

Sveučilište u Zagrebu

Veterinarski fakultet

MARINA ŠPEHAR i NIKOLINA TUŠKAN

USPOREDBA POUZDANOSTI MOLEKULARNIH I MORFOLOŠKIH METODA
IDENTIFIKACIJE CRIJEVNIH PARAZITA ČAGLJA

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.

Popis kratica

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

ITS – internal transcribed spacers

NCBI – National Center for Biotechnology Information

pb – parova baza

PCR – lančana reakcija polimerazom

Sadržaj

UVOD.....	1
OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI.....	2
MATERIJALI I METODE.....	3
REZULTATI	6
RASPRAVA	7
ZAKLJUČAK.....	9
ZAHVALE	9
POPIS LITERATURE.....	10
Sažetak.....	13
Summary	14

UVOD

Rutinska laboratorijska identifikacija vrsta parazita temelji se na analizi morfoloških obilježja pomoću mikroskopa, vrsti životinje koju parazit invadira, putevima prijenosa te patološkim učincima na domaćina (GASSER, 2006.). Međutim, svi ovi kriteriji često su nedovoljni za pouzdanu identifikaciju te se sve učestalije koriste metode iz područja molekularne biologije, osobito lančana reakcija polimerazom (PCR). Molekularne metode dijagnostike smatraju se visoko osjetljivima za otkrivanje parazitarnih oboljenja bez obzira na tip invazije i prikupljeni uzorak (TAVARES i sur., 2011.). Lančana reakcija polimerazom pronašla je svrhu u mnogim područjima znanosti upravo zbog činjenice da je potrebna izrazito mala količina genetskog materijala kako bi se provelo istraživanje. Navedeno je od velike važnosti i kod identifikacije parazita budući da je ponekad teško prikupiti dovoljnu količinu kvalitetnog materijala za klasičnu morfološku identifikaciju (GASSER, 2006.). Iako je korištenje mikroskopa i dalje zlatni standard u identifikaciji parazita, PCR bi mogao uskoro zamijeniti mikroskop u svakodnevnoj dijagnostici. Također, PCR sve češću primjenu pronalazi u kliničkoj dijagnostici, praćenju učinkovitosti terapije te epidemiološkim istraživanjima bez obzira na visoku cijenu kao donekle ograničavajući čimbenik (TAVARES i sur., 2011.).

Molekularna dijagnostika izuzetno je važna kod potvrde identifikacije parazita važnih za javno zdravstvo te kod istraživanja parazita koji šire svoju rasprostranjenost i prvi puta se javljaju na nekom području. Iz toga pogleda važno je pouzdano identificirati parazitofaunu čagalja (*Canis aureus*), budući da je čagalj nositelj nekoliko parazitarnih zoonoza, a vrsta u Hrvatskoj širi areal te je posljedično sve veća mogućnost kontakta s domaćim životinjama i ljudima.

Čagalj je sisavac iz reda zvijeri (*Carnivora*) te pripada natporodici psolikih zvijeri (*Caniformia*) i porodici pasa (*Canidae*). Do danas su opisane tri vrste - crnoleđi čagalj (*Canis mesomelas*), bočno-prugasti (*Canis adustus*) i (zlatni) čagalj (*Canis aureus*), koji je ujedno i jedina vrsta prisutna u Europi (JHALA i MOEHLMAN, 2004.). Čagalj je u Europu došao s Bliskog Istoka i širio se prema sjeverozapadu (KRYŠTUFEK i sur., 1997.) te ga danas nalazimo na jugoistoku Europe uz Sredozemnu obalu i tok Dunava sve do zemalja središnje Europe. Teritorijalne jedinice zabilježene su najzapadnije u Italiji (LAPINI i sur., 2009.) i najsjevernije u Austriji (ARNOLD i sur., 2012.)

