

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

ŽELJKA SABOL

PRVI DOKAZ OBLIĆA *SETARIA TUNDRA* U SRNA U HRVATSKOJ
MOLEKULARNOM METODOM

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za biologiju, patologiju i uzgoju divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Magde Sindičić, u sklopu znanstvenog projekta „Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja“ Hrvatske zaklade za znanost, voditelja doc. dr. sc. Deana Konjevića, Dipl. ECZM (WPH) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017.

KRATICE:

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

PCR – lančana reakcija polimerazom

cox1 – citokrom oksidaza podjedinica 1

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

SADRŽAJ:

UVOD	1
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	2
MATERIJALI I METODE	2
REZULTATI.....	3
RASPRAVA.....	4
ZAKLJUČAK	5
ZAHVALE	6
POPIS LITERATURE	7
SAŽETAK.....	9
SUMMARY	10

UVOD

Rod *Setaria* (red *Spirurida*, nadporodica *Filarioidea*, porodica *Setariidae*) obuhvaća 43 vrste oblića koje parazitiraju u peritonealnoj šupljini unglulata (ANDERSON, 2000.). Bijele su boje, a tijelo prekriveno kutikulom se sužava prema savinutom repu. Morfološko obilježje roda je hitinski prsten oko usta. Ženke imaju velike ovarije, a uterus završava vulvarnim otvorom. Mužjaci imaju kopulatornu burzu s dva nejednaka spikula (ANDERSON, 2000.).

Predilekciono mjesto parazitiranja oblića iz roda *Setaria* je peritonealna šupljina. Odrasle ženke polažu larve (mikrofilarije) u trbušnu šupljinu nositelja te one ulaze u krvne žile i putem njih dospijevaju u kapilare u koži. Posrednici su komarci (*Culicidae* spp.) i muhe (*Haematobia* spp.) koji se invadiraju sišući krv u kojoj se nalaze mikrofilarije. U posrednicima se mikrofilarije za 2-3 tjedna razvijaju u invazivne larve, koje hematofagni posrednici prenose na nositelja tijekom sisanja krvi. Larve u nositelju zatim putuju krvlju do peritonealne šupljine gdje se razvijaju do adultnog oblika (ANDERSON, 2000.).

Larve *Setaria* spp. u nespecifičnim nositeljima, poput konja, ovaca i koza, migriraju do središnjeg živčanog sustava, te dovode do ozbiljnih i često smrtonosnih neuroloških poremećaja, poznatih pod nazivom epizootska cerebrospinalna setarioza (cerebrospinalna nematodiaz, kumri ili lumbalna paraliza) (SUNDAR i D' SOUZA, 2015.). Odrasli paraziti uglavnom nisu patogeni, ali ponekad mogu izazvati fibrinozni peritonitis. Posebnost čini pojava peritonitisa u sobova (*Rangifer tarandus*) u Finskoj (LAAKSONEN i sur., 2007.) uzrokovanih oblicem *Setaria tundra*, što s veterinarskog stajališta ukazuje na potencijalni rizik za zdravlje jelenske divljači te potiče na praćenje pojavnosti ovog oblića.

Osim kod sobova, parazit *Setaria tundra* zabilježen je i kod srna (*Capreolus capreolus*), kod kojih u većini slučajeva invazija prolazi subklinički, stoga se one smatraju rezervoarom parazita (LAAKSONEN i sur., 2007.). Oblič *S. tundra* u srna u Europi je do sada dokazana u Austriji (KUTZER i HINAIDY, 1969.), Švicarskoj (ANDREWS i sur., 1974.), Njemačkoj (REHBEIN i sur.2001.; CZAJKA i sur., 2012.;), Italiji (FAVIA i sur., 2003.), Francuskoj (FERRI i sur., 2009.), Mađarskoj (KEMENSEI i sur., 2015.; ZITTRA i sur. 2015.), Španjolskoj (ANGELONE-ALASAAD i sur., 2016.), Poljskoj (KOWAL i sur., 2013.; MASNY i sur., 2013.) i Danskoj (ENEMARK i sur. 2017.).

Jedini literaturni podatci o pronalasku parazita iz roda *Setaria* u Hrvatskoj potječu iz 1958. godine (RICHTER, 1959.). Pri tome je identificirana vrsta *Setaria labiato-papillosa* (kasnije *S. labiatopapillosa*), a koja je pronađena u trbušnoj šupljini 34% pregledanih srna s

područja Dugog Sela, Garešnice, Karlovca, Koprivnice, Kostajnice, Krapine, Rijeke, Siska, Virovitice i Zagreba.

