

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Pöistang-paelussi (*Echinococcus granulosus sensu stricto*) globaalne geneetiline
mitmekesisus ja fülogeograafia**

Magistritöö
Biomeditsiin (30 EAP)
Käbi-Riin Ojassoo

Juhendajad:
PhD Urmas Saarma (TÜ Ökoloogia ja maateaduste instituut)
PhD Elin Org (TÜ Genoomika instituut)

TARTU 2021

INFOLEHT

Põistang-paelussi (*Echinococcus granulosus sensu stricto*) globaalne geneetiline mitmekesisus ja fülogeograafia

Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.) ehk põistang-paeluss on väike parasiit, kes põhjustab zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehhinokokoos. Parasiidi levik on globaalne ja ta on ohtlik nii loomadele kui ka inimestele. ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon on maailmas toiduga levivate haiguste seas kategoriseerinud põistangpaelussi tähtsusele teisele kohale, mis näitab, kui suure rahvatervise probleemiga tegemist on.

Antud töö eesmärgiks on kaardistada Pakistanist, Indiast ja Ukrainast saadud proovide genotüübid ja analüüsida nende geneetilist mitmekesisust mtDNA järjestuste põhjal. Samuti kaasates teiste poolt varem analüüsitud homoloogilisi mtDNA järjestusi, selgitada välja analüüsitud Pakistan, India ja Ukraina proovide evolutsioonilised seosed nendega ning globaalse fülogeograafia eripärad, sh. peamised migratsiooni suunad.

Töös analüüsiti Pakistanist, Indiast ja Ukrainast pärinevaid proove. Kokku sekveneeriti 86 uut mtDNA järjestust pea kogu mitogenoomi ulatuses (11549 aluspaari). Andmeanalüüsiks täiendati valimit 335 eelnevalt sekveneeritud ja eri maailma piirkondadest pärit *E. granulosus* s.s. homoloogilise mtDNA järjestuse võrra, neist 280 kuulusid genotüüpi G1 ja 55 genotüüpi G3. Täiendatud andmekoguga teostati fülogeneetiline ja fülogeograafiline analüüs.

Analüüsides tulemused näitasid, et nii G1 kui ka G3 genotüüpide geneetiline mitmekesisus on väga kõrge. Samas G1 on fülogeograafiliselt nõrgalt struktureeritud, st. samast regioonist pärit proovid olid sageli geneetiliselt üksteisest kauged. Eeldatavaks põhjuseks on rahvusvaheline loomakaubandus. Seevastu G3 on fülogeograafiliselt hästi struktureeritud ja geograafiliselt lähedased isolaadid olid enamasti ka geneetiliselt lähedased. Seega kui G1 on loomakaubanduse tõttu geograafiliselt segunenud, siis G3 fülogeograafiline jaotus on pigem loodusliku leviku tulemus.

Märksõnad: *Echinococcus granulosus*, ehhinokokoos, fülogenees, fülogeograafia

CERCS: B240 (Inimeste ja loomade) parasitoloogia

Genetic diversity and phylogenetic relations of *Echinococcus granulosus sensu stricto*

Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.) is a little parasitic worm that causes a zoonoses called cystic echinococcosis. The parasite has a global distribution, and it is harmful to both animals and humans. Even the Food and Agriculture Organization of the United Nations has categorized the *E. granulosus* parasite as the second most important food-borne parasite in the world, which asserts the severeness of echinococcosis as a matter of national healthcare.

The aim of this master's thesis is to map out genotypes and analyse, on the basis of mtDNA sequences, the genetic diversity of samples from Pakistan, India, and Ukraine. Furthermore, this thesis aims to compile a database that includes the samples from Pakistan, India, and Ukraine combined with previously analysed homological mtDNA sequences, and clarify, based on that database, the evolutionary connections of the analysed Pakistani, Indian and Ukrainian samples in comparison to the previous samples. The author attempts to elucidate global phylogeographical peculiarities with emphasis on migration directions.

Regarding this master's thesis, the author analysed parasitic samples from Pakistan, India, and Ukraine. Altogether, 86 new mtDNA sequences (11549 bp) were sequenced, and compiled into a database. 335 previously sequenced samples were added to this database, of which 280 samples contained the genotype G1, and 55 samples the genotype G3. Phylogenetic and phylogeographic studies were conducted for the group of 86 samples together with the 335 previous samples.

The phylogenetic analysis yielded that the genetic diversity of the G1 and G3 genotypes is high. The phylogeographical analysis showed that the genotype G1 is frailly structured, which means that samples from the same region were often genetically distant from each other. This phenomenon can be explained with international animal trade. On the other hand, G3 is phylogeographically well structured and geographically close isolates tended to also be genetically close. Thus, we can conclude that while geographically G1 is primarily distributed via animal trade, the phylogeography of G3 is likely to be a result of a natural spread.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, echinococcosis, phylogenetics, phylogeography

CERCS: B240 Parasitology (human and animal)

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	4
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Perekond <i>Echinococcus</i>	8
1.2. <i>Echinococcus granulosus</i>	9
1.3. Põistang-paelussi <i>E. granulosus</i> elutsükkel.....	9
1.4. Ehhinokokoos	11
1.5. Perekond <i>Echinococcus</i> liigid ja genotüübid.....	13
1.6. Põistang-paelussi geneetiline mitmekesisus	15
2. ESPERIMENTAALOSA.....	17
2.1. Töö eesmärk.....	17
2.2. Materjal ja meetodika	17
2.2.1. Valim ja töö ülesehitus.....	17
2.2.2. DNA eraldamine	18
2.2.3. Praimerid.....	18
2.2.4. PCR.....	20
2.2.5. Sanger sekveneerimine	21
2.2.6. Konsensusjärjestuste kokkupanek programmiga CodonCode Aligner.....	22
2.2.7. Bayesi fülogeneetiline ja fülogeograafiline analüüs programmiga BEAST.....	22
2.2.8. Fülogeneetiline analüüs programmiga Network.....	24
2.3. Tulemused.....	25
2.3.1. Pakistani, India ja Ukraina proovide genotüübid.....	25
2.3.2. Fülogenees laiendatud andmekogumi põhjal.....	27
2.3.3. Genotüübi G1 fülogenees	28
2.3.4. Genotüübi G3 fülogenees	32
2.3.5. Genotüübi G1 fülogeograafia	34
2.3.6. Genotüübi G3 fülogeograafia	35
2.4. Arutelu	37
KOKKUVÕTE	40
SUMMARY	42
KASUTATUD ALLIKAD	44
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	49
LISA 1.....	50
LISA 2.....	52
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.....	62

KASUTATUD LÜHENDID

AE – alveolaarne ehinokokoos

ddNTP – didesoksüribonukleosiidtrifosfaat

dNTP – desoksüribonukleotiidtrifosfaat

FAO – ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon

GTR mudel – *general time-reversible nucleotide-substitution model*

GTR +I +G – *GTR model with invariable sites and gamma distributed rate variation*

MCMC – Markov Chain Monte Carlo meetod

mtDNA – mitokondriaalne DNA

PAIR – punkture-aspiration-injection-reaspiration

s.l. – sensu lato

s.s. – *sensu stricto*

spp – kaks või enam liiki sellest perekonnast

TE – tsüstiline ehinokokoos

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon

SISSEJUHATUS

Põistang-paeluss *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.) kuulub lameusside (Platyhelminthes) hõimkonda, tsestoodide (Cestoda) klassi, neljanapaliste (Cyclophyllidea) seltsi, sugukonda Taeniidae ja perekonda *Echinococcus* (Thompson, 2017). Põistang-paeluss on väga mitmekesine takson, mis sisaldab mitmeid erinevaid liike ja genotüüpe. Siiaamaani ei ole veel kõik liigid taksonoomiliselt täpselt määratletud.

Perekonda *Echinococcus* kuuluvad paelussid on väikesed ja nende elutsükkel baseerub kiskja-saaklooma suhtel. Põistang-paelussi vastsed arenevad vaheperemehe ja täiskasvanud paeluss elab lõpp-peremehe peensooles. Vastsete arenemise käigus moodustuvad tsüstid, mis on nakatunu jaoks ohtlikud. Vaheperemeesteks on enamasti sõralised, kuid ka inimesed (Eckert ja Thompson, 2017). Põistang-paelussi nakkusest saadud haigust kutsutakse tsüstiliseks ehhinokokoosiks. Põistang-paeluss on tähtsuselt teine toiduga leviv haiguse tekitaja maailmas. Tegemist on tähtsa rahvatervise probleemiga, mis võib ravimata kujul olla eluohtlik (FAO/WHO, 2014; WHO, 2015).

Erinevatel põistang-paelussi genotüüpide (tüvedel) on erinev nakatumisvõime ning ka erinevad levikumustrid. Seetõttu on oluline erinevaid genotüüpe täpselt diagnoosida ja uurida (Kinkar et al., 2018a). Need teadmised võimaldavad nii meditsiini- kui veterinaarvaldkonnas võtta vastu paremaid otsuseid, et tõkestada ehhinokokoosi levikut ning parandada inimeste ja loomade tervist (Laurimäe et al., 2018a).

Eelnevalt on leitud, et G1 ja G3 genotüüpe saab käsitleda kui ühte liiki, milleks on *E. granulosus s.s.* ja tuvastati, et G1 ja G3 on selgesti eristatavad genotüübid (Kinkar et al., 2017). Samuti on leitud, et genotüüpide G1 ja G3 geneetiline mitmekesisus on kõrge (Kinkar et al., 2018c). Genotüübi G1 levimus on globaalne ja levik on toimunud suuresti tänu loomakaubandusele (Kinkar et al., 2018a). Samuti on mõtiskletud *E. granulosus* levimise algupärast ja on jõutud tulemuseni, et G1 laiem levik võis alguse saada Vahemereäärsetest piirkondadest ning G3 pigem Lähis-Ida ja India kandist (Kinkar et al., 2018c).

Antud töös uuritakse *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) parasiite, kuhu kuuluvad genotüübid G1 ja G3. Uuritakse just *E. granulosus s.s.* parasiite, sest inimestel esineb kõige enam infektsioone, mis on nende poolt põhjustatud. Töö eesmärgiks oli kaardistada Indiast,

Ukrainast ja Pakistanist saadud proovide genotüübid ja analüüsida nende geneetilist mitmekesisust mtDNA järjestuse põhjal. Sellele lisaks analüüsida proovide evolutsioonilisi seoseid ja fülogeograafilisi eripärasid, mille jaoks kaasati uuringusse varem analüüsitud homoloogilised mtDNA järjestused.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Perekond *Echinococcus*

Zooloogias hakati nime *Echinococcus* kasutama aastal 1801 Carl Asmund Rudolphi poolt. Põistang-paeluss *Echinococcus granulosus s.l.* kuulub lameusside (Platyhelminthes) hõimkonda, tsestoodide (Cestoda) klassi, neljanapaliste (Cyclophyllidea) seltsi, sugukonda Taeniidae ja perekonda *Echinococcus* (Thompson, 2017). Ehhinokokid kuuluvad monofüleetilisse gruppi, mis tähendab, et grupis on viimane ühine eellane ja kõik tema järeltulijad (Nakao et al., 2013). Algselt kirjeldati lausa 16 erinevat ehhinokokkide liiki, kuid hiljem tunnustati nendest vaid nelja liiki: põistang-paeluss *E. granulosus sensu lato* (edaspidi *E. granulosus*), alveokokk *E. multilocularis*, *E. oligarthra* ja *E. vogeli* (Eckert ja Thompson, 2017). Liigid ei ole veel lõplikult määratletud, kuid praeguseks ajaks on lisandunud *E. felidis*, *E. shiquicus*, *E. equinus* ja *E. ortleppi*. Osade liikide staatus on veel selgitamisel (*E. canadensis*, *E. intermedius*) (Laurimäe et al., 2018a).

Perekond *Echinococcus* paelussid on väikesed ning nende elutsükli jaoks on vajalik kiskja-saaklooma suhe. Lõpp-peremeesteks on peamiselt koerlased ja kaslased, kelle peensooles täiskasvanud paeluss elab ning vaheperemeesteks valdavalt sõralised ja närilised. Vaheperemeestes arenevad paelussi vastsed ja moodustavad tsüste. Inimesed ja ka ahvid võivad nakatuda paelussiga ning olla vaheperemeheks, kuid tegemist on sellisel juhul tupikperemehega (Eckert ja Thompson, 2017). Inimeste nakatumine on seotud koertega, sest inimesed on koertega läbi aegade väga lähestikku elanud. On näidatud, et nakkusi esineb rohkem pigem maapiirkondades kui linnades (Kinkar et al., 2017). Enim esineb nakatumist piirkondades, kus toimub toidu saamise eesmärgil kodus illegaalne loomade tapmine. Selle tegevuse tõttu on rupskid koertele söögiks kättesaadavad ja toimub ka nakatumine. Samuti mõjutavad nakatumist veel ühiskonna teadlikkuse puudumine ehhinokokoosi suhtes, hulkuvate koerte populatsioonid ning madal hügieeni tase (Kinkar et al., 2018a). Sellele lisaks võivad ka nakatumise allikaks olla näiteks parasiidi munadega kontamineerunud metsamarjad, seemed ja taimed (Menghi et al., 2017), kuid ka muld, vesi ning köögiviljad (Chaâbane-Banaoues et al., 2015). Munad on väga vastupidavad ja nad võivad isegi kuni aasta säilida nakatusohtlikud, kui keskkonna tingimused on soodsad. Soodsateks säilimistingimusteks on madalad temperatuurid ning niiske keskkond. Munad on väga tundlikud kuivale ja kõrgetele temperatuuridele. Samas suudavad nad taluda madalaid temperatuure, isegi kuni -50°C juures suudavad nad elada 24

tundi (Eckert ja Deplazes, 2004). Inimesel põhjustavad põhiliselt kaks taksonit ehhinokokoosi ja nendeks on *E. granulosus* ning *E. multilocularis*. *Echinococcus granulosus* põhjustab tsüstilist ehhinokokoosi ja *E. multilocularis* alveolaarset ehhinokokoosi. Arvatakse, et esimesed juhtumid paelussi nakkusest avastati juba antiik ajal umbes 460-377 eKr, mida on kirjeldanud ka Hippocrates enda aforismides (Eckert ja Thompson, 2017).

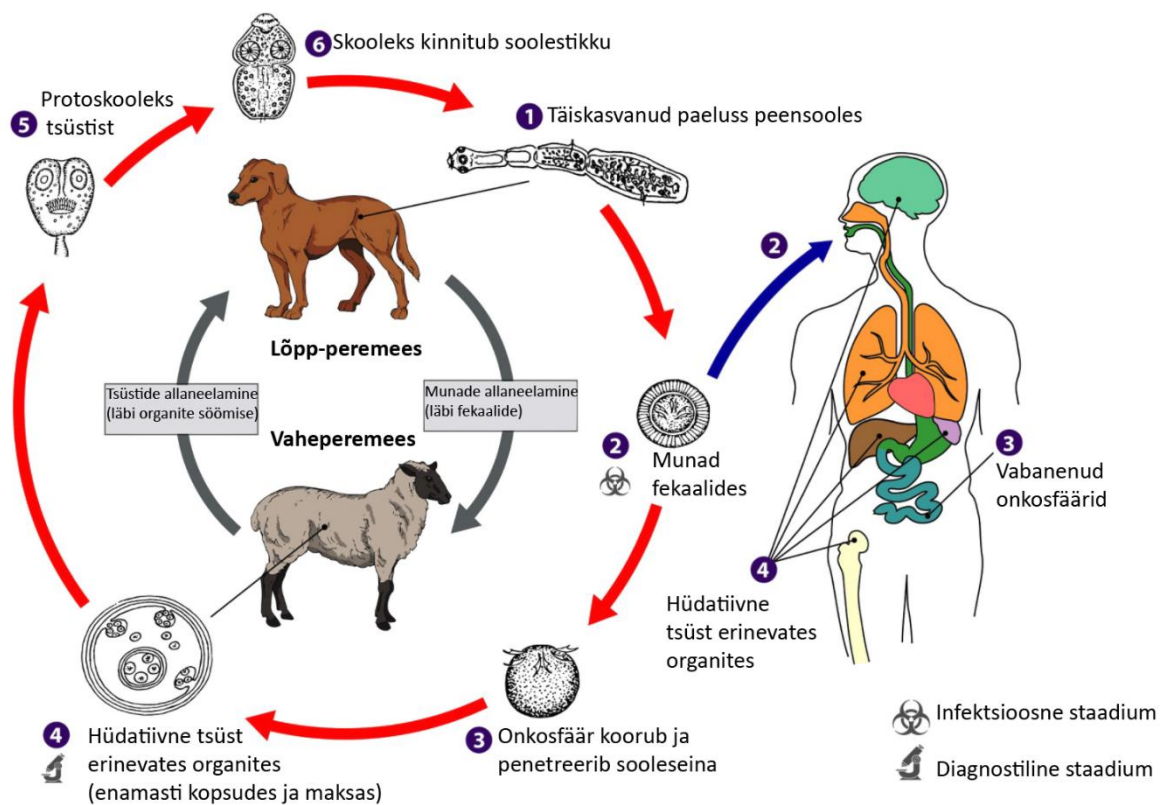
1.2. *Echinococcus granulosus*

Põistang-paeluss on kõige mitmekesisem takson, kus on kirjeldatud 10 eri genotüüpi (G1-G10), milledest hetkeseisuga on G2 ja G9 tunnistatud mittekehtivateks. On näidatud, et G2 ei moodusta eraldi monofüleetilist rühma ja kuulub G3 alla (Kinkar et al., 2017) ning G9 kuulub G7 alla (Kedra et al., 1999). Kaheksast kehtivast genotüübist on moodustatud viis liiki: G1 ja G3 on *E. granulosus s.s.*, G4 *E. equinus*, G5 *E. ortleppi*, G6 ja G7 *E. intermedius* ning G8 ja G10 *E. canadensis*. Nime *E. intermedius* sobivus on hetkel küsimuse all (Laurimäe et al., 2018). Lisaks kuulub *E. granulosus sensu lato* liigikompleksi veel *E. felidis* – seega kokku on seal kuus liiki. Liigid erinevad nii lõpp- ja vaheperemehe eelistuste põhjal (Thompson, 2017), aga ka morfoloogia, inimeste nakatamise, patogeensuse, antigeensuse ja arenemiskiiruse osas (Eckert ja Thompson, 2017; Kinkar et al., 2017).