Na području Hrvatske čagalj je odavno poznat na poluotoku Pelješcu, otoku Korčuli i Ravnim Kotarima gdje mu je i trenutna brojnost najveća (KRYŠTUFEK i TVRTKOVIĆ, 1990.; SELANEC i sur., 2011.) SELANEC i sur. (2011.) izradili su kartu rasprostranjenosti

čaglja u Hrvatskoj i potvrdili njihovu prisutnost na najmanje 30% teritorija, te pretpostavljaju da je brojnost čagljeva u Hrvatskoj u porastu. Danas najveću gustoća populacije čagljeva u Republici Hrvatskoj nalazimo na području Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske i Brodsko-posavske županije te u južnoj i središnjoj Dalmaciji (Dubrovačko-neretvanska, Šibensko-kninska i Zadarska županija) (SELANEC i sur., 2011.) Važno je naglasiti da se u Hrvatskoj čagalj nalazi na popisu divljači, uz ograničenje lova prema propisu o biološkom minimumu te uz preporuku zabrane odstrjela visoko bređih ženki i ženki dok vode i othranjuju mladunčad (ANONIMUS 2005a., 2005b., 2006.).

Čagalj je teritorijalna vrsta koja živi u čoporu, a veličina čopora ovisi o dostupnosti hrane. Svejed je i oportunist, hrani se uglavnom lešinama i ostacima hrane nađenim na odlagalištima otpada, ali isto tako jede i hranu biljnog porijekla (LANSZKI i sur., 2006.). Na sjeveroistoku Hrvatske, u Slavoniji, zabilježena je predacija, najčešće na glodavcima, beskralješnjacima i srednje velikim sisavcima (BOŠKOVIĆ i sur., 2010.) Iako aktivno lovi i veće sisavce kao što su divlje svinje (*Sus scrofa*), srne (*Capreolus capreolus*) i muflone (*Ovis aries*), uglavnom se radi o bolesnim, ozlijeđenim ili mladim jedinkama.

Dosadašnja istraživanja crijevnih parazita čaglja u Europi rađena su u Grčkoj (PAPADOPOULOS i sur., 1997.), Srbiji (LALOŠEVIĆ i sur., 2016.), Mađarskoj (SZELL i sur., 2013.) i Bugarskoj (BREYER i sur., 2004.), dok je BOSANČIĆ (2016.) istražio crijevne parazite 23 jedinke čaglja iz kontinentalne Hrvatske. No sva navedena istraživanja temeljena su na morfološkoj identifikaciji parazita, što je vrlo često nedostatno kako bi se pouzdano utvrdila vrsna pripadnost parazita.

OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI

Cilj našeg istraživanja bio je provjeriti pouzdanost morfološke identifikacije vrsta parazita pronađenih u probavnom sustavu čaglja te usporediti rezultate dobivene morfološkim i molekularnim analizama. Za učinkovitu dijagnozu, liječenje i kontrolu parazitskih oboljenja važno je precizno i brzo dijagnosticirati vrstu parazita. Stoga smatramo da je molekularna identifikacija parazita temeljena na umnažanju specifičnih dijelova DNK, u nekim slučajevima iznimno važna kao potvrda morfološke dijagnostike.

MATERIJALI I METODE

Istraživanje smo provele na crijevnim parazitima čaglja koje je prikupio i morfološki identificirao BOSANČIĆ (2016.). Materijal smo koristile uz dopuštenje autora i uz dopuštenje voditelja projekta Hrvatske zaklade za znanost "Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja", u sklopu kojeg je provedeno istraživanje.

BOSANČIĆ (2016.) je parazite prikupio pretragom crijeva 23 čaglja iz kontinentalne Hrvatske te je na Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu provedena identifikacija parazita na temelju morfoloških osobitosti (BOWMAN, 2014.). Koprološkom pretragom i pretragom crijeva utvrđena je prisutnost 11 različitih vrsta parazita (Tablica 1), te smo mi pristupili molekularnoj identifikaciji pet vrsta čiji su razvojni stadiji izdvojeni iz sadržaja crijeva (označeni sivom bojom u Tablici 1).

