je istraživanjem dokazana prisutnost *Taenia martis* i u jugoistočnoj Europi. Potrebne su dodatne analize i istraživanja, kako trakavica tako i njihovih larvalnih stadija. Dokaz *Taenia martis* u Hrvatskoj je značajan i zbog novih spoznaja o nedavno otkrivenim slučajevima invazija mozga, oka i peritoneuma ljudi u Njemačkoj i Francuskoj (DEPLAZES i sur., 2019.). Potrebno je provesti parazitološka i molekularna istraživanja kod kuna, kako bi se odredio stvaran rizik za invaziju ljudi.

Sadašnjim istraživanjem nismo uspjeli razjasniti posredničku ulogu životinjskih vrsta u razvojnom ciklusu pojedinih trakavica. Za naglasiti je da smo po prvi puta molekularnim metodama dokazali trakavice kao što su *Mesocestoides litteratus*, *Taenia arctos*, i *Hydatigera taeniaeformis* s.s. koje su izolirane iz crijeva nositelja.

Dok je na osnovu morfologije primjerak TR12 iz crijeva lisice determiniran kao vrsta iz roda *Taenia,* molekularnim je metodama ustanovljeno da se radi o vrsti *Mesocestoides litteratus,* i to soju koji je već dokazan u lisica u Europi (VARCASIA i sur., 2018.).

Taenia arctos do 2010. godine nije smatrana zasebnom vrstom, već se smatrala izolatom/sojem *Taenia krabbei* (LAVIKAINEN i sur., 2010.) Analizom gena otkriveno je da predstavlja vrstu koja parazitira isključivo u medvjeda, što su potvrdili CATALANO i sur., (2013.) i LAVIKAINEN i sur., (2011.) nalazom u grizlija,

američkog crnog medvjeda i smeđeg medvjeda. Larvalni oblici izolirani iz euroazijskog jelena determinirani su samo kao „cisticerki“ (HAUKISALMI i sur., 2011.) i do sada nisu imenovani, ali potrebna su dodatna istraživanja. Morfološki su svi naši primjerci pronađeni u medvjedu determinirani kao *Taenia* sp.*,* a rezultati molekularne analize pokazuju da se radi o *Taenia arcto*s, te potvrđuju pretpostavku da je to vrsta specifična za medvjede. Zanimljivo je da su sve izolirane sekvence u ovome istraživanju međusobno bile jednake, no nisu bile potpuno identične sa sekvencama opisanih molekularnih istraživanja. Čini se da je genotip *Taenia arctos* iz Hrvatske drugačiji, što ukazuje na izdvojenost populacije trakavice. Za potvrdu regionalnog genotipa potrebno je analizirati više primjeraka s različitih lokacija. Bilo bi zanimljivo molekularnim metodama istražiti larvalne oblike u cervidima sa područja Gorskog kotara i Like kako bi se razjasnio životni ciklus trakavice i njezini posrednici u Hrvatskoj.

Molekularnim tipizacijama, kao što je već spomenuto, tek su nedavno otkrivene „skrivene” vrsta poput *Taenia krabbei*, *Taenia martis* i *Taenia arctos* u nositelja, a iste su ranije determinirane kao neke druge, morfološki slične vrste. U ranijim istraživanjima su autori larvalnim oblicima pridruživali imena na osnovi morfološke determinacije, odnosno pridružili su im tada važeća imena prilikom upisivanja sekvenci u banku gena *GenBank*®. Otkrivanjem novih vrsta, kao i učestalim nalazom identičnih sekvenci, sada je jasno da se radi o larvalnim oblicima do tada nepoznatih vrsta trakavica. Iz istog razloga još uvijek ne postoji dogovor oko naziva larvalnih stadija *Taenia krabbei*, *Taenia martis* i *Taenia arctos*. Sekvencama prijavljenim u bazu prije otkrića ovih vrsta nisu pridruživana imena ovih vrsta jer jednostavno nisu postojala. Iz ovog razloga je primjerice sekvenca *Taenia martis* iz našeg istraživanja bila jednaka sekvencama *Cysticercus tenuicollis*, ali i *Taenia martis* u banci gena.

Za uzorke TR8 i TR10 iz lisica, morfološki determinirane kao *Taenia multiceps,* molekularnim je metodama utvrđeno da se radi o vrsti *Taenia crassiceps.* Larvalni oblik *Cysticercus longicollis* je nedavno po prvi puta dokazan i u lisice (KONJEVIĆ i sur., 2016.), a ovim istraživanjem smo potvrdili njenu prisutnost (kao što je i očekivano) u crijevu nositelja.