1.3. Põistang-paelussi *E. granulosus* elutsükkel

Täiskasvanud paeluss *Echinococcus granulosus* on 3-6 mm pikk ning elab lõpp-peremehe peensooles, milleks on enamasti koer või koerlane (1) (Joonis 1; edaspidi on tekstis kõik 6 etappi toodud sulgudes). Peensooles elavast graviidsest proglotiidist ehk paelussilulist vabanevad munad, mis levivad keskkonda fekaalidega (2). Vaheperemees, kelleks on tihti lammas, kits, veis, hobune või kaamel, seedib munad ära ning peensooles need kooruvad. Munadest vabanevad onkosfäärid ehk kerakujulised esimese kasvujärgu vastsed. Vastsed on võimelised tungima läbi sooleseina (3) ja kasutades veresoonkonna tsirkulatsiooni, on nad võimelised erinevatesse organitesse migreeruma. Peamiselt toimub migreerumine kopsudesse ja maksa, kuid ka teised organid võivad olla sihtmärgiks. Organites areneb onkosfäär järk-

järgult kasvavaks tsüstiks, mis toodab omakorda protoskoolekseid ja tütar-tsüste (4). Protoskooleksid on vastsed, kellel on pea, konksud ja iminapad (Galindo et al., 2002). Lõpp-peremees nakatub süües haigestunud vaheperemehe organeid, milles leidub fertiilseid tsüste. Peale organite seedimist evagineeruvad protoskooleksid ehk keeravad end pahupidi nii, et sisemine osa muutub välimiseks (5) ning seejärel nad kinnituvad soolelimaskestale külge (6). Seal arenevad nad 32 kuni 80 päeva jooksul täiskasvanud paelussiks ning elutsükkel on täis. Inimesed nakatuvad nii öelda „kogemata“, kus enesele teadmata süüakse ja seeditakse munasid (2). Seejärel vabaneb onkosfäär samamoodi inimese seedekulglast (Joonis 1; inimese nr. 3) ja tagajärjena moodustuvad tsüstid erinevatesse organitesse (Joonis 1; inimese nr. 4) (Moro ja Schantz, 2009).



Joonis 1. Põistang-paelussi *Echinococcus granulosus* elutsükkel (kohandatud <https://www.cdc.gov/> järgi, 2019)

1.4. Ehhinokokoos

Ehhinokokoos on zoonoos ehk inimesi nakatav loomade nakkushaigus. ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon (FAO) kategoriseerib põistang-paelussi tähtsuselt teiseks ja alveokoki kolmandaks toiduga leviva haiguse tekitajaks maailmas ning WHO sõnul on tegemist tähtsa rahvatervise probleemiga, mis on diagnoosimata ja ravimata olukorras eluohtlik (FAO/WHO, 2014; WHO, 2015). Eristatakse põhiliselt alveolaarset ehhinokokoosi (AE) ja tsüstilist ehhinokokoosi (TE) (Eckert ja Thompson, 2017). Tsüstiline ehhinokokoos on kergem haigus kui alveolaarne ehhinokokoos (Menghi et al., 2017). AE-l on kõrge letaalsus, täpsemalt on leitud, et ravimata patsientidest sureb 10 aasta jooksul sümptomite esinemisest 90% ja 15 aasta jooksul 100% (Ammann ja Eckert, 1996). TE on palju väiksema letaalsusega, vaid 2-4% ravimata või valesti ravitud patsientidest sureb. Vale ravi puhul võib aga TE suremus palju suurem olla (Brunetti et al., 2010).

Tsüstilise ehhinokokoosi puhul esinevad tsüstid kõige sagedamini maksas, teisena kopsudes ning seejärel põrnas. Samuti on leitud tsüste neerudes, ajus, luudes, südames, silmades, pankreases, kilpnäärmes, neerupealistel ja süljenäärmetes, kuid nendes väga vähesel määral. Tsüsti diagnoosimine on enamasti hiline, sest suure osa ajast on haigus asümptomaatiline. Sümptomid esinevad üldjuhul alles siis, kui tsüst on piisavalt suureks kasvanud, et avaldada naaberkudedele ja naaberorganitele survet (Menghi et al., 2017). Maksatsüst kasvab reeglina 1-5 mm aastas (Nunnari et al., 2012) ning mõned sümptomid, mis võivad surve põhjusel tekkida on kollatõbi, maksatsirroos ja portaalhüpertensioon. Kõige ohtlikumaks komplikatsiooniks peetakse, kui tsüst lõhkeb veresoonde, mis võib põhjustada anafülaktilist šokki ja surma (Menghi et al., 2017).

TE puhul on põhiliselt neli ravivõimalust, milleks on kirurgiline, PAIR ravi, farmakoloogiline ravi ning “vaatame ja ootame” meetod. Eelistatud on kirurgiline ravi (https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/health_professionals/index.html#tx) ning valikus on radikaalne või konservatiivne operatsioon. Radikaalne on eelistatud, sest selle edukus on parem (Tagliacozzo et al., 2011). Kui operatsiooniks esineb vastunäidustusi, siis valitakse mõni teine raviskeem. PAIR tähendab punktuur-aspiratsioon-injektsioon-reaspiratsioon protseduuri. Selle käigus aspireeritakse tsüsti, millesse on väikese nõelaga eelnevalt tehtud torkeauk. Seejärel sisestatakse sobiv lahus, milleks on hüpertooniline 20% NaCl lahus või 95% etanool. Oodatakse üldjuhul 15 kuni 20 minutit ja tehakse reaspiratsioon.

PAIR meetodi puhul on ohuks anafülaksia, mistõttu see ei ole esmavaliku protseduur ja protseduuri võib läbi viia vaid kuni 6 cm diameetriga tsüsti puhul (McManus et al., 2012). Farmakoloogiline ravi kujutab endast üldjuhul albendasool ravimi kasutamist. Seda kasutatakse enamasti kui operatsioon on vastu näidustatud. Samuti kasutatakse ravimit ka 30 päeva enne operatsiooni tsüsti inaktiveerimiseks ja 60 päeva peale operatsiooni retsidiveerumise vältimiseks (Menghi et al., 2017). Viimaseks meetodiks on “ootame ja vaatame” lähenemine, mida kasutatakse kergete tsüsti variantide puhul, mis on kuni 4 cm diameetriga. Ultraheli abil teostatakse patsientidele kaks korda aastas kontroll ning kui esineb kaltsifitseerumine, siis on teada, et tsüst muutub inaktiivseks (McManus et al., 2012).

Alveolaarse ehinokokoosi puhul esinevad tsüstid samuti enamasti maksas, mistõttu võivad patsiendid korduva kollatõve ja hepatomegalia all kannatada. Raskeimaks tüsistuseks on lümfaatiline ja hemaatiline levimine, mis tähendab, et *E. multilocularis* prolifereerub ja metastaseerub teistesse organitesse. Metastaasid tekivad enamasti kopsudesse, aju ja lümfisõlmedesse. Kuna AE puhul on üldjuhul samad organid mõjutatud nagu TE puhul, esinevad ka sarnased kliinilised sümptomid. Näiteks on maksatsüsti puhul samuti algaas asümptomaatiline. Kuid kuna maksatsüst kasvab sarnaselt pahaloomulisele kasvajale võib tekkida näiteks maksatsirroos. WHO on välja pakkunud lausa sarnase klassifitseerimise kasvajatele, et kergendada diagnoosimist ja terapeutiliste otsuste vastuvõtmist (Menghi et al., 2017).

AE ravi kujutab endast alati bensimidiasool klassi kuuluvaid ravimeid. Põhiliselt kasutatakse albendasooli, kuid kui ravim pole kättesaadav või kui ravim ei ole talutav, siis kasutatakse mebendasooli. Albendasool on üldjuhul hästi talutav ja ravi võib olla ajutine või eluaegne. AE puhul on samuti radikaalne kirurgia kohustuslik, vaid juhtudel, kus esineb vastunäidustusi, ei teostata operatsioone. Enne operatsiooni ei kasutata siin farmakoloogilist ravi nagu TE puhul. Kuid peale operatsiooni peab patsient vähemalt kaks aastat tarvitama albendasooli retsidiveerumise vältimiseks, samuti on väga oluline AE patsiente kümme aastat peale operatsiooni jälgida. Patsiendid, kelle tsüstid ei ole opereeritavad või vaid osaliselt opereeritavad, peavad ravimit pikaajaliselt või eluaegselt tarvitama. Samuti soovitatakse patsientidel, kellele teostatakse maksa transplantatsioon, pikaajaliselt albendasooli tarvitada (Reuter et al., 2000).

Ravivõimalused on läbi aegade paranenud ja mitmekesisistunud, mistõttu oodatav eluiga on suurenenud ka ehinokokooosi patsientidel. Sellegipoolest on oluline patsiente peale ravi jälgida, sest retsidiveerumine on reaalne oht (Eckert ja Thompson, 2017). Näiteks näitas R. J. Horton, et ravides tsüste albendasooliga, suri kõigest 30% tsüstidest ja ravile reageerisid 40-50% tsüstidest, mis tähendab, et mõned tsüstid ei allunud üldse ravile (Horton, 1997). See tähendab, et ravi ei ole veel kõige efektiivsem ja see valdkond vajab täiendamist.

1.5. Perekond *Echinococcus* liigid ja genotüübid

Geneetiliste, morfoloogiliste, elutsükli ja peremehe erinevuste põhjal eristatakse perekonna *Echinococcus* liike üksteisest (Thompson, 2017). *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.) alla kuuluvad kõik *Echinococcus* liigid, mis põhjustavad inimestel ja loomadelt tsüstilist ehinokokooosi (Alvarez Rojas et al., 2014). *E. granulosus s.l.* geneetiline mitmekesisus on suur ja liigid on jaotatud mitokondriaalse DNA (mtDNA) abil genotüüpideks (Laurimäe et al., 2018b). *Sensu lato* kompleksi kuuluvad genotüübid G1, G3-G8, G10 ja *E. felidis*. Kõige enam esineb inimestel infektsioon *E. granulosus sensu stricto* (s.s.) poolt põhjustatud parasiitide poolt, kuhu kuuluvad *E. granulosus* G1 ja G3 genotüübid (Kinkar et al., 2018b).

E. granulosus s.s. genotüüp G1 ehk lambatüvi on kõige suurema levikuga kõikidest genotüüpidest (nt Casulli et al., 2012; Šnábel et al., 2009; Kinkar et al., 2018b). Peamisteks vaheperemeesteks on lambad, veised, sead, kaamelid, kitsed ja kangurud ning sagedasemateks lõpp-peremeesteks koerad, dingod, šaakalid ja häänid (Thompson ja McManus, 2002). G1 genotüüp on globaalse levikuga, kuid kõige laialdasemalt leidub teda eelkõige Lõuna-Euroopas, eriti Vahemere äärsetes piirkondades, sh Albaanias, Hispaanias, Itaalias, Kreekas ja Türgis. Samuti on G1 levinud ka põhjapoolsetes regioonides nagu näiteks Venemaal, Eestis, Soomes ja Norras, kuid seda vähesel määral (Kinkar et al., 2016).

G3 ehk pühvlitüve olulisemateks vaheperemeesteks on pühvlid ja veised ning lõpp-peremeesteks koerad (Thompson, 2008). Hiljutised uuringud on näidanud, et vaheperemeesteks võivad olla ka kitsed (Calderini et al., 2012), lambad ja sead (Maillard et al., 2009). G3 kirjeldati algselt kahel India pühvlil ja on leitud, et seda genotüüpi esineb ka Austraalias, Põhja-Aafrikas, Lähis-idas, Lõuna-Ameerikas, Lõuna-Euroopas ning osaliselt

Aasias. Enim levinud on G3 genotüüp aga Indias (Kinkar et al., 2018c). Kõige endeemilisemad piirkonnad on Vahemere idapoolne piirkond, Põhja-Aafrika, Lõuna- ja Ida-Euroopa, Lõuna-Ameerika, Kesk-Aasia, Siber ja Lääne-Hiina (WHO, 2015).

G4 genotüüp kuulub liiki *Echinococcus equinus* ning tegemist on hobusetüvega, kelle vaheperemeesteks on hobuslased. G5 genotüüp kuulub liiki *Echinococcus ortleppi*, kelle vaheperemeesteks on veised ja sellest tulenevalt on see nimetatud veisetüveks. Genotüüp G6 esineb valdavalt kaamelitel ja kitsedel ning on nimetatud kaamelitüveks ja G7 peamiselt sigadel, mistõttu nimetatakse ka seatüveks. Lõpp-peremeesteks on valdavalt koerad või teised koerlased (Thompson ja Jenkins, 2014). G6 genotüüpi esineb rohkem kaamelikasvatus piirkondades Aafrikas ja Lähis-Idas. G7 genotüüpi esineb seakasvatus alades Euroopas, Vahemere ääres ja Kesk-Ameerikas (Laurimäe et al., 2018b). Seega esineb G6/G7 genotüüp pigem lõunapoolsemates piirkondades nagu Lääne-Euroopas, Vahemere äärses piirkonnas, Aafrikas, Lõuna- ja Kesk-Ameerika ja Lähis-Idas. G6 on teine kõige sagedasem TE põhjustaja inimestel ja arvatakse, et G7 on suurem nakkusepõhjustaja kui varasemalt kirjeldatud (Laurimäe et al., 2018b). Nagu eespool mainitud, on G6-G7 liiginime *E. intermedius* sobivus diskussiooni all.

Liigi *Echinococcus canadensis* alla kuuluvad genotüübid G8 ja G10 ning nende peamiseks vaheperemeesteks on hirvlased, seetõttu on neid nimetatud ka hirvlaste tüveks. Lõpp-peremeheks on valdavalt koerad ja hundid (Thompson, 2017). Mõned teadlased liigitavad G6-G10 ühe liigi *E. canadensis* alla (Nakao et al., 2008), kuid hiljutise uuringu valguses moodustavad G6/G7 ja G8/G10 kaks liiki (Laurimäe et al., 2018). G6/G7 genotüüpidele on omane koduloomade tsükkel, samas kui G8/G10 tsükkel hõlmab eelkõige metsloomi. Lisaks paigutuvad tuumageenidel põhinevates fülogeneetilistes uuringutes G6/G7 ja G8/G10 kindlalt kahte klaadi (Saarma et al., 2009; Laurimäe et al., 2018). Kõiki andmeid koos arvestades tuleks neid seega käsitleda erinevate liikidena. G8/G10 esineb põhjapoolsetes piirkondades nagu Põhja-Euroopas, Põhja-Aasias ja Kanadas (Laurimäe et al., 2018a).

Liiki *Echinococcus felidis*, mida tuntakse ka kui lõvitüve, esineb vaid Aafrika metsikutel herbivooridel ja lõvidel (Hüttner et al., 2008). Vaheperemeesteks on tüügassead, sebrad, gnuud, põõsassead, pühvlid, antiloobid, kaelkirjakud ja jõehobud ning lõpp-peremeheks on lõvi (Thompson ja Jenkins, 2014). Liiki *Echinococcus shiquicus* leidub hetkel vaid Tiibeti platool ja tema vaheperemeheks on platoo viiksjänas (*Ochotona curzoniae*) ning lõpp-peremeheks on

Tiibeti rebane. On leitud, et ka kodustatud koerad võivad nakatuda *E. shiquicus* parasiidi munadega, kuid praeguseks ajaks on antud liigi kohta veel vähe teadmisi. *E. vogeli* liiki on võimalik kohata Ameerika maailmajaos. Liigi ainukeseks lõpp-peremeheks on põõsaskoer (*Speothos venaticus*), mistõttu leidub *E. vogeli* parasiiti vaid põõsaskoera elupaikades. Vaheperemeheks on suured närilised, kelleks on aguutid ja pakad (*Cuniculus paca*). Üksikutel juhtudel on avastatud nakatumist ka koertel ja inimestel, kui andmete nappuse tõttu ei saa otseseid järeldusi teha. *E. oligarthra* paelussi liiki leidub samuti Ameerika maailmajaos. Arvatakse, et tema elutsüklil põhineb peamiselt suurtel närilistel ja metsikutel kassidel, kuid piiratud andmete tõttu ei ole peremehed lõplikult määratletud (Romig et al., 2017).

1.6. Põistang-paelussi geneetiline mitmekesisus

Oluline on erinevaid genotüüpe määrata ja uurida, sest erinevatel tüvedel on erinev nakatamisvõime (Kinkar et al., 2017). Nagu eelnevalt mainitud, on G1 ja G3 genotüübid enim seostatud ehhinokokoosiga, mistõttu on oluline täpne identifitseerimine ja õige genotüüpide eristamine (Kinkar et al., 2018a). Täpne eristamine võimaldab meditsiini- ja veterinaariavaldkonnas paremini erinevaid liike mõista ning sellest lähtuvalt ka inimeste ja loomade tervise seisukohtadest otsuseid vastu võtta (Laurimäe et al., 2018a). Samuti võimaldab geneetiliste mitmekesisuse uurimine paremini mõista *Echinococcus* ja ehhinokokoosi levimise mustrit (Kinkar et al., 2019).

Mitkondriaalne DNA (mtDNA) on aastaid olnud tähtis genoom perekonna *Echinococcus* fülogeneetilistes ja populatsiooni struktuuri uuringutes. Samuti on mtDNA väga oluline marker fülogeograafilistes analüüsides (Kinkar et al., 2019). Enamikes uuringutes on analüüsitud peamiselt *COX1* (*cytochrome c oxidase subunit 1*) geeni varieeruvust, harvem *NAD1* (*NADH dehydrogenase subunit 1*) (Bowles et al., 1992; Bowles ja Mcmanus, 1993). Geeni *NAD1* järjestuse pikkuseks on 894 aluspaari ja *COX1* on 1608 aluspaari pikk (Addy et al., 2017). Uurides aga ainult neid kahte geeni ei ole alati võimalik sarnaseid genotüüpe üksteisest eristada, nagu näiteks G1 ja G3 genotüüpe, ega saada head ülevaadet eri genotüüpide varieeruvusest. Seetõttu on hakatud kasutama terve mtDNA analüüsi (Kinkar et al., 2018a), mille kogupikkus on olenevalt genotüübist ~13500 kuni 17675 aluspaari (Kinkar et al., 2019).