Tablica 1. Vrste i prevalencija parazita pronađenih koprološkom pretragom i pretragom crijeva 23 čaglja iz kontinentalne Hrvatske (BOSANČIĆ, 2016.). Vrste su identificirane morfološkim metodama, a sivom bojom su označene vrste čiji su razvojni stadiji izdvojeni iz sadržaja crijeva i analizirani molekularnim metodama u ovom istraživanju.

N(23)	Ukupno prevalencija
<i>U. stenocephala</i>	30,43%
<i>A. alata</i>	52,17%
<i>A. caninum</i>	4,34%
<i>E. granulosus</i>	4,34%
<i>Toxocara canis</i>	17,39%
<i>Toxasacaris leonina</i>	4,34%
<i>Capillaria aerophila</i>	13,04%
<i>Trichuris vulpis</i>	8,69%
<i>Crenosoma vulpis</i>	4,34%
<i>Taenia sp.</i>	17,39%
<i>Mesocestoides sp.</i>	8,69%
<i>Oociste</i>	8,69%
<i>Sarcocystis</i>	13,04%
<i>Dicrocoeliade</i>	17,39%

Od svake navedene vrste parazita DNK smo izolirali iz 5 do 10 jedinki, ovisno koliko je uzoraka bilo na raspolaganju iz istraživanja BOSANČIĆ (2016.). Za izolaciju DNK koristile

smo komercijalni kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega. Izolacija DNK rađena je prema protokolu proizvođača, a uspješnost izolacije provjerena je uređajem Nanodrop 2000.

Koristili smo vrsno specifične početnice navedene u Tablici 2, a za pripremu PCR smjese korišten je GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega. PCR reakcija provedena u smjesi količine 25 µL koja je sadržavala 5 µl DNK, 2 µl otopine početnica, 12,5 µl GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix, Promega i 5,5 µl H₂O. Reakcija se provodila koristeći uređaj Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems koristeći sljedeći protokol i temperatura vezanja početnica navedene u Tablici 2: početna denaturacija 95°C tijekom 2 min, zatim 35 ciklusa od 1 min na 94°C, 1 min za vezivanje početnica i 1 min na 72°C, završno produljivanje lanca odvijalo se 5 minuta na 72°C.

Tablica 2. Početnice i temperatura vezanja početnica korišteni tijekom PCR reakcije

Parazit	Početnica	Temperatura vezanja početnica	Literatura
<i>Alaria alata</i>	DME1 F (5'-CTTAGCTGCGGGTTCCTGCT- 3') DME1 R (5'-CGGCACATAAGCAAATACCTCG-3')	58°C	RIEHN i sur. (2011.)
<i>Toxocara canis</i>	Tcan1 (5'-AGTATGATGGGCGCGCCAAT- 3') NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')	58°C	JACOBS i sur. (1997.)
<i>Toxascaris leonina</i>	Tleo1(5'-CGAACGCTCATATAACGGCATACTC-3') NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')	58°C	JACOBS i sur. (1997.)
<i>Echinococcus granulosus</i>	rrnS-F (5'-GCAAAAGCTGATTAGGG- 3') rrnS-R (5'-TAACACACAAAACTC- 3') rrnL-F (5'-TTATTTGCCTTTTGATCA- 3') rrnL-R (5'-AAAAGATCCTAGGGTCTTTCCGT-3')	56°C (rrnS) / 58°C (rrnL)	BOUBAKER i sur. (2016.)
<i>Uncinaria stenocephala</i>	US ITS1 93 (5'-TTGAACCGGGTAAAAGTCG-3') US ITS1 264 (5'-CGTTTTTCATCGATACGCG-3') US ITS2 623 (5'-ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT-3') US ITS2 94 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT- 3')	54°C	NADLER i sur. (2000.)

Prisutnost PCR proizvoda provjeravale smo elektroforezom na 1,5%-tnom agaroznom gelu. PCR proizvode smo poslale na sekvenciranje u servis MacroGen Europe u Amsterdamu, Nizozemska. Rezultate sekvencioniranja (elektroferogram i nukleotidne slijedove) smo dobile u ab1 i PDF formatu.