U trakavica iz mačke i lisice (TR3 i TR41) su dokazane identične sekvence oba gena koje su bile najsličnije (više od 99%) vrsti *Hydatigera taenieformis* sensu stricto. Prilikom morfološke determinacije uzorak TR3 iz mačke je opisan kao *Hydatigera taenieformis* sensu lato, dok je uzorak TR41 opisan kao trakavica iz roda *Taenia.*

Genetskim istraživanjima otkriveno je da *Hydatigera teaniaeformis* s.l. ne predstavlja jedinstvenu vrstu (NAKAO i sur., 2013.) već označava genski složenu skupinu koja uključuje osim *Hydatigera taenieformis* s.s. i *Hydatigera kamyai*, a moguće je i treću vrstu (ili genotip) unutar kompleksa. Istraživanjima u kojima su korištene molekularne metode je ustanovljeno da je *Hydatigera taenieformis* s.s. proširena diljem Azije, Europe, Afrike i Australije (LAVIKAINEN i sur., 2016.), a mi smo dokazali da je prisutna i u Hrvatskoj.

Vrsta *Taenia hydatigena* je rasprostranjena globalno. Molekularne analize primjeraka iz pasa i divljih kanida te larvalnih oblika (*Cysticercus tenuicollis*) iz divljih i domaćih preživača te svinja, dokazale su njezinu prisutnost na mnogim područjima (AL-SABI i sur., 2018.; BOUFANA i sur., 2015.; CENGIZ i sur., 2019.; GORI i sur., 2015.; KARAMON i sur., 2019.; LAVIKAINEN i sur., 2011.; POGLAYEN i sur., 2017.). Smatraju je enzootskom vrstom u Italiji, gdje su larvalni stadiji u ovaca, koza i divljih svinja molekularnim metodama također odgovarali genotipu *Taenia hydatigena* (BOUFANA i sur., 2015.; PAOLETTI i sur., 2018.; SCALA i sur., 2015.). U našem istraživanju larvalni oblici iz ovce i divlje svinje odgovaraju spomenutoj vrsti, a rezultati molekularne analize su u suglasju s morfološkom determinacijom.

Poznato je kako *Echinococcus canadensis*, genotip vrste *Echinococus granulosus* s.l., cirkulira između pasa i domaćih svinja (BRUŽINSKAINTĖ-SCHMIDHALTER i sur., 2009.; CARMENA i CARDONA, 2014.), a ovim istraživanjem je potvrđena prisutnost larvalnih oblika *Echinococcus canadensis* (morfološki deteminiranih kao „ehinokokova cista“) u domaće svinje i u Hrvatskoj. Cistična ehinokokoza, uzrokovana larvalnim oblicima vrste *Echinococcus granulosus* s.l., predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem i ubraja se među pet najčešćih zoonoza na mediteranskom području (VARCASIA i sur., 2018.). Spomenuti nalaz u domaće svinje predstavlja bitan podatak zbog rizika prijenosa spomenute vrste na ljude ako je vrsta zastupljena u ruralnom ciklusu u Hrvatskoj, no u ovome istraživanju nije potvrđena u nositelja, te su potrebna dodatna istraživanja.

Sekvence gena dobivenih iz trakavica pronađenih u domaće kokoši, te nekih trakavica lisice, mačke, ovce i psa su pokazale sličnost manju od 90% s dostupnim sekvencama (Tablica 3.). Na osnovu morfologije, trakavice iz domaće kokoši (TR17, TR19, TR28 i TR29) su determinirane kao vrste iz roda *Raillietina*, a prema dobivenim sekvencama zasigurno možemo isključiti vrste *Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona, Raillietina mitchelli*, *Raillietina sonini* i *Raillietina tunetensis* jer je sličnost

sa spomenutim vrstama bila manja od 85,92%, dok sekvence za ostale vrste iz porodice Davaineidae nisu dostupne. Korištenje molekularnih metoda za identifikaciju vrsta unutar porodice Davaineidae doprinijelo je većim saznanjima o vrstama roda *Raillietina*, ali postoji potreba za dodatnim analizama i korištenjem različitih markera za njihovu identifikaciju (AL QURAISAY i sur. 2019.). Sličnost sekvenci iz lisice (uzorak TR7), primjerka morfološki determiniranog kao vrsta iz roda *Taenia*, sa dostupnim sekvencama u banci gena je bila manja od 85%, što ukazuje na moguću novu vrstu trakavice u Hrvatskoj. Za uzorak TR23 iz ovce morfološki je određeno kako pripada vrsti *Moniezia expansa*, dok su dobivene sekvence pokazale sličnost manju od 90,31% sa svim dostupnim sekvencama, a najsličnija je bila trakavici *Moniezia benedeni*, no nedovoljno da bi se moglo pretpostaviti da se radi o bilo kojoj poznatoj vrsti. Uzorci TR44 iz mačke te TR47 iz psa su morfološki determinirani kao *Dipylidium caninum*, a rezultati molekularne analize ne potvrđuju niti jednu do sada poznatu vrstu čije su sekvence dostupne u banci gena. Naime, uzorak iz mačke molekularno je donekle odgovarao vrsti *Taenia crassiceps* s najvećom sličnosti od 85,19%, što isključuje spomenutu vrstu, a analiza sekvenci kod adulta iz crijeva psa pokazala je donekle sličnost sa vrstom *Taenia regis*. Spomenuta sličnost je iznosila 84,43% što jasno ukazuje da se radi o nekoj drugoj vrsti koja do sada nije genski potvrđena. Uz sve navedeno, potrebna su dodatna istraživanja i analize drugih gena kako bi se razjasnilo radi li se o novim ili o već poznatim vrstama koje do sada nisu genski analizirane.