Hetkel on palju erinevatest regioonidest uuringuid, kus on kasutatud lõike mtDNA-st ja need ei ole erinevuste tõttu omavahel alati võrreldavad. Selle probleemi lahendab terve mtDNA analüüs, sest tänu terviklikule järjestusele saab tulemusi omavahel võrrelda ja nii saab lõplikult parema arusaama *Echinococcus* globaalse mitmekesisuse muustrist ja fülogeograafiast (Kinkar et al., 2018a). Mitokondriaalne DNA pärandub emaliini pidi (Spotin et al., 2018) ja rakkudes esineb mtDNA-d mitme koopiana. See suurendab tema diagnostilist väärtust, sest nii on ka degradeerunud proovidest võimalik informatsiooni saada. Mitokondriaalsel DNA-l põhinev evolutsiooniline sugupuu võib erineda tuuma DNA (tDNA) analüüsil saadud sugupuust, sest mtDNA-s ja tDNA-s aset leidvad protsessid erinevad üksteisest. Esiteks läbib tDNA rekombinatsiooni, mida mtDNA puhul reeglina ei esine (Saarma et al., 2009). Teiseks evolutsioneerub mtDNA tDNA-st kiiremini (Bowles et al., 1992) kõrge mutatsioonitaseme tõttu. Mutatsioonid kinnituvad juhuslikult piirkondadesse, mis ei ole selektsiooni all. Kui uued mutatsioonid on kinnitunud, siis uus mitokondriaalne liin eraldub esivanema liinist ja uued mutatsioonid süvendavad lahknemist veelgi üksteisest. Samuti puuduv rekombinatsioon võimendab üksteisest eristumist, kuid kui ei järgne reproduktiivne isolatsioon, siis pole lahknemisel bioloogilist tähendust ja tegemist ei ole eraldiseisvate üksustega (Saarma et al., 2009). Üheks näiteks erinevatest sugupuudest on G1 ja G3 genotüüp. Genotüübid on eristatava mitokondriaalse päritoluga ja nad on eraldiseisvad üksused, aga tDNA analüüsi põhjal need kaks genotüüpi üksteisest ei eristu (Kinkar et al., 2017). Seetõttu oleks ka tuleviku uuringutes mõistlik kombineerida nii mtDNA-st kui tDNA-st saadud informatsiooni, et terviklik pilt kokku saada (Kinkar et al., 2018c).

2. ESPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Kaardistada Pakistanist, Indiast ja Ukrainast saadud parasiidiproovide genotüübid ja analüüsida nende geneetilist mitmekesisust mtDNA järjestuste põhjal. Kaasates teiste poolt varem analüüsitud homoloogilisi mtDNA järjestusi, selgitada välja analüüsitud India, Ukraina ja Pakistani proovide evolutsioonilised seosed nendega ning globaalse fülogeograafia eripärad, sh. peamised migratsiooni suunad.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Valim ja töö ülesehitus

Käesolevas uuringus kasutati kokku 86 proovi, millest pärinesid neli Ukrainast, 22 Indiast ja 60 Pakistanist (6 Swatist, 4 Rawalakotist ja 50 Multanist; LISA 1). Proovide materjalideks olid tsüstide membraanid või protoskooleksid, mida säilitati piirituses. Proovidega koos saadeti informatsioon, millisest loomast tsüst pärines ja mis organist tsüst pärines. Samuti looma vanus ning sugu. Peamiselt pärinesid tsüstid veistest, aga oli ka proove, mis pärit kitsedelt, lammastelt ja pühvlitelt (LISA 1).

Töö ülesehitus:

LABORITÖÖ

- DNA eraldamine – membraanist või protoskooleksist
- PCR (mtDNA, enamik genoomist)
- PCR produktide puhastus
- Geelelektroforees
- Sanger sekveneerimine – teostatud TÜ genoomika instituudi tuumiklabori poolt

ANDMEANALÜÜS

- CodonCode Aligner – konsensusjärjestuste loomine
- BioEdit – seitsmenda lookuse kokku panek
- MUSCLE - järjestuste joondamine
- BEAST – evolutsioonipuude rekonstrueerimine, fülogeograafiline analüüs
 - BEAUti
 - BEAST
 - Tracer
 - FigTree
- Network – fülogeneetiliste võrgustike koostamine
- DnaSP – geneetilise mitmekesisuse parameetrite arvutamine
- Spread3 – fülogeograafilise kaardi visualiseerimine

2.2.2. DNA eraldamine

Ehhinokokkide DNA eraldati tsüstide membraanidest või protoskooleksitest ja selleks kasutati DNA HighPure PCR Template Preparation Kit'i (Roche Diagnostics). DNA eraldati 25-50 mg membraanist või 50 µl protoskooleksite segust. Materjale hoiustati piirituses, mistõttu kuivatati eelnevalt kasutatav kogus. Kui piiritus oli aurustunud, siis lisati 200 µl Tissue Lysis Buffer'it ja 40 µl Proteinase K-d. Seejärel viidi proovid 55 °C juurde vähemalt üheks tunniks inkubeerima, kus iga 20 minuti tagant käidi neid kergelt segamas. Järgmisena lisati 200 µl Binding Buffer'it, segati segu ja pandi kümneks minutiks 70 °C juurde seisma. Selles etapis oli oluline aega jälgida. Kui kümme minutit sai läbi, lisatati 100 µl isopropanooli, millele järgnes segamine vorteksil (vähemalt kümme sekundit). Proovid tõsteti ümber spetsiaalsetesse ränifiltriga tuubidesse ja tsentrifuugiti 11300 rpm juures üks minut.

Proovist tulenev materjal jäi filtrile kinni ja järgnes puhastamise etapp. Puhastamiseks esimese etapis lisati 500 µl Inhibitor Removal Buffer'it ja tsentrifuugiti 11300 rpm juures üks minut. Järgmises etapis kasutati 500 µl Wash Buffer'it, tsentrifuugiti 11300 rpm juures ja seda viimast etappi korrati. Kui kolmas pesu sai tehtud ja tsentrifuugitud, tsentrifuugiti proove veel kümme sekundit kõrgematel pööretel, et filter võimalikult kuivaks saada.

Algas elueerimise etapp, mille jaoks pidi 200 µl Elution puhvrit lisama. Proovid tsentrifuugiti taaskord ning enam ei olnud DNA filtril, vaid oli kogunenud hoidmistuubi. DNA tõsteti ümber 1,5 ml Eppendorfi tuubidesse ja neid hoiustati -20 °C juures.

2.2.3. Praimerid

Selles töös kasutatavad praimerid (Tabel 1) olid eelnevalt disainitud TÜ ÖMI terioloogia töörühma poolt.

Tabel 1. Põistang-paelussi *Echinococcus granulosus sensu stricto* mtDNA PCR-il ja sekveneerimisel kasutatavad praimerid (täiendatud versioon Laurimäe et al., 2018b). Positsioonid on vastavalt AF297617 koodile GenBank'is.

Praimer	Praimeri järjestus	Praimeri positsioon	PCR produkt
Ef1	TCGTTTTACACGCGATTGAACT	4924...4945	
Er1	ACCTGCTATGCAGCCCTATT	6147...6166	1243 bp
E2fn	GATGCTGTAACTTCAAGAAATG	6034...6056	
E2r2	CTCAAAGCATTCAAACGC	7053...7070	1037 bp
E3fn	GTTGATTTCGTGTTAATTTTTGGAG	6873...6897	
E3rn	GAAAACATAGCAAACAACAACCC	7573...7595	723 bp
E4f2	GTGATCCTATTTTATTTCAAC	7436...7456	
E4rn	GCTACCTTGCACAGTCAATATAC	8939...8962	1527 bp
E5fn	GGTACCTAGTTTTTGTTATATTGT	8712...8735	
E5rn	GAATCGCTCACTGCCAAACCA	9813...9833	1122 bp
E6f	TAAGGGTGATGCAATTTGAG	9588...9607	
E6r	ACAACCATCTACAGCACGAA	10 812...10 831	1244 bp
E7fn	GATGCTGTTCTGGTCGTCTTAATC	10 623...10 647	
E7rn	CAATCAACTTCAACAACATAAACC	11 992...12 015	1393 bp
S7f*	GTGTCGGTGTTTAGTCCTAATAG	11 053...11 076	
E8fn	GCTTATGTTACGGCCATAAGA	11 716...11 736	
E8rn	TGCTTAGTAAAAAACACCCCA	12 764...12 784	1069 bp
E9f3	ATTGGGGTGTTTTTTACTAAGCA	12 762...12 784	
E9r3	CAATACCACGCCAACACAG	575...593	1420 bp
E10f	GATTACTGTTACTGGTTTTCA	312...332	
E10r	CAACTTAAAAACAAGCATCATCA	1756...1778	1467 bp
E11f	TTTTATGCTATTCTTCGGTGTA	1521...1542	
E11r	CAAAAACACCTCATTAACCAC	3278...3299	1779 bp
S11f*	GGTGCTAATTTTAGGTTTGTATAGACA	2188...2215	
E12f	TTGTGGTGTTTTTATGATG	2922...2940	
E12r	CACAGACGATAACCCAGA	4204...4221	1300 bp
E13f	CGGGTCTTTTATTTTGATGTTG	4003...4024	
E13r	GATCCAAAAGCACATCGA	5507...5524	1522 bp

*Praimerid, mida kasutati ainult sekveneerimises lisapraimeritena.

2.2.4. PCR

PCR lõppmahuks oli 20 µl, millest 18 µl oli mastermix ja 2 µl DNA. Mastermix-i kuulus vesi, 10× ADV2 (*advantage 2*) puhver (Takara Bio), 0,2 mM dNTP-sid (Thermo Fisher Scientific), 0,25 µM praimereid ja 1U ADV2 ensüümi. Kui mastermix oli kokku segatud, vorteksitati segu kergelt ja 18 µl pipeteeriti igasse PCR tuubi. Järgmisena lisati 2 µl DNA-d PCR tuubidesse, segati kergelt nipsutades ning tilgad tsentrifugeeriti põhja. Seejärel asetati proovid PCR-masinasse ja valiti vastavalt proovidele programmeeritud programm, mis on allpool välja toodud.

Tulemuste visualiseerimiseks valmistati 1,4% agarosgeel. Selleks segati kokku 50 ml 1× TAE-d (*Tris-acetate-EDTA*) ja 0,7 g agarosi ning segu pandi neljaks minutiks mikrolaineahju 360 W juurde. Seejärel segati segu kergelt ja asetati veevanni jahtuma umbes 2 minutiks. Pärast lisati 7 µl etiidumbromiidi (10 mg/ml, lõppkontsentratsioon 1,4 µg/ml) ja segu kallati valmis pandud plaadile. Geel tahenes umbes 25 minutit, mille järel saadi PCR produktid geelile kanda.

Enne, kui PCR-i produktid geelile kanti, segati nad 6× Orange LD värviga (Thermo Fisher Scientific) kokku. Geelile läks 10 µl PCR produkti koos 2 µl värviga ja keskmisele rajale paigutati GeneRuler 1kb Plus (Thermo Fisher Scientific) marker. Kui kõik produktid olid geelile kantud, jooksutati proove 150 V juures 15 minutit.

Järgnevateks töödeks oli vajalik PCR produktid puhastada. Selleks valmistati ensüümide mastermix, kuhu lisati iga proovi kohta 0,05 µl eksonukleasi Exo1 (20U/µl, Thermo Fisher Scientific) ja 1 µl aluselist fosfaadi FastAP-d (1U/µl, Thermo Fisher Scientific). Segus oleva kahe komponendi lõppkontsentratsioon oli 1U/µl. PCR produktidele lisati 1 µl ensüümide mastermixi ja seejärel pandi nad tagasi PCR-masinasse. Valiti eelnevalt programmeeritud puhastuse programm, mis on välja toodud allpool. Kui puhastus oli läbitud, viidi proovid otse sekveneerimisele või asetati -20 °C juurde hoiustama.

PCR-masina programmid:

Ehh1 (PCR)

Antikehade denaturatsioon	95 °C	1 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 10 tsükli, iga tsükkel -0,5 °C
Praimerite seondumine	55 °C	45 sek	
Ekstensioon	68 °C	2 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	} 25 tsükli
Praimerite seondumine	50 °C	45 sek	
Ekstensioon	68 °C	2 min	
Inkubatsioon	68 °C	2 min	
Säilitamine	7 °C		

Puhastus (FastAP ja Exo töötlus)

Ensüümide aktivatsioon	37 °C	30 min
Ensüümide deaktivatsioon	80 °C	15 min
Säilitamine	7 °C	

2.2.5. Sanger sekveneerimine

Sanger sekveneerimine viidi läbi TÜ genoomika instituudi tuumiklaboris, kuhu saadeti PCR produktid vastavate praimeritega. Tuumiklaboris viiakse sekveneerimine läbi kas Applied Biosystems 3130xl või 3730xl DNA Analyzer masinal.

2.2.6. Konsensusjärjestuste kokkupanek programmiga CodonCode Aligner

Enne järgmiste etappide juurde siirdumist oli vajalik tuumiklaborist saadud toorandmed üle vaadata. Selleks kasutati CodonCode Aligner programmi, kus oli võimalik konsensusjärjestused kokku panna. Konsensusjärjestused käidi ükshaaval üle ja selle juures eemaldati ebakvaliteetsed piirkonnad ning tekkinud vead parandati. Algselt pandi järjestused ühel lookusel kokku, mis koosnesid 11R, 11F ja 11S praimeripaaridest saadud järjestustest. Seejärel jooksutati lõik kõikidest saadud järjestustest blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) andmebaasi vastu, mille abil saadi esialgne genotüübi määrang.

Töötavate proovide puhul jätkati ülejäänud lookuste PCR-iga. Praimeripaari nr 9 kasutati ainult genotüüpide G6 ja G7 puhul, mistõttu peamiselt teostati järgnev PCR praimeripaaride 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 ja 13. Viie proovi puhul kasutati ka nr 9 praimeripaari (Tabel 1.). Kõik saadud PCR-produktid viidi TÜ genoomika instituudi tuumiklaborisse sekveneerimiseks ja kõikide järjestuste toorandmete põhjal saadi lõplik konsensusjärjestus kokku panna CodonCode Aligner programmis.

CodonCode Aligner'is kasutati referentsiks G1 ja G3 genotüübi puhul G1 täispikka genoomi, mis on 17675 bp pikk (Kinkar et al., 2019) ja G7 puhul kasutati referentsiks G6 genotüübi täispikka genoomi, mis on 13554 bp pikk (Laurimäe et al., 2018b). Toorandmete analüüsimisel ei suutnud CodonCode Aligner seitsmendat lookust õigesti referentsjärjestusele paigutada. Seetõttu vaadeldi tervet seitsmendat lookust BioEdit programmis, tänu millele saadi teada, et lookuses esineb umbes 100 aluspaari pikkune lünk. Seejärel muudeti CodonCode Aligner'is parameetreid, et programm tuvastaks vastava lünga ning lõplikud konsensusjärjestused saadi kokku panna.

2.2.7. Bayesi fülogeneetiline ja fülogeograafiline analüüs programmiga BEAST

BEAST ehk *Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees* on programmi pakett, mis koosneb BEAUti, TreeAnnotator ja paljudes muudest programmidest. Paketti on võimalik internetist tasuta alla laadida ja kasutada ning antud töös kasutati BEAST v1.10.4 versiooni

(Suchard et al., 2018). Analüüs algas BEAUti programmiga, milles oli võimalik luua õige fail BEAST programmi jaoks. BEAUti's avati järjestused, mis olid FASTA formaadis ja seal saadi õiged parameetrid vastava mudeli jaoks valida. Selles töös oli kasutatavaks mudeliks GTR +G +I (Gu et al., 1995) ja kasutati ranget molekulaarset kella (Drummond ja Bouckaert, 2015). Parameetri *tree prior* puhul valiti eksponentsiaalne kasv (Griffiths ja Tavaré, 1994) ja kasutati kaasuvaid parameetreid. Aposterioorse tõenäosuse hindamiseks kasutati MCMC (Markov Chain Monte Carlo) meetodit, kus kasutati 10 miljonit iteratsiooni ning valimisse kaasati iga 1000 seisund. BEAUti programmist saadi XML-fail, mis on loetav BEAST programmi jaoks. Kui avati saadud XML-file BEAST-is, siis hakkas programm analüüsi jooksutama, mis olenevalt andemamahust võis kesta minuteid, tunde, päevi või lausa paar kuud. Kui programm oli lõpule jõudnud, lõi see kolm faili: OPS-fail, LOG-fail ja TREES-fail. OPS-faili andis jooksutatud andmete kohta kokkuvõtte ja ka infot võimalike probleemide kohta. LOG-fail oli vajalik Tracer programmi jaoks ja TREES-fail oli kasutatav TreeAnnotator programmis. Antud töös kasutati Tracer v1.7.2 versiooni (Rambaut et al., 2018), kus saadi teada, kas kasutatavad parameetrid olid sobivad nagu näiteks, kas valitud jooksutamispikkus on mõttekas ehk ega ei kasuta ilma asjata liiga palju ressursse. Lõpliku evolutsioonipuu saadi TreeAnnotator v1.10.4 programmi abil (Drummond ja Rambaut, 2007; Suchard et al., 2018), milles kasutati *Burnin* parameetriks 100000. Puu visualiseerimiseks kasutati FigTree v1.4.4 programmi (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Fülogeograafiline analüüs teostati samuti BEAST programmide paketi abil ja analüüs viidi läbi BEAST kodulehel oleva õpetuse fülogeograafiline levik diskreetses ruumis järgi (http://beast.community/workshop_discrete_diffusion). Fülogeograafia uurimiseks vaadeldi genotüüpe G1 ja G3 eraldi. Analüüs algas BEAUti programmiga, kus määratleti igale proovile vastav riik, kust see pärines. Kasutatavaks mudeliks oli GTR +I +G ja kasutati ranget molekulaarse kella mudelit. MCMC ahelaid jooksutati 10 miljonit iteratsiooni ja valim moodustus igast 1000 seisundist. Saadav fail jooksutati BEAST programmis ja vastav puu koostati TreeAnnotator abil. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati SpreaD3 v.0.9.6 programmi (Bielejec et al., 2016).