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Budući da posljednji zabilježeni podatak o parazitima iz roda *Setaria* u Hrvatskoj potječe iz davne 1958. godine kada je vrsta *Setaria labiatopapillosa* identificirana u srna (RICHTER, 1959.), cilj ovog znanstvenog rada bio je utvrditi pojavnost oblića *Setaria* spp. u srna (*Capreolus capreolus*) u Hrvatskoj te molekularnim metodama identificirati koje vrste prevladavaju.

MATERIJALI I METODE

Uzorci (cijele lešine ili probavni sustav) 45 srna običnih (*Capreolus capreolus*) dostavljeni su na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja“. Dostavljene srne odstrijeljene su u sklopu redovite provedbe lovno-gospodarskih osnova, a potječu iz lovišta s područja grada Zagreba (9), Zagrebačke županije (28), Sisačko-moslavačke županije (1), Bjelovarsko-bilogorske (1) i Međimurske županije (6).

Uzorke sam pregledavala na Zavodu za veterinarsku patologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prema uobičajenom obdukcijском protokolu. Prilikom otvaranja trbušne šupljine tražila sam slobodne oblice u peritonealnoj šupljini, među zavojima crijeva i režnjevima jetre. Morfologija prikupljenih oblića pregledana je pod svjetlosnim mikroskopom (ANDERSON, 2000.) te su uzorci zatim pohranjeni u 96% etanol do molekularne identifikacije.

Za izolaciju DNK koristila sam komercijalni kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, a izolaciju sam napravila prema uputama proizvođača. Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnožila sam dio podjedinice 1 gena citokrom okidaze (cox1), pomoću početnica cox1int F (5'-TGATTGGTGGTTTTGGTAA-3') i cox1int R (5'-ATAAGTACGAGTATCAATATC-3') (CASIRAGHI, 2001.). PCR reakcija provedena je u

smjesi količine 25 μ L koja je sadržavala 2 μ L DNK, 0,25 μ M početnica, 0,25 mM smjese nukleotida, 1,5 nM $MgCl_2$, te 1,25 U Promega GoTaq G2 Hot Start polymerase. Početna denaturacija izvodila se na 95°C tijekom 2 min, zatim 35 ciklusa od 1 min na 94°C, 1 min na 52°C i 1 min na 72°C. Završno produljivanje lanca odvijalo se 5 minuta na 72°C.

Uspješnost PCR reakcije, provjerila sam elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu, pri sobnoj temperaturi i pri naponu od 90 V u trajanju od 40 minuta. Gelovi su promatrani u transiluminatoru. PCR proizvode poslala sam na sekvenciranje u servis MacroGen Europe u Amsterdamu, Nizozemska, a rezultate sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) dobila sam u ab1 i PDF formatu. Pomoću alata nucleotide blast pretražila sam GenBank bazu u potrazi za sličnim sekvencama.

REZULTATI

Obliče sam pronašla u trbušnoj šupljini 11 pregledanih srna (24,4 %) (Slika 1, Tablica 1). Na temelju morfološkog pregleda utvrdili smo da se radi o parazitima iz roda *Setaria*.



Slika 1. *Setaria spp.*

Tablica 1. Broj pozitivnih uzoraka prema mjestu porijekla uzorka

ŽUPANIJA	BROJ UZORAKA	POZITIVNI	%
Grad Zagreb	9	2	22 %
Zagrebačka	28	7	25 %
Bjelovarsko – bilogorska	1	1	100 %
Sisačko – moslavačka	1	0	0 %
Međimurska	6	1	17 %

Izolirala sam DNK iz ukupno 11 parazita, po jedan iz svake invadirane jedinke. Odsječak *cox1* gena duljine 514 parova baza uspješno je umnožen kod svih 11 uzoraka. Usporedbom sa slijedovima pohranjenim u GenBank bazi podataka utvrdila sam da paraziti pronađeni u ovom istraživanju pripadaju vrsti *Setaria tundra*.

RASPRAVA

Istražila sam prisutnost oblića iz roda *Setaria* u trbušnoj šupljini srna, te sam po prvi puta molekularnim metodama dokazala prisutnost parazita *Setaria tundra* u Hrvatskoj. Jedini dostupni zapisi o parazitima iz roda *Setaria* u Hrvatskoj potječu iz 1958. godine, kada je utvrđena prisutnost oblića *Setaria labiatopapillosa* u trbušnoj šupljini srna (RICHTER, 1959.).