5.1. Zaključci

1. Molekularnim metodama je dokazano je 10 vrsta trakavica.
2. Po prvi puta su molekularnim metodama dokazane vrste *Moniezia expansa, Dipylidium caninum, Mesocestoides litteratus, Taenia arctos, Taenia crassiceps, Taenia hydatigena, Taenia krabbei*, *Taenia martis, Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto i genotip *Echinococcus canadensis*.
3. U nositelja i u posrednika su dokazane vrste *Taenia krabbei* i *Taenia martis.*
4. Vrste *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum*, *Mesocestoides litteratus*, *Tenia arctos*, *Taenia crassiceps* i *Hydatigera taeniaeformis* s.s. su determinirane iz

crijeva nositelja, a vrste *Taenia hydatigena* i genotip *Echinococcus canadensis* iz tkiva posrednika.

5. Za novih šest sekvenci potrebna su dodatna istraživanja i analize drugih gena, kako bi se razjasnilo radi li se o novim ili o već poznatim vrstama koje do sada nisu genski analizirane.
6. COX gen je bio pogodniji za istraživanja vrsta trakavica.
7. Potrebno je provesti sustavna genska i morfološka istraživanja kako bi se doista dokazala heterogenost populacije trakavica u Hrvatskoj i Europi.

6. LITERATURA

1. ALKHALED, M.J.A., M.A.A. AL-FATLAWI, A.C. KARAWAN (2018): Molecular identification and phylogenetic-tree analysis of *Moniezia* species from sheep in Al Diwaniyah city, Bull. Iraq nat. Hist. Mus. 15 (2), 131-137

2. AL QURAISHY, S.,R. ABDEL-GABER, R. ALAJMI, M.A. DKHIL, M. AL JAWHER, K. MORSY (2019): Morphological and molecular appraisal of cyclophyllidean cestoda parasite *Raillietina saudiae* sp. nov. infecting the domestic pigeon *Columba livia domestica* and its role as a bio-indicator for environmental quality, Parasitology International, 59-72.

3. AL-SABI, M.N.S., C.M.O. KAPEL (2011): Multiplex PCR identification of *Taenia* spp. in rodents and carnivores, Parasitol Res 109, 1293-1298.

4. AL- SABI, M.N.S., P.M. JENSEN, M.U. CHRISTENSEN, C.M.O. KAPEL (2013): Morphological and molecular analyses of larval taeniid species in small mammals from contrasting habitats in Denmark, Journal of Helminthology, 1-6.

5. AL-SABI, M.N.S., L. RÄÄF, E. OSTERMAN-LIND, H. UHLHORN, C.M.O. KAPEL (2018): Gastrointestinal helminths of gray wolves (*Canis lupus lupus*) from Sweden, Prasitology Research 117, 1891-1898.

6. AUER, H., H. ASPÖCK (2014): Helminths and helminthoses in Central Europe: diseases caused by cestodes (tapeworms), Wien Med Wochenschr 164, 414–423.

7. BOBES, R.J., G. FRAGOSO, A. FLEURY, M. GARCÍA-VARELA, E. SCIUTTO, C. LARRALDE, J.P. LACLETTE (2013): Evolution, molecular epidemilogy and perspectives on the research of taenid parasites with special emphasis on *Taenia solium,* Infection, Genetics and Evolution 23, 150-160.

8. BORGSTEEDE, F.H.M., J.H. TIBBEN, J.W.B. VAN DER GIESSEN (2003): The musk rat (*Ondatra zibethicus*) as intermediate host of cestodes in the Netherlands. Vet Parasitol 117, 29-36.

9. BOUFANA, B., A. SCALA, S. LAHMAR, S. POINTING, P.S. CRAIG GIORGIA, A. DESSÌ, A. ZIDDA, P. PIPIA, A. VARCASIA (2015): A preliminary investigation into the genetic variation and population structure of *Taenia hydatigena* from Sardinia, Italy, Veterinary parasitology, http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.003

10. BOWLES, J., D. BLAIR, D.P. McMANUS (1992): Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing,Mol Biochem Parasitol 54(2), 165–173.