2.2.8. Fülogeneetiline analüüs programmiga Network

Network v10 (<https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) on vabavara, mille abil sai koostada fülogeneetilisi võrgustikke. Programmi kasutamisel oli vajalik eelnevalt soovitud järjestused joondada, mida tehti Muscle programmi (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>) abil ja saadud FASTA-fail oli vajalik RDF-formaati panna. Selleks kasutati DnaSP v6.12.03 programmi (Rozas, 2009), mis oli võimeline genereerima soovitud RDF-faili. Saadud failis oli haplotüüpide informatsioon ja kajastati ka vastav andmetabel, kus oli kõikide järjestuste kohta andmed. Seejärel saadi faili Network programmis avada, mis arvutas vastava võrgustiku välja ja joonistas selle välja. Saadud võrgustikul pidi haplotüübid käsitsi ümber paigutama nii, et kõik oleksid loetavad. Viimasena tuli ka haplotüüpide koodid oma märgistusega asendada.

Käesolevas töös kasutati Network programmi ka lõplikute genotüüpide määramiseks. Selle jaoks analüüsiti mitogenoomi järjestustest nad5 geeni järjestusi ja teostati joondus. Seejärel koostati nende andmete põhjal fülogeneetiline võrgustik, kus haplotüübid paigutusid kahte klaadi. Üks klaad vastas G1 genotüübile ja teine G3 genotüübile, tänu millele saadi kõikidele proovidele õige genotüüp määrata.

2.3. Tulemused

Käesoleva töö raames sekveneeriti 86 uut mitokondri genoomi järjestust. Saadi peaaegu täielikud mitogenoomid, mille lõpp-pikkuseks on 11 549 aluspaari.

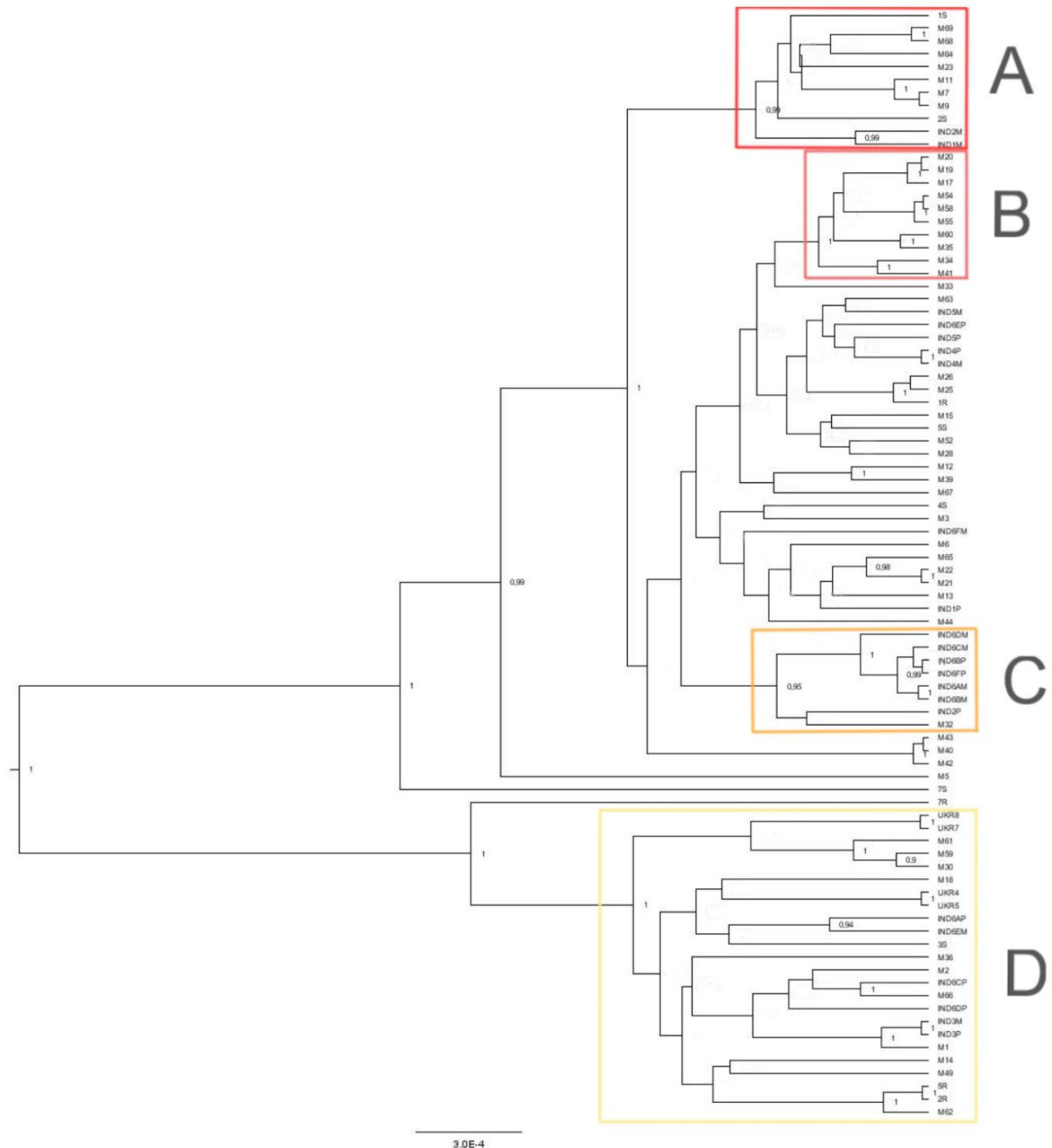
2.3.1. Pakistani, India ja Ukraina proovide genotüübid

Proovid Pakistanist, Indiast ja Ukrainast jagunesid kahte suuremasse klaadi – G1 genotüüp ja G3 genotüüp. Suurem, G3 genotüübiga, klaad jaotub omakorda kolmeks väiksemaks klaadiks. Suuremas klaadis on kokku 61 järjestust, mis on kõik G3 genotüübiga ning väiksemas klaadis on 25 järjestust G1 genotüübiga (Joonis 2). Pakistani proovidest on 15 järjestust G1 genotüübiga ja 45 G3 genotüübiga. India proovidest on kuus G1 genotüübiga ja 16 G3 genotüübiga ning kõik neli Ukraina proovi jaotusid G1 genotüübi alla. Genotüübid G1 ja G3 eristusid üksteisest selgelt 42 mutatsiooniga, välja arvatud proov PAK64. Nimelt sisaldas proov PAK64 mutatsioone, mis on omased nii G1 kui ka G3 genotüübile. Ülekaalus on G1 omased mutatsioonid, mistõttu paigutub proov G1 klaadi poole ja kuulub vastavasse klaadi (Joonis 3).

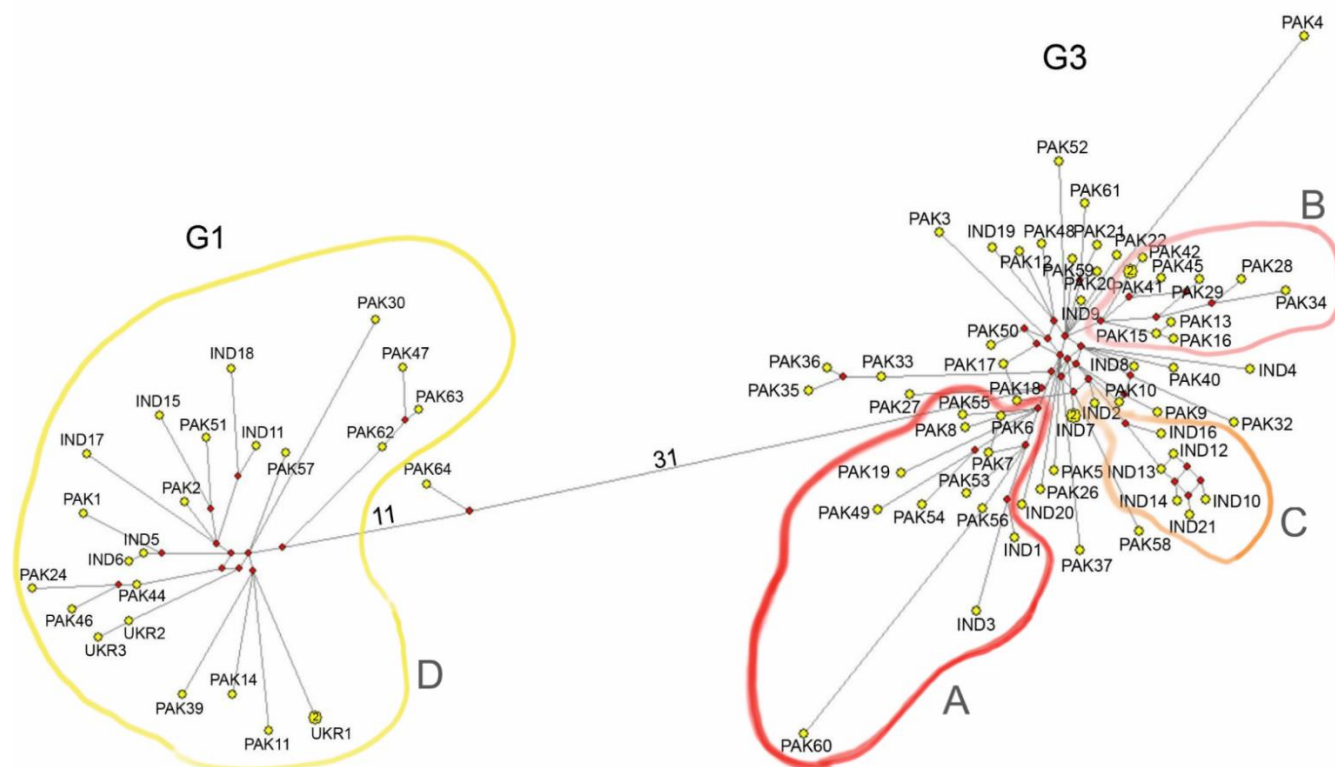
Kaheksakümmend kuuest Pakistani, India ja Ukraina proovidest saadud haplotüüpide mitmekesisus oli kõrge ($H_d=0,9992$). Proovide hulgast, mis jaotusid G3 genotüübi alla, saadi kolm hästi toetatud (aposterioorne tõenäosus $> 0,90$) monofüleetilist haplogruppi (Joonis 2). Haplogrupid koosnevad nii Pakistani kui ka India proovidest, välja arvatud üks haplogrupp (Joonis 2; B), kus on proovid ainult Pakistanist. G3 genotüübi ($N=61$) haplotüüpide mitmekesisus eraldi võetuna oli väga kõrge ($H_d=1$) ja G1 ($N=25$) haplotüüpide mitmekesisus samuti kõrge ($H_d=0,9967$). G1 genotüübi puhul saadi üks hästi toetatud haplogrupp, mille aposterioorne tõenäosus oli eriti kõrge ($=1$). Haplogrupp koosneb proovidest, mis on Pakistanist, Indiast ja Ukrainast.

Uuritud proovide haplotüüpide mitmekesisus on $H_d \approx 0,999$ ja nukleotiidide mitmekesisus π on 0,00256. Neutraalsusindeksitest F_u ja L_i D testi ning Tajima D testi tulemused olid mõlemad negatiivsed ja statistiliselt olulised ($FLD=-4,20736$, $p < 0,02$; $D=-1,81897$, $p < 0,05$). Negatiivsed tulemused viitavad järsule ekspansioonile. Kogu valimist moodustasid Pakistani

proovid peaaegu 70%, mistõttu teostati nende puhul neutraalsusindeksite testid eraldi. G1 genotüübiga proove on 15 ja neutraalsusindeksid on mõlemad negatiivsed ning statistiliselt oluline on vaid Tajima D tulemus (FLD=-2,19895, $p > 0,05$; D=-1,82705, $p < 0,05$). G3 genotüübiga proove on 45 ja neutraalsusindeksid on samuti negatiivsed ning tulemused on statistiliselt olulised (FLD =-3,64572, $p < 0,02$; D=-2,40626, $p < 0,01$).



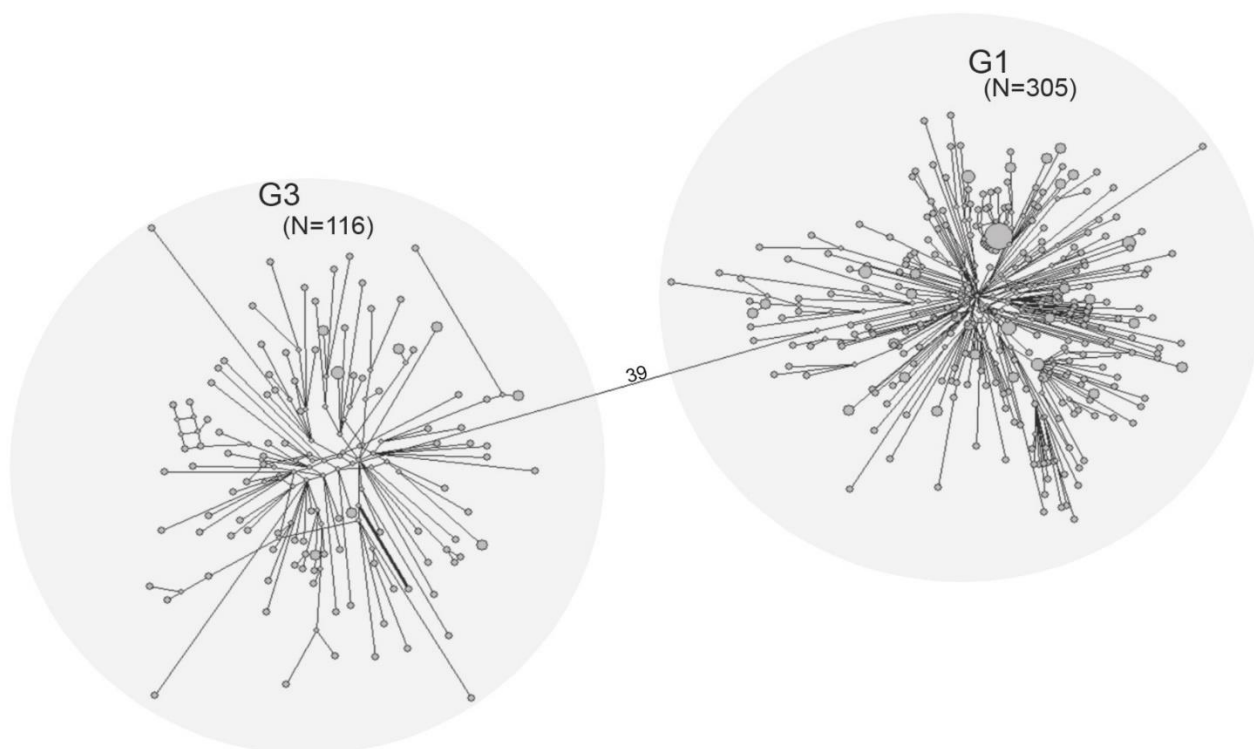
Joonis 2. Pakistani, India ja Ukraina *Echinococcus s.s.* G1 (N=25) ja G3 (N=61) Bayesi fülogeneetiline puu (programm BEAST). Värviliste kastidega on tähistatud neli klaadi (A-D), mille aposterioorne tõenäosus on $>0,90$ ja mis sisaldas viit või enam haplotüüpi.



Joonis 3. Pakistani, India ja Ukraina päritolu *Echinococcus granulosus s.s.* G1 (N=25) ja G3 (N=61) isolaatide fülogeneetiline võrgustik (programm Network). Kollased täpid tähistavad Pakistani, Indiast ja Ukrainast proove ning punased täpid tähistavad mediaanvektorite asukohti. Kahe klaadi vahel olevad arvud näitavad genotüüpide G1 ja G3 vahelist mutatsioonide arvu. Kollase täpi sees olev number tähistab, mitu genotüüpi ühes haplotüübis on. Kui puudub arv, siis see näitab, et tegemist on ühe genotüübiga ühes haplotüübis. Värviliselt on tähistatud neli klaadi (A-D), mille aposterioorne tõenäosus on >0,90.

2.3.2. Fülogenees laiendatud andmekogumi põhjal

Autori poolt analüüsitud 86 proovile võeti lisaks juba eelnevalt sekveneeritud 280 genotüübi G1 mtDNA järjestust ja 55 genotüübi G3 järjestust. 280 mtDNA järjestusest pärinesid 211 Kinkar et al. (2018a) tööst ja 69 mtDNA järjestust pärinesid Maris Pärna magistriltööst (Pärn, 2019). G3 genotüübi 55 mtDNA järjestustest saadi 39 Kinkar et al. (2018b) tööst ja 16 Maris Pärna magistriltööst. Kokku saadi 421 mtDNA järjestust, mis pärinesid 24 erinevast riigist. Järjestused moodustasid kaks selgelt eristuvat klaadi. Üks klaad koosnes genotüüp G1 ja teine genotüüp G3, mis olid üksteisest selgelt eraldatud 39 mutatsiooni võrra (Joonis 4).



Joonis 4. *Echinococcus granulosus* s.s. fülogeneetiline võrgustik (N=421; programm Network) koos genotüüpide G1 (N=305) ja G3 (N=116). Arv tähistab mutatsioone kahe klaadi vahel.