GenBank, odnosno NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pretražile smo alatom Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), u potrazi za pohranjenim slijedovima.

REZULTATI

U istraživanje smo uključile pet vrsta parazita (*Alaria alata*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Echinococcus granulosus*, *Uncinaria stenocephala*) čiji su razvojni stadiji pronađeni u crijevu čagljeva u istraživanju BOSANČIĆ (2016.).

Molekularna identifikacija uzoraka metilja *Alaria alata* nije uspjela. DNK je uspješno izolirana, dobiven je PCR proizvod s vrsno specifičnim početnicama, no rezultati sekvenciranja nisu bili dovoljno kvalitetni i nismo mogle pouzdano potvrditi vrstu parazita.

Kod oblića vrste *Toxocara canis* i *Toxascaris leonina* molekularna identifikacija potvrdila je nalaz dobiven morfološkim metodama. Slijed ITS2 regije oblića *T. canis* sekvenciran u našem istraživanju, dug 250 parova baza (pb), identičan je sekvencama iz Genbank baze pohranjenim pod oznakama JN617989, JF837169, JF837170, FJ418788, KJ777156, KJ777155, LC133352, KP406763, AB110032, AB110034 i Y09489. Slijed ITS2 regije oblića *T. leonina* iz našeg istraživanja, duljine 184 pb, poklapa se sa slijedovima iz Genbanka oznaka Y09490 i JF837174.

BOSANČIĆ (2016.) je morfološkom metodom identificirao prisutnost oblića *Uncinaria stenocephala* s prevalencijom od 30,43%. Budući da pomoću vrsno specifičnih početnica koje umnažaju ITS1 i ITS2 regiju kod navedene vrste nismo dobili PCR proizvod, sumnjali smo u morfološku identifikaciju te smo isprobali početnice za najbliže srodne vrste - *Toxocara canis* i *Toxascaris leonina*. Dobili smo PCR proizvod pomoću vrsno specifičnih početnica za vrstu *Toxocara canis* te je sekvenciranje potvrdilo da parazit morfološki identificiran kao oblič *Uncinaria stenocephala* zapravo pripada vrsti *Toxocara canis*.

BOSANČIĆ (2016.) je morfološkom metodom identificirao prisutnost male pasje trakavice *Echinococcus granulosus* kod jedne jedinke (prevalencija 4,34%). Lančanom reakcijom polimerazom umnožili smo regije *rrnS* i *rrnL*, no PCR proizvod dovoljne kvalitete za daljnje analize smo dobile samo kod regije *rrnL*. Usporedbom sa sljedovima pohranjenim u GenBank bazi utvrdili smo da je zapravo riječ o trakavici vrste *E. multilocularis*, te je dobiveni slijed dužine 226 pb identičan slijedu oznake AB018440 (NAKAO i sur., 2002.).

RASPRAVA

Morfološka identifikacija parazita često je nepouzdana budući da su morfološke osobitosti srodnih vrsta vrlo slične. Primjerice, prilikom morfološke identifikacije parazita iz roda *Echinococcus* analiziraju se duljina odrasle jedinke (koja varira od 1.3 do 2.5 mm), broj proglotida (koji može biti između 3 i 5), duljina posljednjeg proglotida (koja iznosi od 0.5 do 1.1 mm), te duljina posljednjeg proglotida u odnosu na duljinu cijeloga tijela (26-44 %). Također, pregledava se položaj genitalnog otvora, koji može biti smješten anteriorno ili centralno. Posljednja karakteristika bitna za morfološku identifikaciju jest oblik uterusa, koji je pretežito vrećastog oblika (JONES i PYBUS, 2010.) Iz navedenog je vidljivo kako je zbog širokog raspona vrijednosti morfoloških parametara vrlo teško s potpunom sigurnošću odrediti vrsnu pripadnost parazita iz roda *Echinococcus* isključivo na temelju morfoloških obilježja, poglavito kada je riječ o graničnim vrijednostima. Stoga danas parazitološka istraživanja sve češće pribjegavaju umnažanju određenih dijelova DNK lančanom reakcijom polimerazom pomoću vrsno specifičnih početnica, kako bi pouzdano utvrdili vrstu parazita. Ovu metodu smo i mi upotrijebili kako bismo provjerili vjerodostojnost morfološke identifikacije crijevnih parazita čaglja iz istraživanja BOSANČIĆ (2016.).