11. BOWMAN, D. (2013): Georgis' Parasitology for Veterinarians 10th Edition. Helminths. Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 122-241.

12. BRUŽINSKAITÈ-SCHMIDHALTER, R., M. ŠARKŪNAS, A. MALAKAUSKAS, A. MATHIS, P.R. TORGERSON, P. DEPLAZES (2011): Helminths of red roxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Lithuania, Parasitology 139, 120-127.

13. BRUŽINSKAITÈ-SCHMIDHALTER, R., M. ŠARKŪNAS, P.R. TORGESON, A. MATHIS, P. DEPLAZES (2009): Echinococcus in pigs and intestinal infection with *Echinococcus* spp. In dogs in southwestern Lithuania, Vet Parasitol 160, 237-241.

14. BURLET, P., P. DEPLAZES, D. HEGGLIN (2011): Age, season and spatio-temporal factors affecting the prevalence of *Echinococcus multilocularis* and *Taenia taeniaeformis* in *Arvicola terrestris*. Parasites and Vectors 4, 6.

15. BUTBOONCHOO, P., C. WONGSAWAD (2016): Occurrence and HAT-RAPD analysis of gastrointestinal helminths in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Phayao province, northern Thailand. Saudi J Biol Sci, 24, 30-35

16. CARMENA, D., G.A. CARDONA (2014): Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health, Vet Parasitol. 28, 69-94.

17. CATALANO, S., M. LEJEUNE, G.G. VEROCAI, P.D. DUIGNAN (2013): First report of taenia arctos (Cestoda: Taeniidae) fom grizzly (U*rsus arctos horribilis*) and black bears (*Ursus americanus*) in North America, Parasitol Int 63, 389-391.

18. CENGIZ, G., G.Y. TENEKECI, N. BILGEN (2019): Molecular and Morphological Characterization of *Cysticercus tenuicollis* in Red Deer (*Cervus elaphus*) from Turkey, Acta Parasitologica, doi: 10.2478/s11686-019-00085-1.

19. COOK, R.W., A.L. TRAPP, J.F. WILLIAMS (2003): Pathology of T*aenia taenieformis* infection in the rat: hepatic, lymph node, and thymic changes, J Comparative Pathology 91, 219-226.

20. DEBELJAK, Z., B. BOUFANA, M. INTERISANO, D. VIDANOVIĆ, Z. KULISIĆ, A. CASULI (2016): First insights into the genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu stricto (s.s.) in Serbia, Veterinary Parasitology, 223, 57-62.

21. DEPLAZES, P., R.M. EICHENBERGER, F. GRIMM (2019): Wildlife-transmitted *Taenia* and *Versteria* cysticercosis and coenurosis in humans and other primates, IJP:Parasites and Wildlife 9, 342-358.

22. DIOP, G., T. YANAGIDAB, Z. HAILEMARIAMC, S. MENKIRD, M. NAKAOB, Y. SAKOB, C. TIDIANE BAA, A. ITO (2013): Genetic characterization of *Moniezia* species in Senegal and Ethiopia, Parasitology international 64, 256-260.

23. DYBICZ, M., A. GIERCZAK, J. DĄBROVSKA, L. RDZANEK, B. MICHAŁOWICZ (2013): Molecular diagnosis of cystic echinococcosis in humans from central Poland, Parasitology International 62, 364-367.

24. ETGES, F.R. (1991): The proliferative tetrathyridium of *Mesocestoides vogae* sp. n. (Cestoda), Journal of the Helminthological Society of Washington 58, 181–185.

25. FICHET-CALVET, E., P. GIRAUDOUX, J.P. QUERÉ, R.W. ASHFORD, P. DELATTRE (2003): Is the prevalence of T*aena taenieformis* in *Microtus arvalis* dependent on population density, J Parasitology 89, 1147-1152.

26. FORMENTI, N., M. CHIARI, T. TROGU, A. GAFFURI, C. GARBARINO, M.B. BONIOTTI, C. CORRADINI, P. LANFRANCHI, N. FERRARI (2017): Molecular identification of cryptic cysticercosis: *Taenia ovis krabbei* in wild intermediate and domestic definitive hosts, Journal of Helminthology, 1-7.

27. GUNN, A., S.J. PITT (2012): Parasitology An Integrated Approach. Helminth Parasites. Class Cestoda. Wiley-Blackwell, Chichester, pp. 103-112.

28. GALIMBERTI, A., D.F. ROMANO, M. GENCHI, D. PAOLONI, F. VERCILLO, L. BIZZARRI, D. SASSERA,C. BANDI, C. GENCHI, B. RAGNI, M. CASIRAGHI (2012): Integrative taxonomy atwork: DNA barcoding of taeniids harboured by wildand domestic cats, Molecular Ecology Resources 12, 403-413.