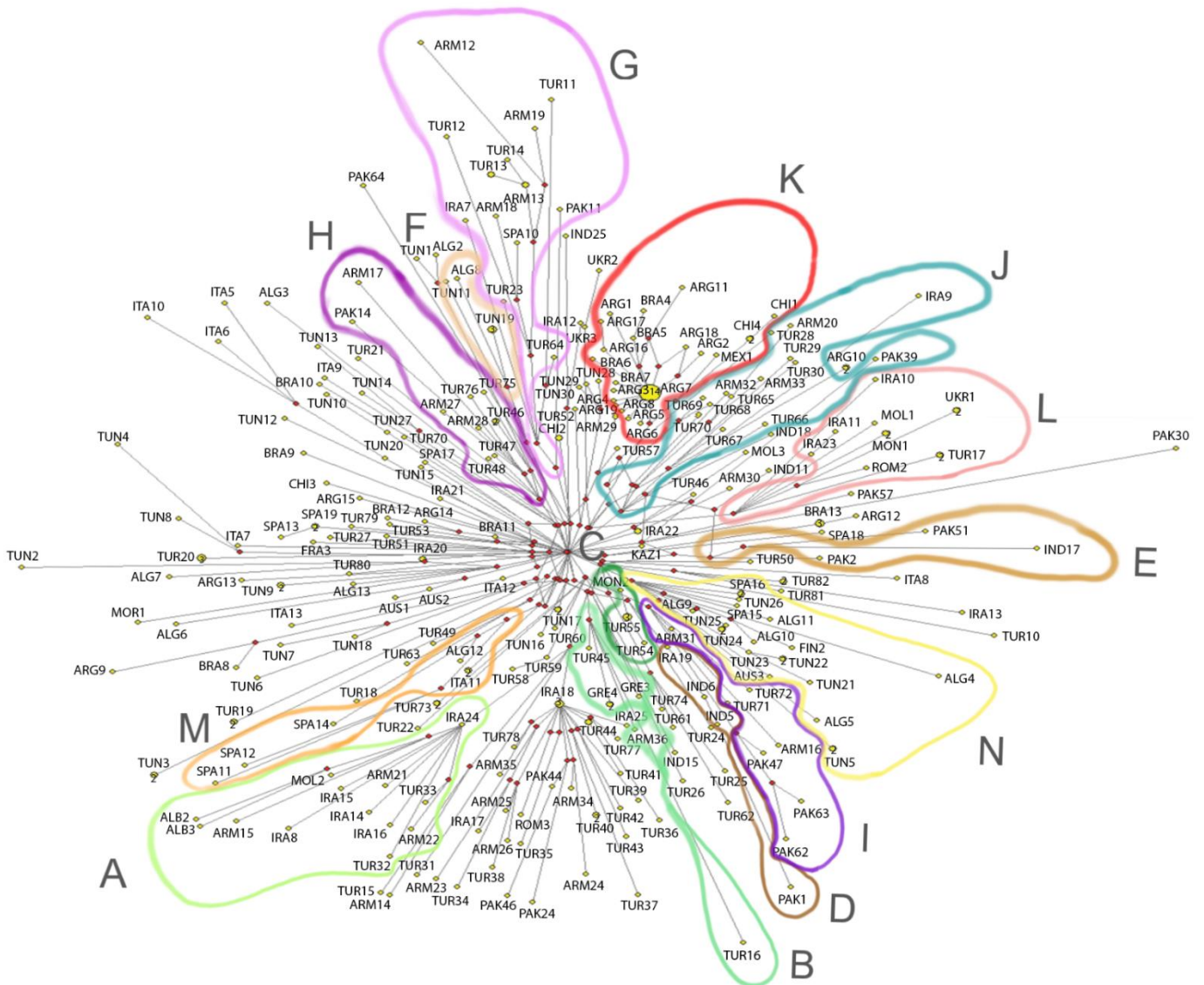
2.3.3. Genotüübi G1 fülogenees

Laiendatud andmestik sisaldas 305 mtDNA järjestust, mis olid genotüübiga G1. Kokku moodustus 256 haplotüüpi ja haplotüübi mitmekesisus oli suur ($H_d=0,9972$). Samuti moodustus 26 haplotüüpi, mis sisaldas kahte järjestust, viis haplotüüpi, mis sisaldas kolme järjestust ja üks haplotüüpi, mis sisaldas 14 järjestust. Haplotüübid moodustasid kokku 14 suuremat klaadi, milles aposterioorne tõenäosus oli suurem kui 0,90 (Joonis 5).

A haplogrupis on järjestusi viiest Riigist: Armeenia, Albaania, Iraan, Moldova ja Türgi. B haplogrupp koosneb Armeenia, Kreeka ja Türgi proovides, C haplogrupp Mongoolia ja Türgi proovidest. D grupis esineb India, Iraani ja Pakistani proove, E grupis on ainult India ja Pakistani proovid ning F haplogrupis on Tuneesia ja Alžeeria järjestused. G haplogrupp sisaldab järjestusi viiest riigist: Armeenia, Hispaania, Iraan, Pakistan ja Türgi. H ja I

haplogrupis on Armeenia, Pakistani ja Türgi proovid ning J grupis lisandub nendele riikidele veel Iraan. K haplogruppi kuuluvad Argentiina, Brasiilia, Mehhiko ja Tšiili järjestused. L haplogrupis on kõige enam riike esindatud – Iraan, Moldova, Mongoolia, Rumeenia, Türgi ja Ukraina. M haplogrupis on Alžeeria, Hispaania ja Itaalia järjestused esindatud ning N haplogrupis on Alžeeria, Austraaliast, Hispaaniast, Soomest ja Tuneesiast pärit proovid. Enamasti on haplogruppides järjestused, mis tulevad kõrvuti või lähestikku paiknevatest riikidest. Erandiks on haplogrupid G, L ja N. G haplogrupis paigutuvad Türgi, Armeenia, Pakistan ja Iraan järjestikku, kuid grupis on ka Hispaaniast proov. Hispaania paigutub Türgi poolt vaadatuna teisel pool Vahemerde. L grupis eristub Mongoolia oma asukoha poolest Ukraina, Rumeenia, Türgi, Moldova ja Iraanist, mis paiknevad Musta mere ümbruses. N haplogrupp on väga omapärane, sest Vahemere ümbritsevate riikidele (Tuneesia, Alžeeria ja Hispaania) lisanduvad proovid Austraaliast ja Soomest, mis ei paikne geograafiliselt lähestikku (Joonis 6).

Nagu eelnevalt mainitud, on haplotüüpide mitmekesisus kõrge. Nukleotiidide mitmekesisuse näitaja π on 0,00134. Neutraalsusindeksitest on Fu ja Li D testi ning Tajima D testi tulemused negatiivsed ja mõlemad on statistiliselt olulised tulemused, eriti Tajima D (FLD=-9,11980; $p < 0,02$; D=-2,78441, $p < 0,001$). Kõrge haplotüübi mitmekesisus ja madal nukleotiidide mitmekesisus viitavad kiirele ekspansioonile, mida negatiivsed neutraalsusindeksid ka kinnitavad.



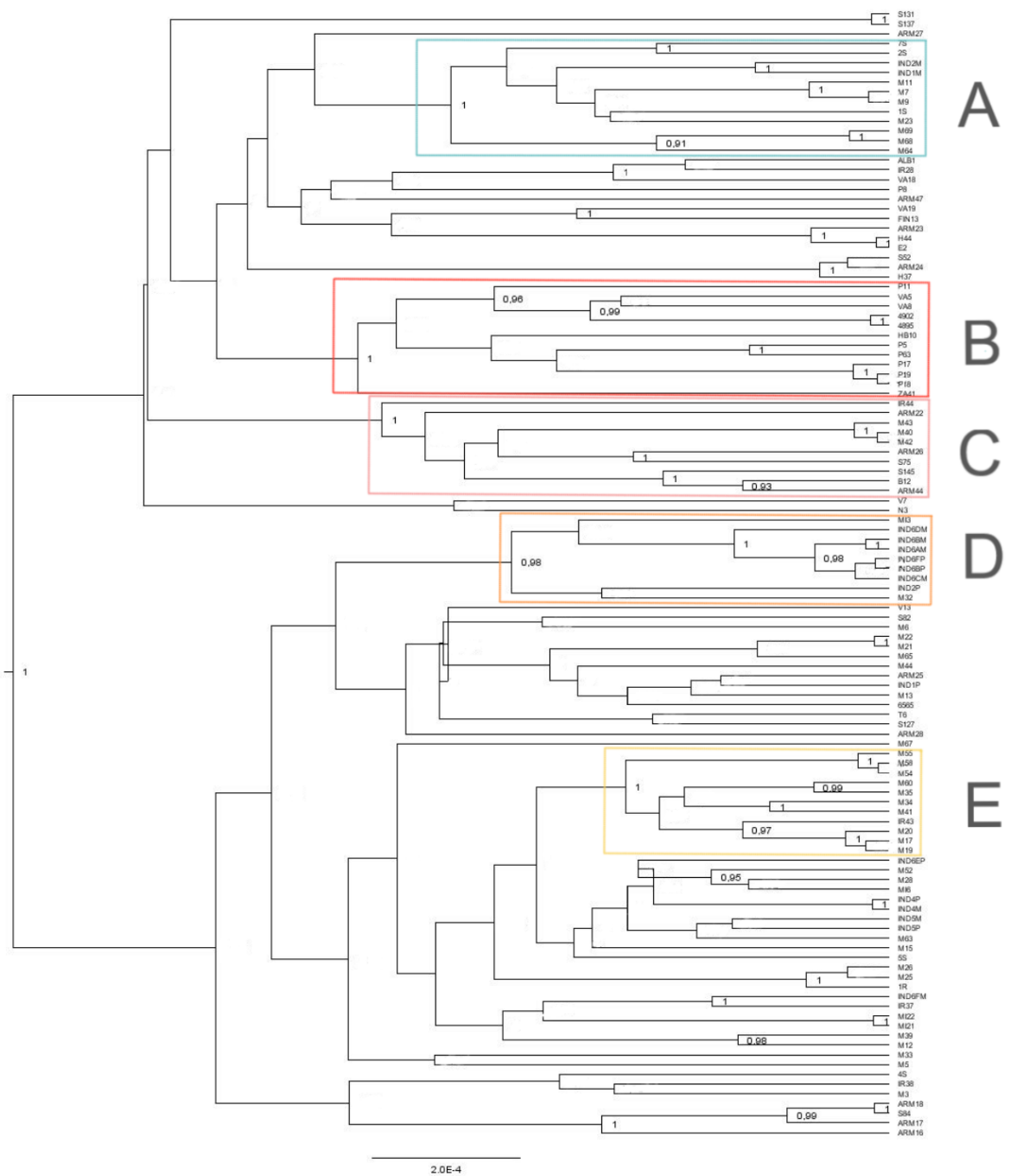
Joonis 6. *Echinococcus granulosus s.s.* genotüübi G1 (N=305) fülogeneetiline võrgustik. Kollased täpid tähistavad proove ning punased täpid tähistavad mediaanvektorite asukohti. Kollase täpi sees olev number tähistab, mitu genotüüpi ühes haplotüübis on. Kui puudub arv, siis see näitab, et tegemist on ühe genotüübiga ühes haplotüübis. Värviliselt on näidatud 14 klaadi (A-N), mille aposterioorne tõenäosus Bayesi fülogeneesipuul on >0,90.

2.3.4. Genotüübi G3 fülogenees

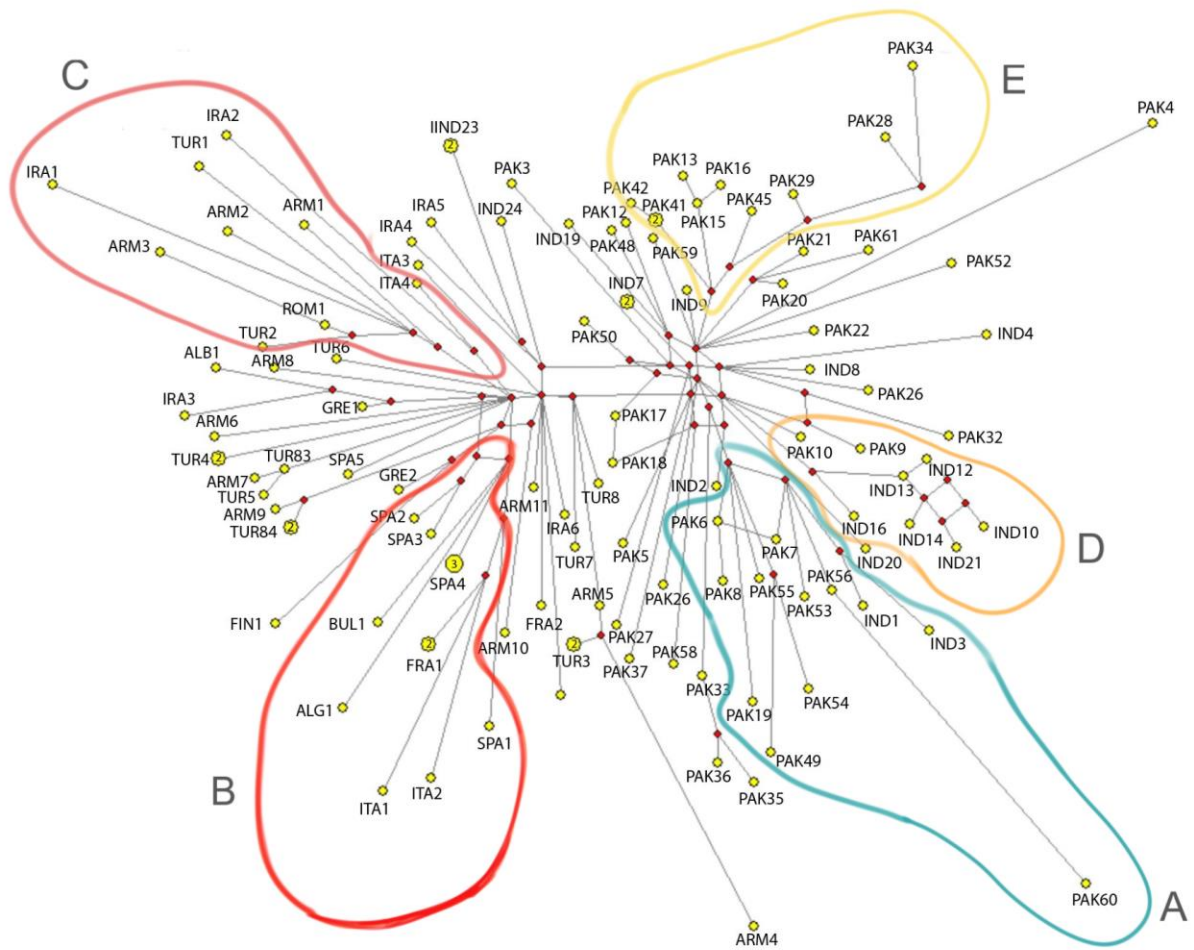
Laiendatud andmestikuga saadi kokku 116 mtDNA järjestust, mis olid G3 genotüübiga. Kokku moodustus 107 haplotüüpi, millest seitse sisaldasid kahte järjestust ja üks kolme järjestust. Haplotüübid moodustasid viis suuremat klaadi, mille aposterioorne tõenäosus oli üle 0,90 (Joonis 7).

Haplogrupp A sisaldab järjestusi, mis pärinevad Indiast ja Pakistanist. B haplogrupp sisaldab järjestusi viiest riigist, milleks on: Alžeeria, Bulgaaria, Hispaania, Itaalia ja Prantsusmaa. C haplogrupp sisaldab samuti järjestusi viiest riigist, milleks on Armeenia, Iraan, Pakistan, Rumeenia ja Türgi. D haplogrupp sisaldab proove Indiast ja Pakistanist ning E haplogrupp koosneb Iraani ja Pakistani järjestustest. Kõik moodustunud klaadid sisaldavad proove geograafiliselt lähedastest piirkondadest.

Haplotüüpide mitmekesisus on kõrge ($H_d = 0,9985$) ja nukleotiidide mitmekesisuse näitaja π on 0,00132. Neutraalsusindeksitest on F_u ja L_i D testi ning Tajima D testi tulemused taaskord negatiivsed ja mõlemad on statistiliselt olulised tulemused, eriti Tajima D ($FLD = -6,32892$; $p < 0,02$; $D = -2,71062$, $p < 0,001$). Kõrge haplotüübi mitmekesisus ja madal nukleotiidide mitmekesisus viitavad kiirele ekspansionile, mida negatiivsed neutraalsusindeksid kinnitavad.



Joonis 7. *Echinococcus granulosus* s.s. genotüübi G3 (N=116) Bayesi fülogeneetiline sugupuu. Värviliste kastidega on tähistatud viis klaadi (A-E), mille aposterioorne tõenäosus on >0,90 ja mis sisaldas viit või enamat haplotüüpi.

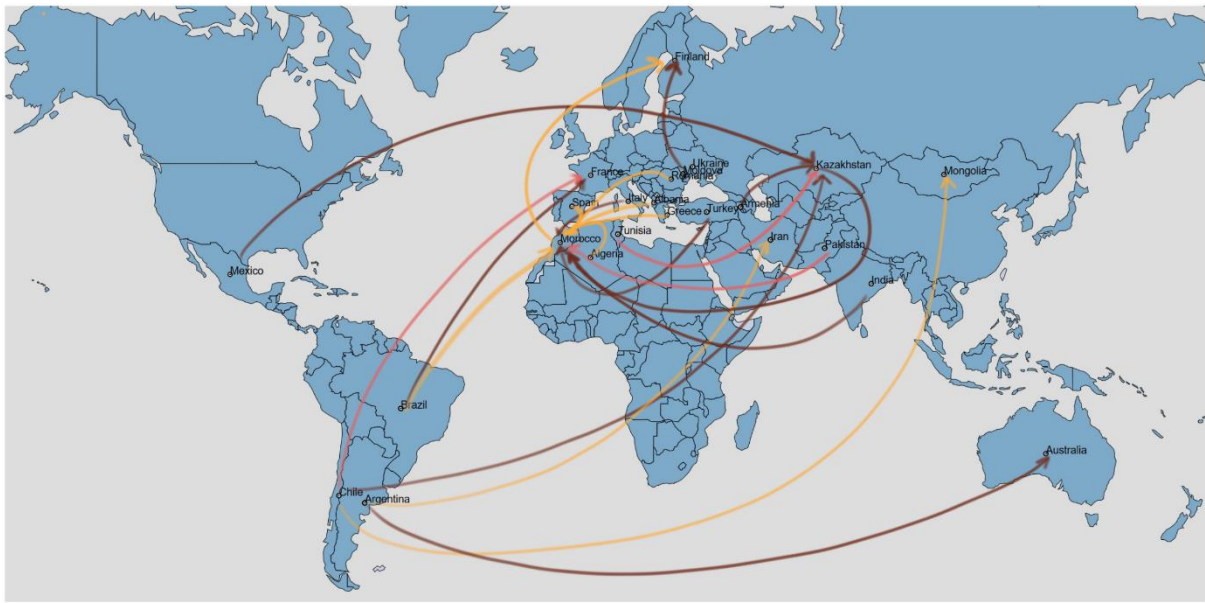


Joonis 8. *Echinococcus granulosus s.s.* genotüüpi G3 (N=116) fülogeneetiline võrgustik. Kollased täpid tähistavad proove ning punased täpid tähistavad mediaanvektorite asukohti. Kollase täpi sees olev number tähistab, mitu genotüüpi ühes haplotüübis on. Kui puudub arv, siis see näitab, et tegemist on ühe genotüübiga ühes haplotüübis. Värviliselt on näidatud 5 klaadi (A-E), mille aposterioorne tõenäosus Bayesi fülogeneesipuul on $>0,90$.

