

TARTU ÜLIKOOL
ÖKOLOOGIA JA MAATEADUSTE INSTITUUT
ZOOLOOGIA OSAKOND
TERIOLOOGIA ÕPPETOOL

Anti Biedermann

**PÕISTANG-PAELUSSI (*ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*
SENSU LATO) GENOTÜÜPIDE G6 JA G7 GENEETILINE
MITMEKESISUS JA FÜLOGEOGRAAFIA**

Magistritöö

Juhendajad:
PhD Teivi Laurimäe
PhD Liina Kinkar
PhD Urmas Saarma

Tartu 2023

Põistang-paelussi (*Echinococcus granulosus sensu lato*) genotüüpide G6 ja G7 geneetiline mitmekesisus ja fülogeograafia

Põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus sensu lato*) on kosmopoliitse levikuga liigikompleks, milles eristatakse viit liiki, mis jagunevad kaheksaks genotüübiks (ehk mitokondriaalse DNA makrohaplogrupiks). Liigikompleks põhjustab eluohtlikku zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehhinokokoos, millega on nakatunud maailmas hinnanguliselt kuni 1 miljon inimest. Genotüüpide G6 ja G7 klaster on üks kõige tüüpilisem inimnakkuste põhjustaja, kuid selle geneetilise mitmekesisuse ja fülogeograafia kohta on teavet vähe. Käesolevas töös uuriti genotüüpide G6 ja G7 isendeid kokku seitsmest riigist Euroopas, Aasias ja Lõuna-Ameerikas. Analüüsiti 71 mitokondri genoomi pea täielikku järjestust (12156-12163 aluspaari), millele lisati 103 varasemalt publitseeritud G6/G7 järjestust. Tulemused näitasid, et genotüüpide G6 ja G7 geneetiline mitmekesisus on märksa suurem kui varem arvati – analüüsitud järjestused moodustasid kompleksse fülogeneetilise võrgustiku, mida iseloomustavad mitmed divergentsed haplotüübid ja uus divergentne haplogrupp Mongooliast, mis positsioneerus G6 ja G7 vahele. Tulevikus oleks oluline uurida milline mõju võiks divergentsel gruppidel olla selle parasiidi epidemioloogiale.

Genetic diversity and phylogeography of *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6 and G7

Echinococcus granulosus sensu lato is a cosmopolitan species complex, in which five species are recognized, which in turn are divided into eight genotypes (mitochondrial DNA macrohaplogroups). This species cluster is the cause of a life-threatening zoonotic disease known as cystic echinococcosis (CE), which affects an estimated 1 million people worldwide. Genotypes G6 and G7 are one the most common etiological agents associated with human CE, yet relatively little is known about the genetic diversity and phylogeography of these genotypes. In this thesis, samples from seven countries originating from Europe, Asia and South America were analyzed. 71 near-complete mitochondrial genomes (12156-12163 bp) were analyzed together with 103 other previously published genotype G6/G7 sequences. The results of this thesis showed that genotypes G6 and G7 are significantly more diverse than previously thought. The analyzed samples formed a complex phylogenetic network, in which several previously undetected divergent haplotypes emerged alongside a new haplogroup from Mongolia, which positioned between G6 and G7. In the future, it would be interesting to assess whether these divergent groups might have an impact on the epidemiology of this parasite.

Sisukord

1. Sissejuhatus	5
2. Metoodika	11
2.1. Proovid	11
2.2. DNA eraldamine, PCR amplifikatsioon ja sekveneerimine	11
2.3. Andmeanalüüs	13
2.4. Töö autori roll	13
3. Tulemused	14
3.1. Täiendatud andmestik	14
3.1.1. Fülogeneetiline võrgustik	14
3.1.2. Fülogeneesipuu	16
3.1.3. Populatsiooni neutraalsuse ja mitmekesisuse indeksid	18
3.1.4. Populatsioonide eristumine	19
4. Arutelu	21
Kokkuvõte	24
Summary	25
Tänuavaldused	26
Kasutatud kirjandus	27
Lisa 1. Joonised	37
Lisa 2. Ülevaatlik tabel kõikidest töös käsitletud proovidest	39
Lisa 3. Selles töös sekveneeritud proovid	40
Lisa 4. Analüüsiks kaasatud proovid	42