29. GORI, F., M.T. ARMUA-FERNANDEZ, P. MILANESI, M. SERAFINI, M. MAGI, P. DEPLAZES, F. MACCHIONI (2015): The occurrence of taeniids of wolves in Liguria (northern Italy), International Journal for Parasitology, Parasites and Wildlife 4, 252–255.

30. HAUKISALMI, V., A. LAVIKAINEN, S. LAAKSONEN, S. MERI (2011): *Taenia arctos* n. sp. (Cestoda: Cyclophyllidea: Taeniidae) from its definitive

(brown bear *Ursus arctos* Linnaeus) and intermediate (moose/elk *Alces* spp.) hosts, Syst Parasitol 80, 217-230.

31. HOBERG, E.P. (2002): *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance, Microbesand Infection 4, 859–866.

32. HOFER, S., S. MULLER, A. MATHIS, D. HEGGLIN, P. DEPLAZES (2000): High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red foxes (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicola terrestris*) in the city of Zurich, Switzerland. Parasitology 120, 135-142.

33. HRČKOVA, G., M. MITERPÁKOVÁ, A. O'CONNOR2, V. ŠNÁBEL, P.D. OLSON (2011): Molecular and morphological circumscription of *Mesocestoides* tapeworms from red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Europe, Parasitology 138, 638–647.

34. KARAMON, J., J. SROKA, J. DABROVSKA, E. BLISKA-ZAJĄC, J. ZDYBEL, M. KOCHANOWSKI, M. RÓŻYCKI, T. CENCEK (2019): First report of *Echinococcus multilocularis* in cats in Poland: a monitoring study in cats and dogs from a rural area and animal shelter in a highly endemic region, Parasites Vectors 12, 313.

35. KARNAŚ, S., I.A. WIERZBOWSKA, P. GÓRSKI, H. OKARMA (2013): Occurrence of internal parasites in stone martens (*Martes foina)* from Cracow and suburbs. Ann. Parasitol. 59, 203-205.

36. KAZACOS, K.R. (2003): Cystic and alveolar hydatid disease caused by *Echinococcus* species in the contiguous United States, Comp Cont Educ Pract Vet 25, 16-20.

37. KOCH, T., C. SCHOEN, B. MUNTAU, M. ADDO, H. OSTERTAG, B. WIECHENS, D. TAPPE (2016): Case Report: Molecular Diagnosis of Human *Taenia martis* Eye Infection, Am. J. Trop. Med. Hyg., 94, 1055–1057.

38. KONJEVIĆ, D., T. ŽIVIČNJAK, A.G. KURILJ, M. SINDIČIĆ, F. MARTINKOVIĆ, D.S. JAN (2016): When things go wrong: *Cysticercus longicollis* in an adult wild red fox (*Vulpes vulpes*), Parasitology Research 115 (3), 1345-1348.

39. KUMAR, J.M., P.I. REDDY, V. APARNA, G. SRINIVAS, P. NAGARAJAN, R. VENKATESAN, C. SREEKUMAR, B. SESIKARAN (2006): *Strobilocereus fasciolaris* infection with hepatic sarcoma and gastroenteropathy in a Wistar colony, Vet Parasitology 141, 362-367.

40. LAAKSONEN, S., P. PAULSEN (2015): Hunting hygiene, Wageningen, Wageningen Academic Publishers.

41. LAVIKAINEN, A., I. TAKASHI, V. HAUKISALMI, S. KONYAEV, M. CASIRAGHI, N. E. DOKUCHAEV, A. GALIMBERTI, A. HALAJIAN, H. HENTTOONEN, M. ICHIKAWA-SEKI, T.ITAGAKI, A. KRIVOPALOV, S. MERI, S. MORAND, A. NÄREAHO, G. E. OLSSON, A. RIBAS, Y.TEREFE, M. NAKAO (2016): Reappraisal of *Hydatigera taeniaeformis* (Batsch, 1786) (Cestoda: Taeniidae) sensu lato with description of H*ydatigera kamiyai* n. sp., International Journal for Parasitology, 46, 361-374.

42. LAVIKAINEN, A., S. LAAKSONEN, K. BECKMEN, A. OKSANEN, M. ISOMURUSU, S. MERI (2011): Molecular identification of *Taenia* spp. in wolves (*Canis lupus)*, brown bears (*Ursus arctos*) and cervids from North Europe and Alaska, Parasitol Int 60, 289-295.

43. LAVIKAINEN, A., V. HAUKISALMI, M.J. LEHTINEN, S. LAAKSONEN, S. HOLMSTÖRM, M. ISOMURUSU i sur. (2010): Mitochondrial DNA data reveal cryptic species *Taenia krabbei*, Parasitol Int 59, 290-300.