2.3.5. Genotüüpi G1 fülogeograafia

Genotüüpi G1 proovid, milles koostati Bayesi fülogeograafiline analüüs, pärinesid 24 erinevast riigist. Analüüsis tuli välja 22 levikuteed, mille Bayesi faktor oli üle kümne. Levikuteedes on kolme Bayesi faktor üle 1000 ning üheksal teel on Bayesi faktor lausa 95840 (Joonis 9). Üldiselt kehtib reegel, et kui Bayesi faktor on üle kolme, siis on levikutee oluline (Kass ja Raftery, 1995).

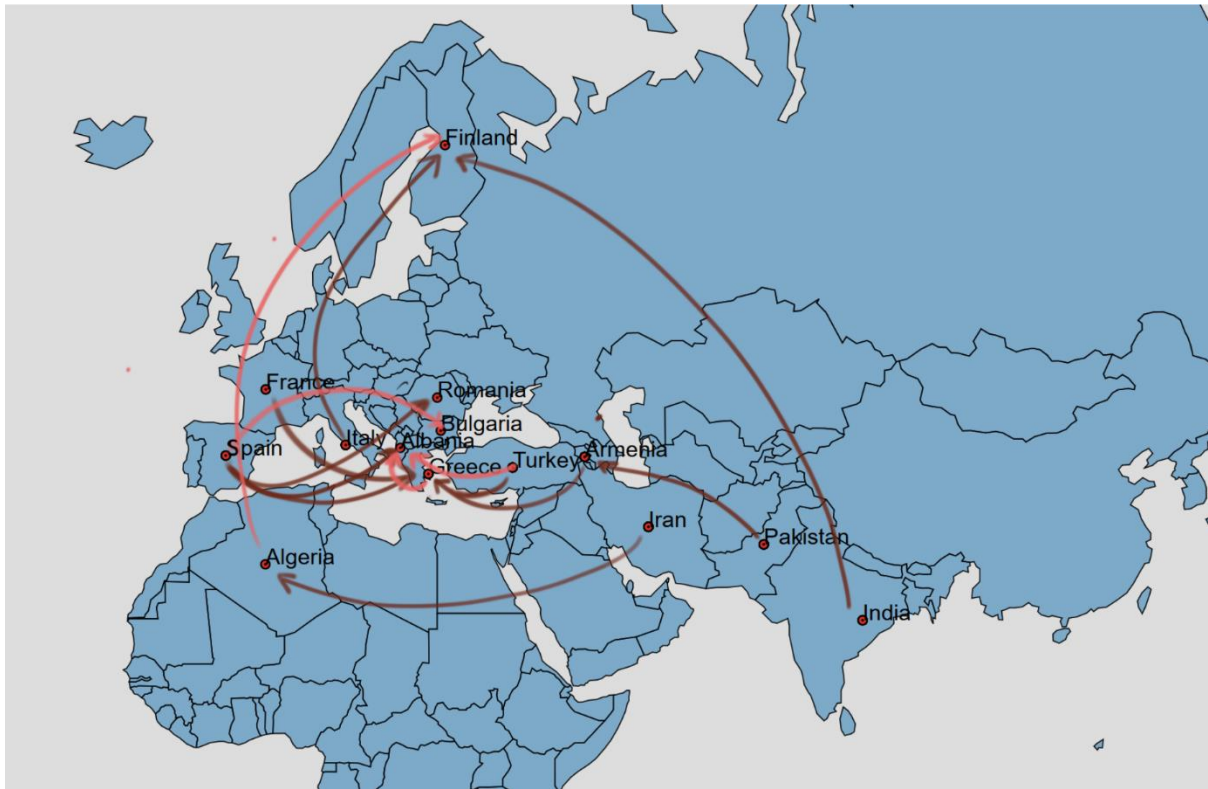
Kõige tugevamalt toetatud on teed Tšiilist Mongooliasse, Argentiinast Iraani, Brasiiliast Marokosse, Albaaniast Marokosse, Kreekast Marokosse, Alžeeriasse Marokosse, Hispaaniast Marokosse, Rumeeniast Marokosse ja Marokost Soome. G1 genotüübi puhul on levik väga laialdane ja migreerumine toimub sagedasti ka geograafiliselt kaugematesse piirkondadesse. Antud töös kasutatavate proovide puhul on kõige massilisemalt toimunud migreerumine Marokosse.



Joonis 9. Genotüüp G1 Bayesi fülogeograafilise analüüsi levikuteede kaart. Pruunid nooled tähistavad levikuteesid, mille Bayesi faktor on üle 10. Roosad nooled tähistavad levikuteesid, mille Bayesi faktor on üle 1000 ja kollased nooled tähistavad levikuteesid, mille Bayesi faktor on võrdne 95840.

2.3.6. Genotüübi G3 fülogeograafia

Genotüübi G3 proovid, millest koostati Bayesi fülogeograafiline analüüs, pärinesid 14 erinevast riigist. Analüüsist saadi 15 levikuteed, mille Bayesi faktor oli üle viie. Nelja levikutee puhul on Bayesi faktor üle 1000 (Joonis 10). Levikuteed Hispaaniast Bulgaariasse ja Türgist Albaaniasse said kõige kõrgema Bayesi faktori ($BF \approx 50811$). Samuti on kõrge Bayesi väärtusega levikuteed Kreekast Albaaniasse ($BF \approx 3382$) ja Alžeeriasse Soome ($BF \approx 1076$). Genotüübi G3 levimine toimub enamasti geograafiliselt lähedaste piirkondade vahel.



Joonis 10. Genotüüp G3 Bayesi fülogeograafilise analüüsi levikuteede kaart. Pruunid nooled tähistavad levikuteesid, mille Bayesi faktor on üle viie. Roosad nooled tähistavad levikuteesid, mille Bayesi faktor on üle 1000.

2.4. Arutelu

Antud töö eesmärgiks oli kaardistada Pakistanist, Indiast ja Ukrainast saadud parasiidiproovide genotüübid ja analüüsida nende geneetilist mitmekesisust mtDNA põhjal. See võimaldas täiendada olemasolevaid andmeid põistang-paelussi mitmekesisusest ja fülogeograafiast. Eelnevatele olemasolevatele 22 riigi proovidele lisandus proove kolmest riigist. Kuna proovid olid põhiliselt Lähis-Idast, aitasid need saada parema fülogeograafilise ülevaate Lähis-Ida piirkonna kohta. Lähis-Ida ja Aasia piirkonnast oli olemas Armeenias 37, Iraanist 29, Kasahstanist üks, Mongooliast kolm ja Indiast viis proovi, millele lisandusid Pakistanist 60 ja Indiast 22 proovi. Need tugevdasid fülogeograafia üldpilti, kus on proove veel Euroopast, Ameerikast, Aafrikast ja Austraaliast.

Mitokondriaalse DNA analüüsi põhjal on võimalik genotüüpe G1 ja G3 selgelt eristada. Genotüübid eristusid üksteisest 39 mutatsiooni võrra. Eelnevalt on teada, et *E. granulosus s.s.* genotüüp G1 on kõige suurema levikuga kõikidest genotüüpidest (nt Casulli et al., 2012; Šnábel et al., 2009) ja seda kinnitab ka käesolev töö, kus 421 uuritavast proovist umbes 72% olid G1 genotüübiga. Antud töö raames koostatud 86 uue mtDNA järjestuste hulgas oli aga see-eest üllatavalt palju G3 genotüübiga proove – umbes 71%. See võib tuleneda sellest, et maailma mõistes on G3 genotüübi osakaal kõige suurem Indias (Sharma et al., 2013). Pakistan on India naaberriik, mistõttu võib G3 osakaal ka Pakistanis suurem olla.

G1 ja G3 genotüübi levikumustrid on samuti selgelt eristatavad üksteisest. G1 genotüüp on esindatud viiel kontinendil ning migratsioon ei ole geograafiliselt piiritletud. Selline levimine, kus on ookeane ja suuri vahemaid ületatud, võivad tuleneda intensiivsest loomakaubandusest (Kinkar et al., 2016). G3 genotüübi levik võrreldes G1 genotüübiga on tunduvalt väiksem ja on geograafiliselt piiritletud. Levik toimub põhiliselt naabruses olevate või lähestikku paiknevate riikide vahel, kus migratsioon saab toimuda loomulik teel. Mõned kaugemad rännakud on tõenäoliselt seotud loomakaubandusega. Nii G1 kui ka G3 genotüübi puhul leidsid proove, mis pärinesid inimeselt. See tähendab, et tänapäeva globaalses maailmas võidi nakkus mujalt saada kui kodumaalt, mis seletab samuti *E. granulosus s.s.* suuremaid migreerumise vahemaid.

Arvatakse, et loomakaubandus sai alguse Lähis-Idast, kus kaubeldi algselt sõralistega (Yanagida et al., 2012) ning loomakaubandus on väga aktiivne olnud ka Vahemere äärsetes

piirkondades (Kinkar et al., 2016). Seda mustrit on kohati näha G1 ja G3 levimissuundades. G3 puhul on levimist põhiliselt näha Vahemere äärsetes piirkondades kui ka Lähis-Idas. G1 genotüübil on tihe levimine Vahemere äärses piirkonnas, kuid ülejäänud levimus on väga globaalne. Levimisteede põhjal saab väita, et suure tõenäosusega algas levimus Vahemere ja Lähis-Ida piirkonnast. Mõlemad genotüübid on tugevalt esindatud Vahemere äärsetes piirkondades ja G3, mis on pigem loomuliku levikuga, on Lähis-Idas tugevalt esindatud.

Antud töö põhjal näime, et G1 ja G3 genotüüpide mitmekesisus on kõrge. Huvitaval kombel on aga G1 genotüüp fülogeograafiliselt nõrgalt struktureeritud ehk samast regioonist pärinevad isolaadid on tihti geneetiliselt üksteisest kauged. Sellist fenomeni seletab samuti intensiivne loomakaubandus, sest nii suurendatakse tahtmatult ja kuntslikult geneetilist mitmekesisust. G3 genotüübi puhul täheldame vastupidist, kus genotüüp on fülogeograafiliselt hästi struktureeritud. Geograafiliselt lähedased isolaadid on ka suuremalt jaolt geneetiliselt lähedased. Selle põhjal saab järeldada, et G1 genotüüp on loomakaubanduse tõttu geograafiliselt segunenud, kuid G3 genotüübi fülogeograafiline jaotus tuleneb pigem looduslikust levikust.

Peremehe eelistuste põhjal on G1 genotüübil rohkem erinevaid liike, mida suudab nakatada kui G3 genotüüp. Seda täheldati ka siin töös, kus G1 genotüübi puhul oli 8 ja G3 genotüübil 6 erinevat peremeest. G1 genotüübi peamiseks vaheperemeheks on lambad, aga ka veised, sead, kaamelid, kitsed ja kangurud on sagedase vaheperemehed (Thompson ja McManus, 2002). Antud töös oli enim vaheperemeestest lambad esindatud (N=144). Teised vaheperemehed olid aga samuti arvukalt esindatud. Nendeks olid veised (N=97), inimesed (N=39), kitsed (N=9), pühvlid (N=7), sead (N=5) ja metssiga (N=1). Andmetes oli ka kolm proovi lõpp-peremehelt, kelleks oli siin dingo. G3 genotüübi peamiseks vaheperemeesteks peetakse veiseid ja pühvleid, aga ka kitsed lambad ja sead võivad vaheperemehed olla (Calderini et al., 2012; Maillard et al., 2009; Thompson, 2008). Seda kinnitavad ka siinsed andmed, kus peamiseks peremeesteks olid veised (N=44), seejärel lambad (N=31), pühvlid (N=20), kitsed (N=6), kaamelid (4) ja ka inimesed (11). See näitab kui lai peremeeste valik on nii G1 ja G3 genotüübil, mis suurendab samuti levikuvõimalusi.

Echinococcus granulosus s.s. genotüüpidest põhjustab ehhinokokoosi enim G1 genotüüp. Seetõttu arvatakse ka, et G1 ja G3 nakatumisvõime erineb (Alvarez Rojas et al., 2014). Käesoleva töö andmed näitavad samuti, et G1 nakatab rohkem inimesi kui G3. G1 genotüüpi

esines 39 inimesel ja G3 genotüüp üheteistkümmel inimesel. Need tulemused kinnitavad, et nakatumisvõime võib genotüübiti erineda, mistõttu on oluline erinevaid genotüüpe eristada ja määrata.

KOKKUVÕTE

Põistang-paeluss *Echinococcus granulosus s.s.* on globaalse levikuga väike parasiidist paeluss. Paelussi elutsükel põhineb saakloom-kiskja suhtel, kus vaheperemeesteks on enamasti sõralised ja närilised, lõpp-peremeesteks koerlased. Parasiit põhjustab nakatumise korral tsüstilist ehhinokokoosi, mis on ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsiooni poolt kategoriseeritud teiseks kõige enam toiduga levivaks haiguseks. Tegemist on suure rahvatervise probleemiga, mistõttu on oluline *E. granulosus* mitmekesisust ja levikut uurida.

Antud töö kirjeldab peamiselt *Echinococcus granulosus s.s.* G1 ja G3 genotüüpe. Töös analüüsiti 86 parasiidiproovi, mis pärinesid Pakistanist, Indiast ja Ukrainast. Kokku sekveneeriti 86 uut peaaegu täielikku mtDNA järjestust (11549 aluspaari), millest 61 olid G3 ja 25 G1 genotüübiga. Andmekogu täiendati eelnevalt sekveneeritud 280 G1 genotüübi ja 55 G3 genotüübi homoloogiliste mtDNA järjestustega, millega koos teostati fülogeneetiline ja fülogeograafiline analüüs.

Autori poolt sekveneeritud 86 mtDNA järjestuse puhul oli valdav enamus (71%) G3 genotüübiga. See võib tuleneda sellest, et enamik proove oli pärit Pakistanist, mis asub Indias naabruses, kus on kõige suurem G3 genotüübi osakaal. Genotüübid eristusid üksteisest selgelt, välja arvatud üks proov, millel oli nii G1 kui ka G3 iseloomulikke mutatsioone. Kogu andmestiku fülogeneetiline uuring kinnitab, et G1 ja G3 genotüübid on üksteisest selgelt eristatavad. Samuti kinnitavad andmed, et G1 on suurema levikuga kui G3 genotüüp. Lisaks sellele on genotüüpide mitmekesisus kõrge ja nukleotiidide mitmekesisus madal, mis viitab kiirele ekspansioonile.

Fülogeograafiline analüüs näitab G1 globaalset levimust, kus parasiiti leidub viiel kontinendil ning levimine on toimunud geograafiliselt kaugetes paikadesse. Olulisi migratsioonisuundi oli G1 genotüübil üheksa, millest kuus suundusid Marokosse. Liikumine Marokosse toimus Brasiiliast, Alžeerias, Kreekast, Albaaniast, Rumeeniast ja Hispaaniast. Samuti olid olulised levikusuunad veel Marokost Soome, Tšiilist Mongooliasse ja Argentiinast Iraani. G3 genotüübi puhul oli olulisi migratsioonisuundi neli, milleks olid Türgist Albaaniasse, Kreekast Albaaniasse, Hispaaniast Bulgaariasse ja Alžeerias Soome. Üldiselt on G3 genotüübi levimus pigem lokaalne ja geograafiliselt piiritletud. Andmete põhjal saab väita, et G1 leviku lähtepunkt võis olla Vahemere piirkond ja G3 genotüübil rohkem Lähis-Ida või India. Genotüübi G1

levikut on mõjutanud suure tõenäosusega kõige enam loomakaubandus, kuid G3 on valdavalt loodusliku levikuga.

SUMMARY

Echinococcus granulosus sensu stricto is a small parasitic worm that is globally distributed. The tapeworm's lifecycle is based on a prey-predator relationship, where the intermediate hosts are usually ungulates or rodents, and the definite hosts are canids. The Food and Agriculture Organization of the United Nations categorizes echinococcosis as the second most common food-borne disease. Due to its wide spread and impact on a carrier, echinococcosis is considered a severe healthcare issue that is transmitted through an infection by the parasitic worm *E. granulosus*. Therefore, it is important to research the diversity of the species *E. granulosus* and its distribution.

This master's thesis gives an overview about the tapeworm *Echinococcus granulosus s.s.* and its genotypes G1 and G3. 86 parasitic samples from Pakistan, India, and Ukraine were analysed for this thesis. Altogether, 86 nearly complete mtDNA sequences were sequenced (11 549 bp), of which 61 were with the genotype G3, and 25 G1. These samples were compiled into a database. 280 sequenced genotype G1, and 55 genotype G3 sequences were added to the aforementioned database. Phylogenetic and phylogeographic studies were conducted for the additional group of 86 together with the 335 samples.

The majority (71%) of the 86 mtDNA sequences conducted by the author were with the genotype G3. This may have resulted from the overall global representation of the G3 genotype, because India has the largest percentage of G3 per capita in the whole world and the bulk of the samples came from Pakistan, which borders India. Overall, all genotypes were distinguishable, except for one sample, which contained characteristic mutations from G1 and G3 genotypes. The phylogenetic analysis of the increased database confirmed that G1 and G3 genotypes are clearly distinguishable. The results also confirm that G1 is more widely represented in the world than G3. In addition to that, the genotype diversity is high, and the nucleotide diversity is low, which indicate a fast expansion.