Utvdili smo da su uzorci dvije vrste oblića pravilno identificirani (*T. canis*, *T. leonina*), te da su morfološkom metodom pogrešno identificirane vrste *Uncinaria stenocephala* i *Echinococcus granulosus*, dok kod vrste *Alaria alata* nismo uspjeli provesti molekularnu identifikaciju. Pretpostavljamo da je u ovom slučaju nedovoljna kvaliteta rezultata sekvenciranja posljedica degradacije DNK, što je osnovna prepreka pouzdanoj identifikaciji umnažanja odsječaka DNK pomoću lančane reakcije polimerazom.

Molekularna dijagnostika je pokazala da uzorak identificiran kao oblič *Uncinaria stenocephala* zapravo pripada vrsti *Toxocara canis*, dok uzorak morfološki identificiran kao mala pasja trakavica *Echinococcus granulosus* pripada vrsti *Echinococcus multilocularis*.

Dobiveni rezultati osobito su značajni sa stajališta javnog zdravstva, s obzirom da bolesti koje navedeni paraziti uzrokuju zahtijevaju različiti pristup u kontroli.

Oblič *Uncinaria stenocephala* je parazit koji kod ljudi uzrokuje kožnu larvu migrans, dok oblič *Toxocara canis* uzrokuje visceralnu i okularnu larvu migrans. Kod kožne larve migrans uzročnik kroz diskontinuirani epidermis prodire u kožu, najčešće na izloženim dijelovima tijela poput šaka i stopala. Nakon par dana na koži se razvija dermatitis s papulama, vezikulama i deskvamacijom. Liječenje često nije potrebno budući da larva sama nestaje kroz 1 - 6 mjeseci (KARTHIKEYAN i THAPPA, 2002.). Termin visceralna larva migrans definiran je kao migracija larvalnog stadija oblića, u konkretnom slučaju *Toxocara canis*, kroz unutarnje organe slučajnog domaćina - čovjeka (BEAVER, 1969.). Čovjek se invadira jajašcima parazita iz tla, što je čest slučaj kod djece, ili nedovoljno termički obrađenim mesom parateničnih nositelja. U crijevu čovjeka se iz jajašaca oslobađaju larve koje probijaju trbušnu stjenku i ulaze u portni krvotok te naposljetku dospijevaju u jetru. Larve ostaju u jetrima ili nastavljaju migraciju prema ostalim tkivima, primjerice plućima, oku, srcu ili mozgu. Iz navedenoga je jasno kako klinička slika može izuzetno varirati od blage do po život opasne bolesti, dok su neke od komplikacija koje se javljaju hepatomegalija, endoftalmitis, te neurološka oboljenja. Dijagnoza visceralne larve migrans postavlja se serološkim ispitivanjima, a liječenje se provodi albendazolom (CHANG i sur., 2006.).