44. LESCANO, A.G., J. ZUNT (2013): Other cestodes: sparagnosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis, Handbook of Clinical Neurology 114, Chapter 27

45. LIANG, J.Y., R.Q. LIN (2015): The full mitochondrial genome sequence of *Raillietina tetragona* from chicken (Cestoda: Davaineidae), Mitochondrial DNA, 4160-4161.

46. LIN, Y.C., Y. RIKIHISA. H. KONO, Y. GU (1990): Effects of larval tapeworm (*Taenia taenieformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats, Experimental Parasitology 70, 344-352

47. LITERÁK, I., F. TENORA, V. LETKOVÁ, M. GOLDOVÁ, J. TORRES, P.D. OLSON (2006): *Mesocestoides litteratus* (Batsch, 1786) (Cestoda: Cyclophyllidea: Mesocestoididae) from the red fox: morphological and 18S rDNA characterization of European isolates, Helminthologia 43, 191–195.

48. LITERÁK, I., P.D. OLSON, B.B. GORGIEV, M. ŠPAKULOVÁ (2004): First record of metacestodes of *Mesocestoides* sp. in the common starling (*Sturnus vulgaris*) in Europe, with an 18S rDNA characterization of the isolate, Folia Parasitol 51 45–49.

49. LOOS-FRANK B. (1991): One or two intermediate hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidae, Mesocestoididae), Parasitol Res77, 726–780.

50. MATHY, A., R. HANOSSET, S. ADANT, B. LOSSON (2009): The carriage of larval *Echinococcus multilocularis* and other cestodes by the musk rat (*Odontra zibethicus*) along the Ourthe River and its tributaries (Belgium), J. Wildl. Dis., 45, 279-287.

51. McCALLISTER, C.T., D. BRUCE CONN, P.S. FREED, D.A. BURDICK (1991): A new host and locality record for *Mesocestoides* sp. tetrathyridia (Cestoidea: Cyclophyllidea), with a summary of the genus from snakes of the world, J Parasitol 77, 329–331.

52. MILLAN, J., C.E. REAL, E. FERROGLIO (2001): Helminth parasites in stone matens (*Martes foina*) from Italy., Z. Jagdwiss., 47, 229-231.

53. NAKAO, M., T. YANAGIDA, S. KONYAEV, A. LAVIKAINEN, V.A. ODNOKURTSEV, V.A. ZAIKOV, A. ITO (2013): Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taenidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes, Parasitology 140, 1625-1636.

54. NGUYEN, T.D., Q.D. LE, V.V. HUYNH, S.T. NGUYEN,, T.V. NGUYEN, H. VU-KHAC (2011): The development of PCR methodology for the identification of species of the tapeworm *Moniezia* from cattle, goats and sheep in central Vietnam, Journal of Helminthology 86, 426–429.

55. NGUYEN, M.T.T., S. GABRIËL, E.N. ABATIH, P. DORNY (2016): A systematic review on the global occurrence of *Taenia hydatigena* in pigs and cattle, Vet Parasitol 226, 97-103.

56. PAOLETTI, B., L. DELLA SALDA ,A. DI CESARE, R. IORIO, A. VERGARA, C. FAVA, A. OLIVASTRI, G. DESSÌ, A. SCALA, A. VARCASIA (2018): Epidemiological survey on cystic echinococcosis in wild boar from Central Italy, Parasitology Research 118, 43-46.

57. PERMIN, A., J.W. HANSEN (2003): The Epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites. A FAO Handbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy., p 36-39.

58. POGLAYEN, G., F. GORI, B. MORANDI, R. GALUPPI, E. FABBRI, R. CANIGLIA, P. MILANESI, M. GALAVERNI, E. RANDI, B. MARCHESI, P. DEPLAZES (2017): Italian wolves (*Canis lupus italicus* Altobello, 1921) and molecular detection of taeniids in the Foreste Casentinesi National Park, Northern Italian Apennines, Int J Parasitol Parasites Wildl. 6, 1–7.

59. RAMNATH, D.B., A.K. DUTTA, B. DAS, V. TANDON (2012): Molecular characterization of the Indian poultry nodular tapeworm, *Raillietina echinobothrida* (Cestoda: Cyclophyllidea: Davaineidae) based on rDNA internal transcribed spacer 2 region, J Parasit Dis, 22-26.

60. RAUSCH, R.L. (1994). Family Mesocestoididae Fuhrmann, 1907. In Keysto the Cestode Parasites of Vertebrates (KHALIL, L.F., A. JONES, R.A. BRAY), pp. 309–314. CAB International, Wallingford, UK

61. REPERANT, L.A., D. HEGGLIN, I. TANNER, C. FESCHER, P. DEPLAZES(2009): Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. Parasitology 136, 329–337.

62. ROELFSEMA, J.H., N. NOZARI, E. PINELLI, L.M. KORTBEEK (2016): Novel PCRs for differential diagnosis of cestodes, Experi Parasitology 161, 20-26.