The phylogeographical analysis shows that G1 is globally distributed, which means that it is present in five continents, and it has spread to geographically distant regions. The G1 genotype had nine important migration directions of which six were headed to Morocco. The journey to Morocco started from Brazil, Algeria, Greece, Albania, Romania, and Spain. Important migration directions were also the paths from Morocco to Finland, Chile to Mongolia, and

Argentina to Iran. The genotype G3 had four important migration directions, which were from Turkey to Albania, Greece to Albania, Spain to Bulgaria, and Algeria to Finland. Altogether the G3 genotype's distribution is more local and geographically limited. Based on the results of this thesis, it is possible to hypothesize that the origin of the spread of the G1 genotype is in the Mediterranean region, and the origin of G3 is in the Middle East or India. It is highly likely that the spread of the G1 genotype has been influenced by animal trade, in contrast to G3, which has mainly spread through natural distribution.

KASUTATUD ALLIKAD

- Addy, F., Wassermann, M., Kagendo, D., Ebi, D., Zeyhle, E., Elmahdi, I. E., et al. (2017). Genetic differentiation of the G6/7 cluster of *Echinococcus canadensis* based on mitochondrial marker genes. *Int. J. Parasitol.* 47, 923–931. doi:10.1016/j.ijpara.2017.06.003.
- Alvarez Rojas, C. A., Romig, T., and Lightowers, M. W. (2014). *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. *Int. J. Parasitol.* 44, 9–18. doi:10.1016/j.ijpara.2013.08.008.
- Ammann, R. W., and Eckert, J. (1996). CESTODES. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 25, 655–689. doi:10.1016/S0889-8553(05)70268-5.
- Bielejec, F., Baele, G., Vrancken, B., Suchard, M. A., Rambaut, A., and Lemey, P. (2016). Spread3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2167–2169. doi:10.1093/molbev/msw082.
- Bowles, J., Blair, D., and McManus, D. P. (1992). Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 165–173. doi:10.1016/0166-6851(92)90109-W.
- Bowles, J., and Mcmanus, D. P. (1993). NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.* 23, 969–972. doi:10.1016/0020-7519(93)90065-7.
- Brunetti, E., Kern, P., and Vuitton, D. A. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 114, 1–16. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.001.
- Calderini, P., Gabrielli, S., and Cancrini, G. (2012). Is the goat a new host for the G3 Indian buffalo strain of *Echinococcus granulosus*? *Sci. World J.* 2012, 1–6. doi:10.1100/2012/286357.
- Casulli, A., Interisano, M., Sreter, T., Chitimia, L., Kirkova, Z., La Rosa, G., et al. (2012). Genetic variability of *Echinococcus granulosus* sensu stricto in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infect. Genet. Evol.* 12, 377–383. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.014.
- Chaâbane-Banaoues, R., Oudni-M'rad, M., Cabaret, J., M'rad, S., Mezhoud, H., and Babba, H. (2015). Infection of dogs with *Echinococcus granulosus*: causes and consequences in an hyperendemic area. *Parasit. Vectors* 8, 231. doi:10.1186/s13071-015-0832-3.
- Drummond, A. J., and Bouckaert, R. R. (2015). *Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST*. Cambridge: Cambridge University Press doi:10.1017/CBO9781139095112.

- Drummond, A. J., and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 1–8. doi:10.1186/1471-2148-7-214.
- Eckert, J., and Deplazes, P. (2004). Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 107–135. doi:10.1128/CMR.17.1.107-135.2004.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, and World Health Organization (2014). *Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Food-Borne Parasites. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23*, Rome, 302, pp. XVI. Available at: <http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/>.
- Galindo, M., Gonzalez, M. J., and Galanti, N. (2002). Echinococcus granulosus protoscolex formation in natural infections. *Biol. Res.* 35. doi:10.4067/S0716-97602002000300011.
- Griffiths, R. C., and Tavaré, S. (1994). Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 344, 403–410. doi:10.1098/rstb.1994.0079.
- Gu, X., Fu, Y.-X., and Li, W.-H. (1995). Maximum likelihood estimation of the heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol. Biol. Evol.* 12, 546–557. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040235.
- Horton, R. J. (1997). Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta Trop.* 64, 79–93. doi:10.1016/S0001-706X(96)00640-7.
- Hüttner, M., Nakao, M., Wassermann, T., Siefert, L., Boomker, J. D. F., Dinkel, A., et al. (2008). Genetic characterization and phylogenetic position of Echinococcus felidis Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int. J. Parasitol.* 38, 861–868. doi:10.1016/j.ijpara.2007.10.013.
- Kass, R. E., and Raftery, A. E. (1995). Bayes Factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 90, 773. doi:10.2307/2291091.
- Kedra, A. H., Swiderski, Z., Tkach, V. V., Dubinsky, P., Pawlowski, Z., Stefaniak, J., et al. (1999). Genetic analysis of Echinococcus granulosus from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitol.* 44, 248–254.
- Kinkar, L., Korhonen, P. K., Cai, H., Gauci, C. G., Lightowers, M. W., Saarma, U., et al. (2019). Long - read sequencing reveals a 4 . 4 kb tandem repeat region in the mitogenome of Echinococcus granulosus (sensu stricto) genotype G1. *Parasit. Vectors*, 1–7. doi:10.1186/s13071-019-3492-x.

- Kinkar, L., Laurimäe, T., Acosta-jamett, G., Andresiuk, V., Balkaya, I., Casulli, A., et al. (2018a). Global phylogeography and genetic diversity of the zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1 q. *Int. J. Parasitol.* 48, 729–742. doi:10.1016/j.ijpara.2018.03.006.
- Kinkar, L., Laurimäe, T., Acosta-jamett, G., Andresiuk, V., Balkaya, I., Casulli, A., et al. (2018b). Infection , Genetics and Evolution Distinguishing *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotypes G1 and G3 with confidence : A practical guide. 64, 178–184. doi:10.1016/j.meegid.2018.06.026.
- Kinkar, L., Laurimäe, T., Balkaya, I., Casulli, A., Zait, H., Irshadullah, M., et al. (2018c). Genetic diversity and phylogeography of the elusive , but epidemiologically important *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G3.
- Kinkar, L., Laurimäe, T., Sharbatkhori, M., Mirhendi, H., Beigom, E., Ponce-gordo, F., et al. (2017). Infection , Genetics and Evolution New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. *Infect. Genet. Evol.* 52, 52–58. doi:10.1016/j.meegid.2017.04.023.
- Kinkar, L., Laurimäe, T., Simsek, S., Balkaya, I., Casulli, A., Manfredi, M. T., et al. (2016). High-resolution phylogeography of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1 with an emphasis on its distribution in Turkey, Italy and Spain. *Parasitology* 143, 1790–1801. doi:10.1017/S0031182016001530.
- Laurimäe, T., Kinkar, L., Moks, E., Romig, T., Omer, R. A., Casulli, A., et al. (2018a). Molecular phylogeny based on six nuclear genes suggests that *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6/G7 and G8/G10 can be regarded as two distinct species. *Parasitology* 145, 1929–1937. doi:10.1017/S0031182018000719.
- Laurimäe, T., Kinkar, L., Romig, T., Omer, R. A., Casulli, A., Umhang, G., et al. (2018b). Infection , Genetics and Evolution The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: Deep insights into the phylogeny and population structure of *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6 and G7. 64, 85–94. doi:10.1016/j.meegid.2018.06.016.
- Maillard, S., Gottstein, B., Haag, K. L., Ma, S., Colovic, I., Benchikh-Elfegoun, M. C., et al. (2009). The EmsB tandemly repeated multilocus microsatellite: A new tool to investigate genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3608–3616. doi:10.1128/JCM.00938-09.
- McManus, D. P., Gray, D. J., Zhang, W., and Yang, Y. (2012). Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *BMJ* 344, e3866–e3866. doi:10.1136/bmj.e3866.
- Menghi, C., Gatta, C., and Arias, L. (2017). Human Cystic and Alveolar Echinococcosis. *Curr. Treat. Options Infect. Dis.* 9, 210–222. doi:10.1007/s40506-017-0121-0.

- Moro, P., and Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis : a review. *Int. J. Infect. Dis.*, 125—133. doi:10.1016/j.ijid.2008.03.037.
- Nakao, M., Lavikainen, A., Iwaki, T., Haukisalml, V., and Konyaev, S. (2013). Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda : Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck , 1816 and the creation of a new genus *Versteria* q. *Int. J. Parasitol.* 43, 427–437. doi:10.1016/j.ijpara.2012.11.014.
- Nunnari, G., Pinzone, M. R., Gruttadauria, S., Celesia, B. M., Madeddu, G., Malaguarnera, G., et al. (2012). Hepatic echinococcosis: Clinical and therapeutic aspects. *World J. Gastroenterol.* 18, 1448–1458. doi:10.3748/wjg.v18.i13.1448.
- Pärn, M., 2019. Põistang-paelussi *Echinococcus granulosus sensu stricto* geneetilise mitmekesisuse Armeenias ja Türgis ning fülogeneetilise seose teiste piirkondadega. Tartu Ülikool.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., and Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904. doi:10.1093/sysbio/syy032.
- Reuter, S., Jensen, B., Buttenschoen, K., Kratzer, W., and Kern, P. (2000). Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: A comparative study and review of the literature. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 451–456. doi:10.1093/jac/46.3.451.
- Romig, T., Deplazes, P., Jenkins, D., Giraudoux, P., Massolo, A., Craig, P. S., et al. (2017). “Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species,” in *Advances in Parasitology* (Elsevier Ltd), 213–314. doi:10.1016/bs.apar.2016.11.002.
- Rozas, Julio. 2009. „DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DnaSP“. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 537: 337–50. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_17.
- Saarma, U., Jõgisalu, I., Moks, E., Varcasia, A., Lavikainen, A., Oksanen, A., et al. (2009). A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* 136, 317–328. doi:10.1017/S0031182008005453.
- Sharma, M., Fomda, B. A., Mazta, S., Sehgal, R., Singh, B. B., and Malla, N. (2013). Genetic diversity and population genetic structure analysis of *Echinococcus granulosus sensu stricto* complex based on mitochondrial DNA signature. *PLoS One* 8, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0082904.
- Šnábel, V., Altintas, N., D’Amelio, S., Nakao, M., Romig, T., Yolasmaz, A., et al. (2009). Cystic echinococcosis in Turkey: Genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitol. Res.* 105, 145–154. doi:10.1007/s00436-009-1376-2.

- Spotin, A., Boufana, B., Ahmadpour, E., Casulli, A., Mahami-Oskouei, M., Rouhani, S., et al. (2018). Assessment of the global pattern of genetic diversity in *Echinococcus multilocularis* inferred by mitochondrial DNA sequences. *Vet. Parasitol.* 262, 30–41. doi:10.1016/j.vetpar.2018.09.013.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., and Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol.* 4, 1–5. doi:10.1093/ve/vey016.
- Tagliacozzo, S., Miccini, M., Bonapasta, S. A., Gregori, M., and Tocchi, A. (2011). Surgical treatment of hydatid disease of the liver: 25 years of experience. *Am. J. Surg.* 201, 797–804. doi:10.1016/j.amjsurg.2010.02.011.
- Thompson, R. C. A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Exp. Parasitol.* 119, 439–446. doi:10.1016/j.exppara.2008.04.016.
- Thompson, R. C. A. (2017). “Biology and Systematics of *Echinococcus*,” in, eds. R. C. A. Thompson, P. Deplazes, and J. Lymbery (Academic Press), 65–109. doi:10.1016/bs.apar.2016.07.001.
- Thompson, R. C. A., and Jenkins, D. J. (2014). *Echinococcus* as a model system: Biology and epidemiology. *Int. J. Parasitol.* 44, 865–877. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.005.
- Thompson, R. C. A., and McManus, D. P. (2002). Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trends Parasitol.* 18, 452–457. doi:10.1016/S1471-4922(02)02358-9.
- World Health Organization, 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, pp. 95–99.
- Yanagida, T., Mohammadzadeh, T., Kamhawi, S., Nakao, M., Mahmoud, S., Hijjawi, N., et al. (2012). Parasitology International Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East ☆. *Parasitol. Int.* 61, 599–603. doi:10.1016/j.parint.2012.05.014.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

https://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/modules/Echinococcus_gran_LifeCycle_lg.jpg – vaadatud ja kasutatud 18.04.2021, joonis 1.

https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/health_professionals/index.html#tx – vaadatud ja kasutatud 03.05.2021.

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch – vaadatud ja kasutatud 16.04.2021

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/> – vaadatud ja kasutatud 05.05.2021

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> - vaadatud ja kasutatud 19.05.2021

http://beast.community/workshop_discrete_diffusion – vaadatud ja kasutatud 25.05.2021

LISA 1

Antud töös sekveneeritud Pakistanist, Indiast ja Ukrainast 86 järjestuse lisainformatsioon.

Haplotüüp	Laborikood	Tsüsti tüüp	Organ	Loom	Sugu	Vanus (aasta)	Piirkond
PAK1	M1	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2	Pakistan, Multan
PAK2	M2	hüdatiivne	kopsud	kits	emane	1	Pakistan, Multan
PAK3	M3	hüdatiivne	kopsud	kits	emane	1	Pakistan, Multan
PAK4	M5	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK5	M6	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	4	Pakistan, Multan
PAK6	M7	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	6	Pakistan, Multan
PAK7	M9	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	5	Pakistan, Multan
PAK8	M11	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2,5	Pakistan, Multan
PAK9	M12	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	3	Pakistan, Multan
PAK10	M13	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	4	Pakistan, Multan
PAK11	M14	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	7	Pakistan, Multan
PAK12	M15	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2	Pakistan, Multan
PAK13	M17	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	4	Pakistan, Multan
PAK14	M18	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2,5	Pakistan, Multan
PAK15	M19	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	3	Pakistan, Multan
PAK16	M20	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	3,5	Pakistan, Multan
PAK17	M21	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	5	Pakistan, Multan
PAK18	M22	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2	Pakistan, Multan
PAK19	M23	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	8	Pakistan, Multan
PAK20	M25	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK21	M26	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2	Pakistan, Multan
PAK22	M28	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	5,5	Pakistan, Multan
PAK24	M30	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2,5	Pakistan, Multan
PAK25	M31	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK26	M32	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2	Pakistan, Multan
PAK27	M33	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3,5	Pakistan, Multan
PAK28	M34	hüdatiivne	maks	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK30	M36	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	6,5	Pakistan, Multan
PAK32	M39	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	7	Pakistan, Multan
PAK33	M40	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2,5	Pakistan, Multan
PAK34	M41	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	3	Pakistan, Multan
PAK35	M42	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	6	Pakistan, Multan
PAK36	M43	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	1,5	Pakistan, Multan
PAK37	M44	hüdatiivne	maks	veis	isane	3,5	Pakistan, Multan
PAK39	M49	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2	Pakistan, Multan
PAK40	M52	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK41	M54	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2	Pakistan, Multan
PAK42	M55	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3,5	Pakistan, Multan

PAK41	M58	hüdatiivne	maks	veis	emane	3	Pakistan, Multan
PAK44	M59	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	6	Pakistan, Multan
PAK45	M60	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	1,5	Pakistan, Multan
PAK46	M61	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	3,5	Pakistan, Multan
PAK47	M62	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	3	Pakistan, Multan
PAK48	M63	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	2,5	Pakistan, Multan
PAK49	M64	hüdatiivne	maks	veis	emane	4	Pakistan, Multan
PAK50	M65	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2,5	Pakistan, Multan
PAK51	M66	hüdatiivne	kopsud	veis	isane	2	Pakistan, Multan
PAK52	M67	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	1,5	Pakistan, Multan
PAK53	M68	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	9	Pakistan, Multan
PAK54	M69	hüdatiivne	kopsud	veis	emane	4	Pakistan, Multan
PAK55	1S	fertiilne	kopsud	kits	isane	3	Pakistan, Swat
PAK56	2S	lubjastunud	kopsud	kits	emane	2	Pakistan, Swat
PAK57	3S	fertiilne	kopsud	lammas	emane	2	Pakistan, Swat
PAK58	4S	lubjastunud	kopsud	kits	emane	1	Pakistan, Swat
PAK59	5S	infertiilne	kopsud	kits	isane	2	Pakistan, Swat
PAK60	7S	lubjastunud	maks	kits	isane	3	Pakistan, Swat
PAK61	1R	küps	maks	lammas	isane	2 kuni 4	Pakistan, Rawalakot
PAK62	2R	küps	maks	veis	isane	üle 4	Pakistan, Rawalakot
PAK63	5R	küps	maks	veis	emane	1 kuni 2	Pakistan, Rawalakot
PAK64	7R	ebaküps	maks	veis	emane	2 kuni 5	Pakistan, Rawalakot
UKR1	UKR4	NA	NA	kits	NA	NA	Ukraina, Poltava
UKR1	UKR5	NA	NA	kits	NA	NA	Ukraina, Poltava
UKR2	UKR7	NA	kopsud	sig	NA	NA	Ukraina, Kiiev
UKR3	UKR8	NA	kopsud	sig	NA	NA	Ukraina, Kiiev
IND1	IND 1M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND2	IND 1P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND3	IND 2M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND4	IND 2P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND5	IND 3M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND6	IND 3P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND7	IND 4M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND7	IND 4P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND8	IND 5M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND9	IND 5P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND10	IND 6A M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND11	IND 6A P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND12	IND 6B M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND13	IND 6B P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND14	IND 6C M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND15	IND 6C P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND16	IND 6D M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND17	IND 6D P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India

IND18	IND 6E M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND19	IND 6E P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND20	IND 6F M	NA	maks	pühvel	NA	NA	India
IND21	IND 6F P	NA	maks	pühvel	NA	NA	India

NA – andmed teadmata

LISA 2

Laiendatud andmekogumi proovid (N=421).