Trakavica *Echinococcus granulosus* uzročnik je hidatidne bolesti u ljudi, dok je trakavica *Echinococcus multilocularis* uzročnik alveolarne ehinokokoze, jedne od najopasnijih zoonoza. Kod obje bolesti ciste sporo rastu, najčešće su lokalizirane u jetrima, no javlja se i u ostalim parenhimskim organima. Hidatidna cista, ovisno o trajanju procesa, može biti unilokularna, multilokularna, mjestimično ili u potpunosti kalcificirana, te proces kalcifikacije naposljetku uzrokuje smrt uzročnika. Lokacija i veličina ciste uvjetuju kliničku sliku te bolest često može proći neprimjetno sve do ruptуре ciste (MORO i SCHSNTZ, 2009.). Hidatidoza se liječi kirurški ili kemoterapijom (PEDROSA i sur., 2000.; MORO i SCHSNTZ, 2009.). Dok je hidatidna cista ograničena, alveolarna cista penetrira tkivo invadiranog organa poput tumora i u svakom slučaju koji se ne liječi (kirurški ili kemoterapijom) je smrtonosna. Bitno je naglasiti da je prisutnost trakavice *E. multilocularis* po prvi puta potvrđena u Hrvatskoj tek nedavno i to u lisica (BECK i sur., 2016.), stoga je naš nalaz prva potvrda ovog parazita kod čagljeva u Hrvatskoj.

ZAKLJUČAK

Identifikacija parazita na temelju morfoloških obilježja je uobičajeni tradicionalni način dijagnostike, no ovim istraživanjem smo dokazali moguće pogreške prilikom identifikacije srodnih vrsta. Stoga u slučajevima važnim za javno zdravstvo ili kod moguće pojave novih vrsta preporučujemo provjeru pouzdanosti rezultata upotrebom molekularnih metoda.

Važan rezultat ovog istraživanja je i prvi dokaz vrste *Echinococcus multilocularis*, uzročnika smrtonosne alveolarne ehinokokoze ljudi, u čagljeva u Hrvatskoj.

ZAHVALE

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Deanu Konjeviću na ustupljenim uzorcima koji su nam omogućili izradu ovog studentskog rada, te financijskoj potpori kroz projekt „Molekularna epidemiologija odabranih parazitskih bolesti divljih životinja“ Hrvatske zaklade za znanost. Zahvaljujemo asistentu na projektu Miljenku Bujaniću, dr. med. vet. te višem asistentu dr. sc. Franji Martinkoviću na podršci. Posebna zahvala doc. dr. sc. Magdi Sindičić na stručnoj i tehničkoj pomoći u izradi rada, te ogromnom strpljenju i volji.

POPIS LITERATURE

- ANONIMUS (2005a): Zakon o lovstvu. Narodne novine broj 140/05.
- ANONIMUS (2005b): Pravilnik o lovostaji. Narodne novine broj 155/05.
- ANONIMUS (2006): Pravilnik o sadržaju, načinu izrade i postupku donošenja, odnosno odobravanja lovnogospodarske osnove, programa uzgoja divljači i programa zaštite divljači. Narodne novine broj 40/06.
- ARNOLD, J., A. HUMER, M. HELTAI, D.MURARIU, N. SPASSOV, K.
HACKLANDER (2012): Current status and distribution of golden jackal *Canis aureus* in Europe. *Mammal. Rev.* 42, 1-11.
- BEAVER, P. (1969): The Nature of Visceral Larva Migrans. *J. Parasitol.* 55, 3-12.
- BECK, R., Ž. MIHALJEVIĆ, R. BREZAK, S. BOSNIĆ, I. LOHMAN JANKOVIĆ, P.
DEPLAZES (2016): Prvi nalaz trakavice *Echinococcus multilocularis* u Republici Hrvatskoj. 6. Hrvatski veterinarski kongres s međunarodnim djelovanjem, 26-29 listopada, Opatija, , pp 305 – 309.
- BOSANČIĆ, A. (2016): Poredbeni prikaz parazita probavnog sustava čaglja s različitih staništa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu . Zagreb, Hrvatska.
- BOŠKOVIĆ, I., T. FLORIJAČIĆ, K. PINTUR, B. RELJA, D. JELKIĆ (2010):
Hranidba čaglja (*Canis aureus*) u istočnoj Hrvatskoj. Proceeding of 45th Croatian & 5th International Symposium of Agriculture, Fisheries, Game Management and Beekeeping, 15-19 veljače, Opatija, pp. 968-972.
- BOWMAN, D. (2014): *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 10. izdanje. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- BREYER, I., D. GEORGIEVA, R. KURDOVA, B. GOTTSTEIN (2004): *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol. Res.* 93, 127–130.
- CHANG, S., J. H. LIM, D. CHOI, C. K. PARK, N. H. KWON, S. Y. CHO, D. C. CHOI (2006): Hepatic Visceral Larva Migrans of *Toxocara canis*: CT and Sonographic Findings. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 187, 622-629. DOI: 10.2214/AJR.05.1416
- GASSER, R. B.(2006): Molecular tools - advances, opportunities and prospects. *Vet. Parasitol.* 136, 69-89.