63. ROINIOTI, E., A. PAPATHANASSOPOULOU, I. THEODOROPOULOU, G. THEODOROPOULOS (2016): Molecular identification of *Echinococcus granulosus* isolates from ruminants in Greece, Veterinary Parasitology, 226, 138-144.

64. SAARI, S., A. NÄREAHO, S. NIKANDER (2018): Canine parasites and parasitic diseases: Cestoda (Tapeworms), Academic Press, London, pp. 55-81.

65. SAŁAMATIN, R., J. KOWAL, P. NOSAL, S. KORNAŚ, D. CIELECKA, D. JAŃCZAK, W. PATKOWSKI, J. GAWOR, V. KORNYUSHINO, E. GOLAB, V. ŠNÁBEL (2017): Cystic echinococcosis in Poland: genetic variability and the first record of *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1 genotype) in the country, Parasitol Res 116, 3077–3085.

66. SCALA, A., A.P. PIPIA, F. DORE, G. SANNA, C. TAMPONI, R. MARROSU, E. BANDINO, C. CARMONA, B. BOUFANA, A. VARCASIA (2015): Epidemiological updates and economic losses due to *Taenia hydatigena* in sheep from Sardinia, Italy, Parasitol Res 114, 3137-3143.

67. SOULSBY, E.J.L (1986): Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Philadelphia, Lea and Febiger

68. SPASKII, A.A. (1951) Essentials of cestodology, Vol. 1: Anoplocephalate tapeworms of domestic and wild animals. Moscow, Academy of Sciences of the USSR

69. STERBA, J., V. BARUS (1976): First record of *Strobilocereus fasciolaris* (Taenidae-larvae) in man, Folia Parasitologica 23, 221-226.

70. TAPPE, D., J. BERKHOLZ, U. MAHLKE, H. LOBECK, T. NAGEL, A. HAEUPLER, B. MUNTAU, P. RCZ, S. POPPERT (2016): Molecular Identification of Zoonotic Tissue-Invasive Tapeworm Larvae Other than *Taenia solium* in Suspected Human Cysticercosis Cases, J Clin Microbiol. 54, 172–174.

71. TRACHSEL, D., P. DEPLAZES, A. MATHIS (2007): Identification of taeniid eggs in the faeces from carnivores based on multiplex PCR using targets in mitochondrial DNA, Parasitology. 134(6), 911-920.

72. UMHANG, G., O. CHIHAI, V. BASTID, F.E. GRENOUILLET, D. ERHAN, A. HOTINEANU, V. LUNGU, S. RUSU, F. GRENOUILLET, F. BOUE (2019): Molecular identification of cystic echinococcosis in humans and pigs reveals the presence of both *Echinococcus* sensu stricto and the *Echinococcus canadensis* G6/G7 in the hyperendemic focus of the Republic Moldova, Parasitology research 18, 2857-2861.

73. VARCASIA, A., D. SANNA, M. CASU, S.LAHMAR, G. DESSÌ, A.P. PIPIA, C. TAMPONI, G. GAGLIO, G. HRČKOVÁ, D. OTRANTO, A. SCALA (2018): Species delimitation based on mtDNA genes suggests the occurrence of new species of *Mesocestoides* in the Mediterranean region, Parasites and Vectors 619

74. WAESCHENBACH, A., B.L. WEBSTER, D.T.J. LITTLEWOOD (2012): Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA, Molecular Phylogenettics and Evolution 63, 834-847.

75. WANZHONG, J., Y. HONGBIN, L. ZHONGZI, V. DYACHENKO, L. HONGMIN, D.T.J LITTLEWOOD (2012): Mitochondrial genes and genomes support a cryptic species of tapeworm within *Taenia taenieformis*, Acta Tropica 123, 154-163.

76. ZALEŚNI, G., J. HILDEBRAND (2011): Molecular identification of *Mesocestoides* spp. from intermediate hosts (rodents) in central Europe (Poland), Parasitol Res 110, 1055–1061.

7. SAŽETAK

GENSKA TIPIZACIJA ARHIVIRANIH UZORAKA NEDETERMINIRANIH TRAKAVICA I NJIHOVIH LARVALNIH STADIJA IZ DOMAĆIH I DIVLJIH ŽIVOTINJA SEKVENCIRANJEM NAD I COX GENA

Morfološka identifikacija trakavica je složena i zahtjevna te podrazumijeva sve dobro očuvane dijelove za pravilnu determinaciju. Osnovni cilj je ovim diplomskim radom bilo genetičkim tipiziranjem odrediti vrstu trakavice ili larvalnog stadija iz arhiviranih uzoraka determiniranih nakon razudbe isključivo na osnovi morfologije.