Genotüüp G1

Haplotüüp	Laborikood	Loom	Riik
PAK1	M1	veis	Pakistan
PAK2	M2	kits	Pakistan
PAK11	M14	veis	Pakistan
PAK14	M18	veis	Pakistan
PAK24	M30	veis	Pakistan
PAK30	M36	veis	Pakistan
PAK39	M49	veis	Pakistan
PAK44	M59	veis	Pakistan
PAK46	M61	veis	Pakistan
PAK47	M62	veis	Pakistan
PAK51	M66	veis	Pakistan
PAK57	3S	lammas	Pakistan
PAK62	2R	veis	Pakistan
PAK63	5R	veis	Pakistan
PAK64	7R	veis	Pakistan
UKR1	UKR4	kits	Ukraina
UKR1	UKR5	kits	Ukraina
UKR2	UKR7	sig	Ukraina
UKR3	UKR8	sig	Ukraina
IND5	IND 3M	pühvel	India
IND6	IND 3P	pühvel	India
IND11	IND 6A P	pühvel	India
IND15	IND 6C P	pühvel	India
IND17	IND 6D P	pühvel	India
IND18	IND 6E M	pühvel	India
IND25	MI2	pühvel	India
MEX1	8G	sig	Mehhiko
ARG1	A42	veis	Argentiina
ARG2	A17	lammas	Argentiina

ARG3	A43	veis	Argentiina
ARG4	A40	veis	Argentiina
ARG5	A21	lammas	Argentiina
ARG6	A19	lammas	Argentiina
ARG7	A1	veis	Argentiina
ARG7	A23	lammas	Argentiina
ARG7	A24	lammas	Argentiina
ARG7	A29	lammas	Argentiina
ARG7	A30	lammas	Argentiina
ARG7	A37	veis	Argentiina
ARG7	A47	lammas	Argentiina
ARG7	A50	lammas	Argentiina
ARG7	A52	lammas	Argentiina
ARG7	A53	lammas	Argentiina
ARG7	A54	lammas	Argentiina
ARG7	A55	lammas	Argentiina
ARG7	H433	veis	Brasiilia
ARG7	P68	veis	Argentiina
ARG8	A2	veis	Argentiina
ARG9	SO212	lammas	Argentiina
ARG10	A35	veis	Argentiina
ARG10	H567	veis	Brasiilia
ARG11	P69	veis	Argentiina
ARG12	A57	lammas	Argentiina
ARG13	A41	veis	Argentiina
ARG14	A10	sig	Argentiina
ARG15	A13	veis	Argentiina
CHI1	TS15	veis	Tšiili
CHI2	TS6	veis	Tšiili
CHI2	TS14	veis	Tšiili
CHI3	TS16	veis	Tšiili
CHI4	TS12	veis	Tšiili
CHI4	TS18	veis	Tšiili
BRA4	H440	veis	Brasiilia
BRA5	H442	veis	Brasiilia
BRA6	H439	veis	Brasiilia
BRA7	H574	veis	Brasiilia
BRA8	H369	veis	Brasiilia
BRA9	H172	veis	Brasiilia
BRA10	H575	veis	Brasiilia
BRA11	H404	veis	Brasiilia
BRA12	H424	veis	Brasiilia
BRA13	H408	veis	Brasiilia
BRA13	H429	veis	Brasiilia
BRA13	H585	veis	Brasiilia
ARG16	P66	veis	Argentiina
ARG17	P67	veis	Argentiina
ARG18	P76	lammas	Argentiina

ARG19	P70	lammas	Argentiina
SPA10	2G	inimene	Hispaania
SPA11	P2	lammas	Hispaania
SPA12	P16	lammas	Hispaania
SPA13	P52	kits	Hispaania
SPA14	12G	metssiga	Hispaania
SPA15	P21	lammas	Hispaania
SPA16	P3	lammas	Hispaania
SPA16	P4	lammas	Hispaania
SPA17	P15	lammas	Hispaania
SPA18	P47	sig	Hispaania
SPA19	P51	kits	Hispaania
SPA19	P53	kits	Hispaania
SPA20	P61	inimene	Hispaania
TUR10	S83	veis	Türgi
TUR11	S69	veis	Türgi
TUR12	S119	lammas	Türgi
TUR13	E4	veis	Türgi
TUR13	H46	lammas	Türgi
TUR14	S31	veis	Türgi
TUR15	S112	lammas	Türgi
TUR16	S149	veis	Türgi
TUR17	H11	lammas	Türgi
TUR17	H56	lammas	Türgi
TUR18	S121	lammas	Türgi
TUR19	H42	lammas	Türgi
TUR19	H47	lammas	Türgi
TUR20	S9	lammas	Türgi
TUR20	S15	lammas	Türgi
TUR20	S16	lammas	Türgi
TUR21	H38	veis	Türgi
TUR22	S2	lammas	Türgi
TUR23	S13	lammas	Türgi
TUR24	H9	veis	Türgi
TUR25	H43	lammas	Türgi
TUR26	T1	inimene	Türgi
TUR27	H55	lammas	Türgi
TUR28	S30	veis	Türgi
TUR29	S104	veis	Türgi
TUR30	S107	lammas	Türgi
TUR31	H15	veis	Türgi
TUR32	H14	veis	Türgi
TUR33	S142	lammas	Türgi
TUR34	S33	veis	Türgi
TUR35	S141	lammas	Türgi
TUR36	S124	lammas	Türgi
TUR37	S77	veis	Türgi
TUR38	S135	lammas	Türgi

TUR39	H60	lammas	Türgi
TUR40	H25	lammas	Türgi
TUR40	H59	lammas	Türgi
TUR41	S144	lammas	Türgi
TUR42	S53	veis	Türgi
TUR43	S154	lammas	Türgi
TUR44	S99	veis	Türgi
TUR44	S120	lammas	Türgi
TUR45	S14	lammas	Türgi
TUR46	H24	veis	Türgi
TUR46	H7	veis	Türgi
TUR47	S78	veis	Türgi
TUR48	H22	veis	Türgi
TUR49	H51	lammas	Türgi
TUR50	H39	lammas	Türgi
TUR51	H29	veis	Türgi
TUR52	S146	lammas	Türgi
TUR53	S138	lammas	Türgi
TUR54	H49	lammas	Türgi
TUR55	S1	lammas	Türgi
TUR55	S7	lammas	Türgi
TUR55	S12	lammas	Türgi
TUR56	H34	veis	Türgi
TUR57	S136	lammas	Türgi
TUR58	H41	lammas	Türgi
TUR59	H53	lammas	Türgi
TUR60	H2	veis	Türgi
TUR61	H12	veis	Türgi
TUR62	H8	veis	Türgi
TUR63	H1	veis	Türgi
TUR64	S129	lammas	Türgi
TUR65	H32	lammas	Türgi
TUR66	H36	veis	Türgi
TUR67	E3	veis	Türgi
TUR68	S111	lammas	Türgi
TUR69	T10	inimene	Türgi
TUR70	H13	veis	Türgi
TUR71	H5	veis	Türgi
TUR72	T4	inimene	Türgi
TUR73	H16	lammas	Türgi
TUR73	H57	lammas	Türgi
TUR74	S117	lammas	Türgi
TUR75	H20	lammas	Türgi
TUR76	H58	lammas	Türgi
TUR77	S20	veis	Türgi
TUR78	H50	lammas	Türgi
TUR79	S19	veis	Türgi
TUR80	T2	inimene	Türgi

TUR81	S91	veis	Türgi
TUR82	S109	lammas	Türgi
TUR82	S148	lammas	Türgi
IRA7	IR31	lammas	Iraan
IRA8	IR24	lammas	Iraan
IRA9	IR29	lammas	Iraan
IRA10	N1	kits	Iraan
IRA11	IR18	lammas	Iraan
IRA12	IR49	veis	Iraan
IRA13	IR33	lammas	Iraan
IRA14	IR51	veis	Iraan
IRA15	IR19	lammas	Iraan
IRA16	IR13	lammas	Iraan
IRA17	IR32	lammas	Iraan
IRA18	IR11	lammas	Iraan
IRA18	IR12	lammas	Iraan
IRA18	IR14	lammas	Iraan
IRA19	IR35	kits	Iraan
IRA20	IR46	inimene	Iraan
IRA20	IR47	inimene	Iraan
IRA21	IR27	lammas	Iraan
IRA22	IR22	lammas	Iraan
IRA22	IR23	lammas	Iraan
IRA23	IR17	lammas	Iraan
IRA24	IR52	veis	Iraan
IRA25	IR21	lammas	Iraan
ITA5	VA3	lammas	Itaalia
ITA6	VA7	lammas	Itaalia
ITA7	HIP9	inimene	Itaalia
ITA8	IT10	veis	Itaalia
ITA9	IT3	veis	Itaalia
ITA10	VA6	lammas	Itaalia
ITA11	AC3	lammas	Itaalia
ITA11	AC4	lammas	Itaalia
ITA12	VA1	kits	Itaalia
ITA13	VA14	lammas	Itaalia
ARM12	ARM12	veis	Armeenia
ARM13	ARM11	lammas	Armeenia
ARM13	ARM13	lammas	Armeenia
ARM14	ARM35	inimene	Armeenia
ARM15	ARM40	veis	Armeenia
ARM16	ARM8	inimene	Armeenia
ARM17	ARM14	lammas	Armeenia
ARM18	ARM5	inimene	Armeenia
ARM19	ARM33	veis	Armeenia
ARM20	ARM3	inimene	Armeenia
ARM21	ARM31	veis	Armeenia
ARM22	ARM45	lammas	Armeenia

ARM23	ARM46	lammas	Armeenia
ARM24	ARM42	veis	Armeenia
ARM25	ARM49	lammas	Armeenia
ARM26	ARM50	lammas	Armeenia
ARM27	ARM15	lammas	Armeenia
ARM28	ARM2	lammas	Armeenia
ARM29	ARM30	inimene	Armeenia
ARM30	ARM48	lammas	Armeenia
ARM31	ARM43	veis	Armeenia
ARM32	ARM1	lammas	Armeenia
ARM33	ARM29	lammas	Armeenia
ARM34	ARM41	lammas	Armeenia
ARM35	ARM32	inimene	Armeenia
ARM36	ARM19	lammas	Armeenia
TUN1	OU9	inimene	Tuneesia
TUN2	OU17	inimene	Tuneesia
TUN3	U167	veis	Tuneesia
TUN3	U183	veis	Tuneesia
TUN4	U32	lammas	Tuneesia
TUN5	U66	inimene	Tuneesia
TUN5	U80	lammas	Tuneesia
TUN6	U3	lammas	Tuneesia
TUN7	OU14	inimene	Tuneesia
TUN8	OU16	inimene	Tuneesia
TUN9	U120	lammas	Tuneesia
TUN9	OU10	inimene	Tuneesia
TUN10	OU7	inimene	Tuneesia
TUN11	U33	lammas	Tuneesia
TUN12	OU3	inimene	Tuneesia
TUN13	OU20	inimene	Tuneesia
TUN14	OU21	inimene	Tuneesia
TUN15	OU13	inimene	Tuneesia
TUN16	U17	lammas	Tuneesia
TUN17	OU5	inimene	Tuneesia
TUN17	OU6	inimene	Tuneesia
TUN18	U82	lammas	Tuneesia
TUN19	U30	lammas	Tuneesia
TUN19	OU15	inimene	Tuneesia
TUN19	OU18	inimene	Tuneesia
TUN20	U8	lammas	Tuneesia
TUN21	U62	lammas	Tuneesia
TUN22	U118	lammas	Tuneesia
TUN22	U141	veis	Tuneesia
TUN23	OU12	inimene	Tuneesia
TUN24	U44	lammas	Tuneesia
TUN24	U57	lammas	Tuneesia
TUN25	OU23	inimene	Tuneesia
TUN26	U110	lammas	Tuneesia

TUN27	U154	veis	Tuneesia
TUN28	U11	lammas	Tuneesia
TUN29	U117	lammas	Tuneesia
TUN30	OU2	inimene	Tuneesia
ALG2	ZA34	lammas	Alžeeria
ALG3	ZA25	lammas	Alžeeria
ALG4	ZA32	lammas	Alžeeria
ALG5	ZA13	lammas	Alžeeria
ALG6	ZA20	lammas	Alžeeria
ALG7	ZA26	lammas	Alžeeria
ALG8	ZA27	lammas	Alžeeria
ALG9	ZA24	lammas	Alžeeria
ALG10	ZA11	lammas	Alžeeria
ALG11	ZA31	lammas	Alžeeria
ALG12	ZA23	lammas	Alžeeria
ALG13	ZA12	lammas	Alžeeria
AUS1	J1	dingo	Austraalia
AUS2	J2	dingo	Austraalia
AUS3	J3	dingo	Austraalia
FRA3	5455	veis	Prantsusmaa
FIN2	FIN16	inimene	Soome
KAZ1	B20	inimene	Kasahstan
MON1	J88	inimene	Mongoolia
MON1	J91	inimene	Mongoolia
MON2	J86	inimene	Mongoolia
MOL1	6187	lammas	Moldova
MOL2	6214	veis	Moldova
MOL3	6200	lammas	Moldova
MOR1	4150	veis	Maroko
ROM2	7G	inimene	Rumeenia
ROM3	HS4	veis	Rumeenia
ALB2	ALB3	lammas	Albaania
ALB3	ALB4	lammas	Albaania
GRE3	VA17	lammas	Kreeka
GRE4	V8	lammas	Kreeka
GRE4	VA16	lammas	Kreeka

Genotüüp G3

Haplotüüp	Laborikood	Loom	Riik
PAK3	M3	kits	Pakistan
PAK4	M5	veis	Pakistan
PAK5	M6	veis	Pakistan
PAK6	M7	veis	Pakistan
PAK7	M9	veis	Pakistan
PAK8	M11	veis	Pakistan
PAK9	M12	veis	Pakistan
PAK10	M13	veis	Pakistan
PAK12	M15	veis	Pakistan
PAK13	M17	veis	Pakistan
PAK15	M19	veis	Pakistan
PAK16	M20	veis	Pakistan
PAK17	M21	veis	Pakistan
PAK18	M22	veis	Pakistan
PAK19	M23	veis	Pakistan
PAK20	M25	veis	Pakistan
PAK21	M26	veis	Pakistan
PAK22	M28	veis	Pakistan
PAK26	M32	veis	Pakistan
PAK27	M33	veis	Pakistan
PAK28	M34	veis	Pakistan
PAK29	M35	veis	Pakistan
PAK32	M39	veis	Pakistan
PAK33	M40	veis	Pakistan
PAK34	M41	veis	Pakistan
PAK35	M42	veis	Pakistan
PAK36	M43	veis	Pakistan
PAK37	M44	veis	Pakistan
PAK40	M52	veis	Pakistan
PAK41	M54	veis	Pakistan
PAK41	M58	veis	Pakistan
PAK42	M55	veis	Pakistan
PAK45	M60	veis	Pakistan
PAK48	M63	veis	Pakistan
PAK49	M64	veis	Pakistan
PAK50	M65	veis	Pakistan
PAK52	M67	veis	Pakistan
PAK53	M68	veis	Pakistan
PAK54	M69	veis	Pakistan
PAK55	1S	kits	Pakistan
PAK56	2S	kits	Pakistan
PAK58	4S	kits	Pakistan
PAK59	5S	kits	Pakistan
PAK60	7S	kits	Pakistan

PAK61	IR	lammas	Pakistan
IND1	IND 1M	pühvel	India
IND2	IND 1P	pühvel	India
IND3	IND 2M	pühvel	India
IND4	IND 2P	pühvel	India
IND7	IND 4M	pühvel	India
IND7	IND 4P	pühvel	India
IND8	IND 5M	pühvel	India
IND9	IND 5P	pühvel	India
IND10	IND 6A M	pühvel	India
IND12	IND 6B M	pühvel	India
IND13	IND 6B P	pühvel	India
IND14	IND 6C M	pühvel	India
IND16	IND 6D M	pühvel	India
IND19	IND 6E P	pühvel	India
IND20	IND 6F M	pühvel	India
IND21	IND 6F P	pühvel	India
IND22	MI3	pühvel	India
IND23	MI21	pühvel	India
IND23	MI22	pühvel	India
IND24	MI6	pühvel	India
IRA1	IR44	kaamel	Iraan
IRA2	N3	lammas	Iraan
IRA3	IR28	lammas	Iraan
IRA4	IR43	kaamel	Iraan
IRA5	IR37	kaamel	Iraan
IRA6	IR38	kaamel	Iraan
TUR1	S75	veis	Türgi
TUR2	S145	lammas	Türgi
TUR3	S84	veis	Türgi
TUR3	ARM18	inimene	Türgi
TUR4	S131	lammas	Türgi
TUR4	S137	lammas	Türgi
TUR5	S52	veis	Türgi
TUR6	S82	veis	Türgi
TUR7	S127	lammas	Türgi
TUR8	T6	inimene	Türgi
TUR83	H37	lammas	Türgi
TUR84	E2	lammas	Türgi
TUR84	H44	lammas	Türgi
ARM1	ARM26	lammas	Armeenia
ARM2	ARM22	inimene	Armeenia
ARM3	ARM44	lammas	Armeenia
ARM4	ARM16	inimene	Armeenia
ARM5	ARM17	inimene	Armeenia
ARM6	ARM47	lammas	Armeenia
ARM7	ARM24	veis	Armeenia
ARM8	ARM27	lammas	Armeenia

ARM9	ARM23	inimene	Armeenia
ARM10	ARM28	lammas	Armeenia
ARM11	ARM25	veis	Armeenia
FIN1	FIN13	inimene	Soome
FRA1	4902	lammas	Prantsusmaa
FRA1	4895	lammas	Prantsusmaa
FRA2	6565	lammas	Prantsusmaa
ROM1	B12	inimene	Rumeenia
SPA1	P11	lammas	Hispaania
SPA2	P5	lammas	Hispaania
SPA3	P63	inimene	Hispaania
SPA4	P17	lammas	Hispaania
SPA4	P18	lammas	Hispaania
SPA4	P19	lammas	Hispaania
SPA5	P8	lammas	Hispaania
ITA1	VA5	lammas	Itaalia
ITA2	VA8	lammas	Itaalia
ITA3	V13	lammas	Itaalia
ITA4	V7	lammas	Itaalia
GRE1	VA18	lammas	Kreeka
GRE2	VA19	lammas	Kreeka
ALG1	ZA41	inimene	Alžeeria
BUL1	HB10	inimene	Bulgaaria

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Käbi-Riin Ojassoo,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Põistang-paelussi (*Echinococcus granulosus sensu stricto*) globaalne geneetiline mitmekesisus ja fülogeograafia“, mille juhendaja on Urmas Saarma ja Elin Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 03.06.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Käbi-Riin Ojassoo

03.06.2021