- JACOBS, D. E., X. ZHU, R. B. GASSER, N. B. CHILTON (1997): PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica*. 6, 191–200.
- JHALA, Y.V., P. D. MOEHLMAN (2004): Golden Jackal *Canis aureus* Linnaeus, Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan, p. 156-161.
- JONES, A., M. J.PYBUS, (2010): Taeniasis and echinococcosis. U: Parasitic Diseases of Wild Mammals. (Samuel, W.M., M. J Pybus,., A.A.Kocan, Eds.), Manson Publishing Ltd., London, pp. 150–192.
- KARTHIKEYAN, K., D. M. THFAPPA (2002): Cutaneous larva migrans, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*, 68, 252-258.
- KRYŠTUFEK, B., N. TVRTKOVIĆ (1990): Range expansion by dalmatian jackal population in the 20th century (*Canis aureus* Linnaeus, 1758). *Folia zool.* 39, 291-296.
- KRYŠTUFEK, B., D. MURARIU, C. KURTONUR (1997): Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regiond. *Mammal Rev.* 27(2), 109-114.
- LALOŠEVIĆ, D., V. LALOŠEVIĆ, V.SIMIN, M. MILJEVIĆ, B. ČABRILO, O.BJELIĆ ČABRILO (2016.): Spreading of multilocular echinococcosis in southern Europe: the first record in foxes and jackals in Serbia, Vojvodina Province. *Eur. J.Wildl. Res.* 62, 793-796.
- LANSZKI, J., M. HELTAI, L.SABO (2006): Feeding habits and trophic niche overlap between sympatric golden jackal (*Canis aureus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian ecoregion (Hungary). *Can. J. Zool.* 84, 1647-1656
- LAPINI, L., P. MOLINARI, L. DORIGO, G. ARE, P. BERALDO (2009.): Reproduction of the golden jackal (*Canis aureus moreoticus* I. Geoffroy Saint Hilaire, (1835): in Julian Pre-Alps, with new data on its range-expansion in the high-adriatic hinterland (Mammalia, Carnivaora, Canidae). *Boll. Mus. Civico Storia Nat. Venezia.* 60, 169-186.
- MORO, P., M. SCHANTZ (2009) :Echinococcosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.* 13, 125—133.
- NADLER, S. A., B. J. ADAMS, E. T. LYONS, R. L. DELONG, S. R. MELIN (2000): Molecular and morphometric evidence for separate species of *Uncinaria*

- (Nematoda: Ancylostomatidae) in California sea lions and northern fur seals: Hypothesis testing supplants verification. *J. Parasitol.* 86, 1099–1106.
- NAKAO, M., N. YOKOYAMA, Y. SAKO, M. FUKUNAGA, A. ITO (2002): The complete mitochondrial DNA sequence of the cestode *Echinococcus multilocularis* (Cyclophyllidea: Taeniidae). *Mitochondrion.* 1, 497-509.
- PAPADOPOULOS, H., C. HIMONAS, M. PAPAZHARIADOU, K. ANTONIADOU-SOTIRIADOU (1997): Helminths of foxes and other wild carnivores from rural areas in Greece. *J. Helminthol.* 71, 227-232.
- PEDROSA, I., A. SAIZ, J. ARRAZOLA, J. FERREIROS, C.S. PEDROSA (2000): Hydatid disease: radiologic and pathologic features and complications. *Radiographics.* 20, 795-817.
- SELANEC, I., B. LAUŠ, M. SINDIČIĆ (2011): Golden jackal (*Canis aureus*) distribution in Croatia. Abstract Book European mammology Congress. pp 60.
- SZÉLL, Z., G. MARUCCI, E. POZIO, T. SRÉTER (2013): *Echinococcus multilocularis* and *Trichinella spiralis* in golden jackals (*Canis aureus*) of Hungary. *Vet. Parasitol.* 197, 393-396.
- TAVARES, R. G., R. STAGGEMEIER, A. L. P. BORGES, M. T. RODRIGUES, L. A. CASTELAN, J. VASCONCELOS, M. E. ANSCHAU, S. M. SPALDING (2011): Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 17, 239-248.