Metodi lančane reakcije polimerazom sa ciljem genske tipizacije i određivanja vrste su podvrgnute trakavice ili larvalni oblici trakavica pronađeni kod 47 životinja. Izdvojena DNK je pretražena lančanom reakcijom polimerazom usmjerenom na umnažanje NAD i COX gena. Umnoženi odsječci su pročišćeni, sekvencionirani u oba smjera, te uspoređeni sa dostupnim sekvencama u banci gena *GenBank®.*

Molekularnim je metodama dokazano 10 vrsta trakavica. Po prvi puta u Hrvatskoj su na taj način dokazane vrste *Moniezia expansa, Dipylidium caninum, Mesocestoides litteratus, Taenia arctos, Taenia cracciceps, Taenia hydatigena, Taenia krabbei, Taenia martis, Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto i genotip *Echinococcus canadensis*. U nositelja i posrednika dokazane su vrste *Taenia krabbei* i *Taenia martis.* Vrste *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum*, *Mesocestoides litteratus*, *Tenia arctos*, *Taenia crassiceps* i *Hydatigera taeniaeformis* sensu stricto su determinirane u nositelju, a vrste *Taenia hydatigena* i genotip *Echinococcus canadensis* u posredniku. Za 6 novih sekvenci su potrebna dodatna istraživanja.

Ključne riječi: Cestoda, PCR, NAD, COX, sekvenciranje

8. SUMMARY

GENE CHARACTERIZATION BY NAD AND COX GENE SEQUENCE ANALYSIS ON THE UNDETERMINED ADULT AND LARVAL CESTODES ARCHIVED SAMPLES FROM DOMESTIC AND WILD ANIMALS

The morphological identification of cestodes is complex and demanding and it requires well-preserved parasite for proper determination. The aim of the research was the molecular gene characterization of archived 47 samples of adult or larval cestodes that had been determined solely based on morphology after being found in animals during necropsy. Samples were subjected to DNA extractions, enzymatic amplifications and sequencing. The mtDNA regions were amplified using previously published NAD and COX primers. The replicated sections were purified, sequenced in both directions and compared with the available sequences in the GenBank®.

Finaly, 10 tapeworm species were molecularly detected. For the first time, *Moniezia expansa, Dipylidium caninum, Mesocestoides litteratus, Taenia arctos, Taenia crassiceps, Taenia hydatigena, Taenia krabbei, Taenia martis, Hydatigera taeniaeformis* s.s. and *Echinococcus canadensis* genotype were molecularly determined in Croatia. *Taenia krabbei* and *Taenia martis* were determined in definitive and intermediate host. *Moniezia expansa*, *Dipylidium caninum*, *Mesocestoides litteratus, Tenia arctos, Taenia crassiceps* and *Hydatigera taeniaeformis* s.s. were determined in the definitive host, and *Taenia hydatigena* and *Echinococcus canadensis* genotype in the intermediate host. Six new sequences showed less than 90% compatibility and require additional research.

Keywords: Cestoda, PCR, NAD, COX, sequencing

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. lipnja 1994. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Odra u Novom Zagrebu. U tom razdoblju sam sudjelovala na državnom natjecanju iz biologije na kojem sam ostvarila 4. mjesto. Kao učenica generacije upisala sam X. gimnaziju "Ivan Supek". U sklopu srednjoškolskog obrazovanja više puta sam sudjelovala u ekološkom natjecanju hrvatske mladeži - "Lijepa Naša".

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2013. godine. Sudjelovala sam na istraživanju adenokarcinoma apokrinih žlijezda analnih vrećica u pasa na Zavodu za patologiju uz asistenciju i nadzor docenta Ivan-Conrado Šoštarić-Zuckermann-a te je ovaj znanstveni rad nagrađen Rektorovom nagradom akademske godine 2016./2017 i predstavljen na sedmom međunarodnom kongresu "Veterinarska znanost i struka" 2017. godine.

Opredijelila sam se za usmjerenje - Higijena animalnih namirnica i javno zdravstvo te sam 2018. godine pohađala nastavu i polagala ispit u sklopu - "*Summer School of Food Hygiene*" na Veterinarskom i farmaceutskom fakultetu u Brnu, Češka.

Pohađala sam nastavu u sklopu VetNest ljetne škole - "*Animal Welfare, Veterinary Ethics, Law and Communication Skills*" na Vetmeduni fakultetu i Sveučilištu u Beču, Austrija.

Posljednji projekt u koji sam bila uključena je "Plavi projekt - doprinos razvoju programa društveno korisnog učenja na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu". Projek je bio organiziran ciljem zaštite morskih kornjača i dupina Jadranskog mora te edukacije ljudi i pružanja korisnih informacija o spomenutim životinjama.

2017. godine započela sam volonterski rad na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu gdje sam dobila priliku sudjelovati u istraživanju koje je predstavljeno ovim diplomskim radom.