Prema dostupnoj literaturi oblič *Setaria labiatopapillosa* pronađena je u antilope (*Antilocapra americana*), američkog bizona (*Bison bison*), losa (*Alces alces*), karibua (*Rangifer caribou*), bijelorepog jelena (*Odocoileus hemionus*), debeloroge ovce (*Ovis canadensis*) i konja (BECKLUND i WALKER, 1969.) te goveda (SINGH i sur., 2015.). Osim istraživanja RICHTER (1958.), nisam pronašla druge literaturne zapise o prisutnosti vrste *Setaria labiatopapillosa* u srna. Problem predstavlja činjenica da RICHTER (1958.) ne navodi morfološki opis vrste koju je identificirao kao *S. labiatopapillosa* pa je danas nemoguće provjeriti točnost tih rezultata. To otvara mogućnost da je RICHTER (1958.) s obzirom na tadašnje nepoznavanje morfoloških karakteristika za razlikovanja navedene vrste u odnosu na vrstu *S. tundra* (LIANG-SHENG, 1959.) pogrešno identificirao parazita. Napretkom znanosti

danas je moguće morfološki razlikovati ove dvije vrste pa literatura navodi da ženke *Setaria labiatopapillosa* imaju pravokutne lateralne usne na peribukalnoj kruni (SUNDAR, 2015.), dok ženke *S. tundra* nemaju lateralnih usana (NIKANDER i sur., 2007.). S obzirom na nedostatak slika i detaljnih opisa pronađenih parazita teško je danas provjeriti točnost navoda RICHTERA (1959.).

Oblič *S. tundra* je do sada potvrđena u srna u sjevernoj, zapadnoj i južnoj Europi (KUTZER i HINAIDY, 1969.; ANDREWS i sur., 1974.; REHBEIN i sur., 2001.; FAVIA i sur., 2003.; FERRI i sur., 2009.; CZAJKA i sur., 2012.; MANSY i sur., 2013.; KOWAL i sur., 2013.; KEMENSEI i sur., 2015.; ZITTRA i sur., 2015; ANGELONE-ALASAAD i sur., 2016.; ENEMARK i sur. 2017.), dok moj dokaz u Hrvatskoj predstavlja prvi nalaz ovog oblića na jugoistoku Europe, odnosno na Balkanskom poluotoku. To može biti posljedica izostanka istraživanja u ovom dijelu Europe ili je moguće širenje područja rasprostranjenosti parazita. Naime, *Setarie* prenose komarci i muhe, a zbog klimatskih promjena koje utječu na rasprostranjenost komaraca moguće je da se širi njihov areal, a samim time šire se i bolesti koje oni prenose.

S obzirom da je srna najbrojnija divljač u Hrvatskoj s dobrim ekonomskim potencijalom, neophodno je pratiti učestalost svih uzročnika bolesti koje mogu uzrokovati ekonomske gubitke. Iako kod srna u Europi do sada nije uvrđena klinička slika uzrokovana vrstama iz roda *Setaria*, pojava epidemije kod sobova (*Rangifer tarandus*) u Finskoj upućuje na dodatan oprez (LAAKSONEN i sur., 2007.).

ZAKLJUČAK

1. Koristeći molekularnu metodu prvi puta sam dokazala prisutnost oblića *Setaria tundra* u srna (*Capreolus capreolus*) u Hrvatskoj.
2. Budući da u literaturi ne postoje podatci o prisutnosti *Setaria labiatopapillosa* u srna te da tadašnja literatura navodi da je teško morfološki razlikovati vrste *Setaria tundra* i *Setaria labiatopapillosa* mišljenja sam da je RICHTER (1959.) najvjerojatnije pogrešno identificirao vrstu *Setaria labiatopapillosa* u srna u Hrvatskoj.

ZAHVALE

Zahvaljujem doc. dr. sc. Deanu Konjeviću, Dipl. ECZM (WPH), voditelju projekta „Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja“ na ustupljenim uzorcima koji su mi omogućili izradu ovog studentskog rada, te financijskoj potpori kroz navedeni projekt Hrvatske zaklade za znanost. Zahvaljujem asistentu na projektu Miljenku Bujaniću, dr. med. vet. na pomoći tijekom obdukcije srna i prikupljanju uzoraka. Zahvaljujem višem asistentu dr. sc. Franji Martinkoviću na pomoći prilikom morfološke identifikacije parazita. Posebno zahvaljujem doc. dr. sc. Magdi Sindičić koja je svojom stručnošću, strpljenjem i voljom doprinjela izradi ovog rada.