**Usporedba pouzdanosti molekularnih i morfoloških metoda identifikacije
crijevnih parazita čaglja**

Sažetak

Identifikacija parazita na temelju morfoloških obilježja i dalje se smatra zlatnim standardom u klasičnoj kliničkoj dijagnostici. Međutim, moguće su pogreške u identifikaciji zbog male količine dostupnog uzorka, uzorka koji ne obuhvaća parazita u svim životnim stadijima te činjenice da su određeni paraziti morfološki vrlo slični. Stoga je cilj našega rada bio molekularnim metodama provjeriti pouzdanost morfološke identifikacije crijevnih parazita prikupljenih iz 23 jedinke čaglja (*Canis aureus*) iz Hrvatske. Utvrdili smo da su uzorci dvije vrste oblića pravilno identificirani (*Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*), dok kod vrste *Alaria alata* nismo uspjeli provesti molekularnu identifikaciju. Molekularna dijagnostika je pokazala da uzorak morfološki identificiran kao oblič *Uncinaria stenocephala* zapravo pripada vrsti *Toxocara canis*, dok uzorak morfološki identificiran kao mala pasja trakavica *Echinococcus granulosus* pripada vrsti *Echinococcus multilocularis*. Dobiveni rezultati osobito su značajni sa stajališta javnog zdravstva, s obzirom da bolesti koje navedeni paraziti uzrokuju zahtijevaju različiti pristup u kontroli. Stoga u slučajevima važnim za javno zdravstvo ili kod moguće pojave novih vrsta preporučujemo provjeru pouzdanosti rezultata upotrebom molekularnih metoda. Važan rezultat ovog istraživanja je i prvi dokaz vrste *Echinococcus multilocularis*, uzročnika smrtonosne alveolarne ehinokokoze ljudi, u čagljeva u Hrvatskoj.

Ključne riječi: čagalj, *Canis aureus*, *Toxocara canis*, *Echinococcus multilocularis*

Reliability comparison of morphological and molecular methods used for identification of intestinal parasites in jackal

Summary

Identification of parasites based on their morphology is still considered as the gold standard in classic clinical diagnosis. However, there is a possibility for misidentification because of low quality and quantity of sample, sample which does not include all life stages of parasite or the fact that certain parasites are very similar in their morphological characteristics. So the goal of our research was to test the reliability of morphological identification of intestinal parasites found in 23 jackals (*Canis aureus*) from Croatia. We confirmed that *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* samples were identified correctly, while quality of results of our molecular identification were not good enough to confirm the identification of *Alaria alata*. Molecular method showed that the nematode morphologically identified as *Uncinaria stenocephala* actually is *Toxocara canis*, while *Echinococcus multilocularis* was wrongly identified as *Echinococcus granulosus*. Considering the differences in pathogenesis and treatment of the diseases caused by these parasites, our results are very important for public health. So we recommend to confirm morphological identification with molecular methods when diagnosing important parasitic zoonosis and describing new species. Our results are also significant because this is the first identification of *Echinococcus multilocularis* in jackals on Croatian territory.

Keywords: jackal, *Canis aureus*, *Toxocara canis*, *Echinococcus multilocularis*