POPIS LITERATURE

- ANDERSON, R.C. (2000): Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2nd ed. Folia Parasitol. 47, 314.
- ANDREWS, J. R., B. HORNING, A. WANDELER (1974): Endoparasites of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from Switzerland with special reference to hosts from the Emmental region of Canton Berne. Rev. Suisse. Zool. 81, 13-24.
- ANGELONE-ALASAAD, S., M. J. JOWERS, R. PANADERO, A. PEREZ-CREO, G. PAJARES, P. DÍEZ-BANOS, R.C. SORIGUER, P. MORRONDO (2016): First report of *Setaria tundra* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the Iberian Peninsula inferred from molecular data: epidemiological implications. Parasit. Vectors 9, 521.
- BECKLUND, W. W., M. L. WALKER (1969): Taxonomy, Hosts, and Geographic Distribution of the Setaria (Nematoda: Filarioidea) in the United States and Canada. J. Parasitol. 55, 359-368.
- CASIRAGHI, M., T. J. C. ANDERSON, C. BANDI, C. BAZZOCCHI, C. GENCHI (2001): A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. Parasitology 122, 93-103.
- CZAJKA, C., N. BECKER, S. POPPERT, S. JOST, J. SCHMIDT-CHANASIT, A. KRÜGER (2012): Molecular detection of *Setaria tundra* (Nematoda: Filarioidea) and an unidentified filarial species in mosquitoes in Germany. Parasit. Vectors 5, 14.
- DARABUŠ, S., I. Z. LAKELIĆ (2002): Osnove lovstva. Hrvatski lovački savez, Zagreb, 83-95.
- ENEMARK LARSEN, H., A. OKSANEN, M. CHRIEL, J. LE FEVRE HARSLUND, I. D. WOOLSEY, M. N. S. AL-SABI (2017): Detection and molecular characterization of the mosquito-borne filarial nematode *Setaria tundra* in Danish roe deer (*Capreolus capreolus*). Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 6, 16-21.
- FAVIA, G., G. CANCRINI, E. FERROGLIO, M. CASIRAGHI, I. RICCI, L. ROSSI (2003): Molecular assay for the identification of *Setaria tundra*. Vet. Parasitol. 117, 139-145.
- FERRI, E., M. BARBUTO, O. BAIN, A. GALIMBERTI, S. UNI, R. GUERRERO, H. FERTE, C. BANDI, C. MARTIN, M. CASIRAGHI (2009): Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). Front. Zool. 6, 1.
- KEMENESI, G., K. KURUCZ, A. KEPNER, B. DALLOS, M. OLDAL, R. HERCZEG, P.

- VAJDOVICS, K. BANYAI, F. JAKAB (2015): Circulation of *Dirofilaria repens*, *Setaria tundra*, and *Onchocercidae* species in Hungary during the period 2011-2013. *Vet. Parasitol.* 214, 108-113.
- KOWAL, J., S. KORNAS, P. NOSAL, M. BASIAGA, M. LESIAK (2013): *Setaria tundra* in roe deer (*Capreolus capreolus*) – new findings in Poland. *Ann. Parasitol.* 59, 179-182.
- KUTZER, E., H. K. HINAIDY (1969): Die Parasiten der wildlebenden Wiederkauer Osterreichs. (In German with English summary). *Z. Parasitenkd.* 32, 354-368.
- LAAKSONEN, S., J. KUUSELA, S. NIKANDER, M. NYLUND, A. OKSANEN (2007): Outbreak of parasitic peritonitis in reindeer in Finland. *Vet. Rec.* 160, 835-841.
- LIANG-SHENG, Y. (1959): A Revision of the Nematode Genus *Setaria* Viborg, 1795, its Host-parasite Relationship, Speciation and Evolution. *J. Helminthol.* 33, 1-98.
- MASNY, A., W. ROZEJ-BIELICKA, B. E. GOŁA (2013): Description of *Setaria tundra* invasive larvae in a mosquito vector in Poland. *Ann. Parasitol.* 59, 178.
- NIKANDER, S., S. LAAKSONEN, S. SAARI, A. OKSANEN (2007): The morphology of the filaroid nematode *Setaria tundra*, the cause of peritonitis in reindeer *Rangifer tarandus*. *J. Helminthol.* 81, 49-55.
- REHBEIN, S., W. LUTZ, M. VISSER, R. WINTER (2001): Investigation of the parasite fauna of game animals of North Rhine e Westfalia. 2. Endoparasites of fallow deer (In German with English summary). *Z. Jagdwiss.* 47, 1-16.
- RICHTER, S. (1959): Parasitska fauna srne (*Capreolus capreolus* L.) u NR Hrvatskoj. *Vet. Arh.* 29, 34-45.
- SINGH, H., N. K. SINGH, N. D. SINGH, JYOTI, S. S. RATH (2015): Occurrence of *Setaria labiatopapillosa* in peritoneal cavity of a crossbred cattle. *J. Parasit. Dis.* 39, 152-154.
- SUNDAR, S. T. B., P.E. D'SOUZA (2015): Morphological characterization of *Setaria* worms collected from cattle. *J. Parasit.* 39, 572-576.
- ZITTRA, C., Z. KOCZIHA, S. PINNYEI, J. HARL, K. KIESER, A. LACINY, B. EIGNER, K. SILBERMAYR, G. G. DUSCHER, E. FOK, H. P. FUEHRER (2015): Screening blood-fed mosquitoes for the diagnosis of filarioid helminths and avian malaria. *Parasit. Vectors* 8, 1.

ŽELJKA SABOL

Studentica 6. godine, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Prvi dokaz oblića *Setaria tundra* u srna u Hrvatskoj molekularnom metodom

SAŽETAK

Rod *Setaria* obuhvaća 43 vrste oblića koji parazitiraju u peritonealnoj šupljini ungulata. Posrednici su komarci (*Culicidae* spp.) i muhe (*Haematobia* spp.) koji se invadiraju sišući krv s mikrofilarijama. Odrasli paraziti uglavnom nisu patogeni, te uzrokuju blaži fibrinozni peritonitis. S veterinarskog gledišta važno je pratiti pojavnost vrste *Setaria tundra*, budući da u divljih životinja može izazvati epidemiju peritonitisa s velikim ekonomskim gubitcima. U Hrvatskoj posljednji zabilježeni podaci o pojavnosti parazita iz roda *Setaria* datiraju iz 1958., kad je dijagnosticirana *Setaria labiato-papillosa* u srna pa je cilj ovog istraživanja bio utvrditi vrste iz roda *Setaria* koje danas prevladavaju kod srna u Hrvatskoj. Istraživanje je provedeno na 45 uzoraka srna običnih (*Capreolus capreolus*), te su oblići pronađeni u trbušnoj šupljini 11 životinja (22,2%). Za molekularnu identifikaciju vrsta PCRom sam umnožila dio *cox1* gena. Usporedbom sa sljedovima pohranjenim u GenBank bazi podataka utvrdila sam da paraziti pronađeni u ovom istraživanju pripadaju vrsti *Setaria tundra*, te sam po prvi puta u Hrvatskoj dokazala prisutnost oblića *Setaria tundra*. Budući u literaturi ne postoje podatci o prisutnosti *Setaria labiatopapillosa* u srna i budući tadašnja literatura navodi da je teško morfološki razlikovati vrste *Setaria tundra* i *Setaria labiatopapillosa* smatram da je RICHTER (1959.) pogrešno identificirao prisutnost vrste *Setaria labiatopapillosa* u srna u Hrvatskoj.

Ključne riječi: *Setaria tundra*, *Setaria labiatopapillosa*, srna obična, *Capreolus capreolus*, *cox1*

ŽELJKA SABOL

Student, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

First identification of roundworms *Setaria tundra* in roe deer in Croatia by molecular method

SUMMARY

Genus *Setaria* includes 43 species of parasites that infest peritoneal cavity of ungulates. Vectors, mosquitoes (*Culicidae* spp.) and flies (*Haematobia* spp.), transmit the disease through blood infected with microfilariae. Adult parasites are mostly non-pathogenic and cause mild fibrinous peritonitis. From a veterinary point of view, it is important to monitor the occurrence of *Setaria tundra*, since in wild animals it can cause epidemic peritonitis with large economic losses. In Croatia the last published data about parasite from the genus *Setaria* date back to 1958, when *Setaria labiatopapillosa* was identified in roe deer, so the aim of this study was to determine which species of *Setaria* prevails in Croatia today. The study was conducted on 45 specimens of *Capreolus capreolus*, and the roundworms were found in the abdominal cavity of 11 animals (22.2%). For molecular identification I multiplied part of the *cox1* gene by PCR. Compared to the sequences stored in the GenBank database, I concluded that the parasites found in this research is identical to *Setaria tundra*. So for the first time in Croatia I confirmed the presence of the *Setaria tundra*. Since there are no data on the presence of *Setaria labiatopapillosa* in roe deer and former literature indicates difficulty to morphologically differentiate between *Setaria tundra* and *Setaria labiatopapillosa*, I consider that RICHTER (1959) misidentified the presence of *Setaria labiatopapillosa* in roe deer in Croatia.

Key words: *Setaria tundra*, *Setaria labiatopapillosa*, roe deer, *Capreolus capreolus*, *cox1*