1. Sissejuhatus

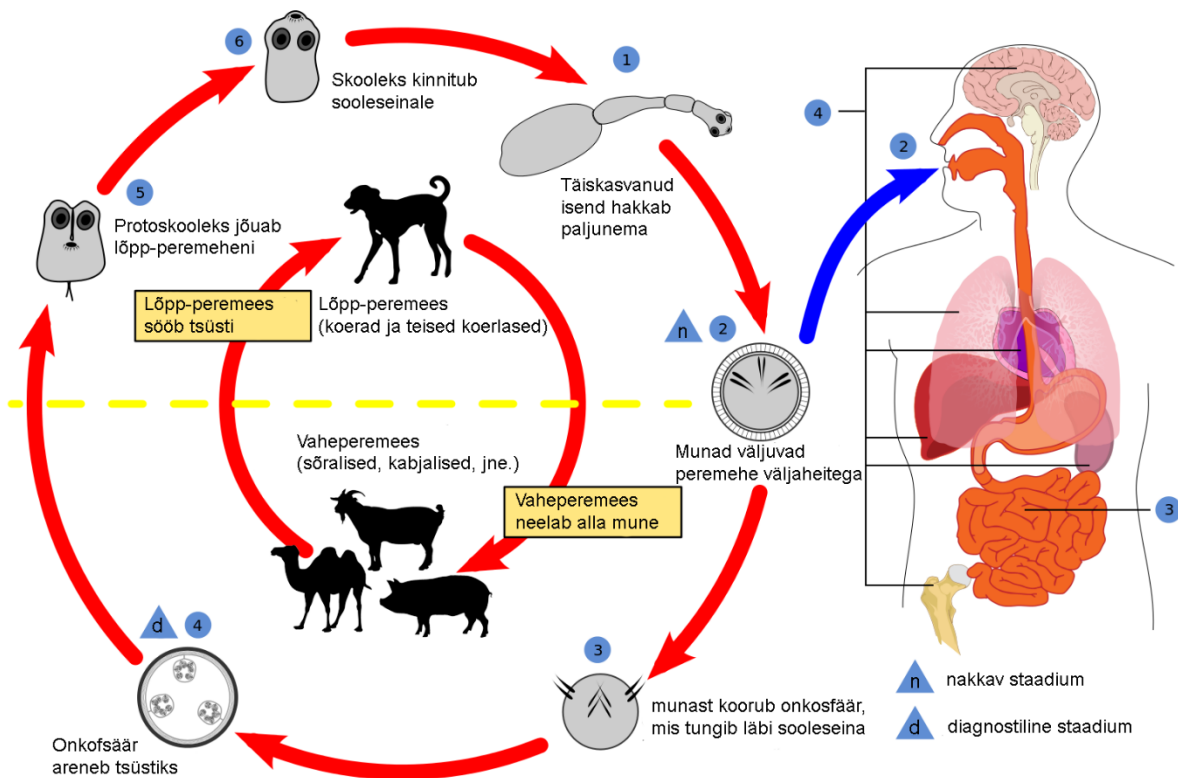
Põistang-paeluss (*Echinococcus granulosus sensu lato*) on Taeniidae sugukonda kuuluv endoparasiitide liigikompleks, mis põhjustab eluohtlikku zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehhinokokoos ehk põistangtõbi (McManus *et al.* 2003; Moro ja Schantz 2009). Tegemist on haigusega, mis esineb pea kogu maailmas, nakatades nii inimesi kui ka koduloomi (Cardona ja Carmena 2013; Carmena ja Cardona 2013). Hinnangute kohaselt on selle haigusega nakatunud kuni 1 miljon inimest ning sellest tulenev majanduslik kahju inimeste tervisprobleemide ja loomasaaduste kadu tõttu on kuni 3 miljardit eurot aastas (WHO 2021).

Põistang-paelussile on omane kompleksne elutsükkel, mille tüüpilisteks lõpp-peremeesteks on perekonna koer (*Canis*) liikmed ja vaheperemeesteks sõralised (*Artiodactyla*) või kabjalised (*Perissodactyla*) (Romig *et al.* 2017; Thompson 2017). Parasiidi elutsükkel saab alguse munast (Joonis 1.), mis sattub keskkonda lõpp-peremehe väljaheitega. Järgmine elufaas algab pärast muna alla neelamist vaheperemehe poolt. Vaheperemehe soolestikus koorub munast onkosfäär, ehhinokokkide esmane elujärk, mis tungib läbi sooleseina vereringesse (McManus *et al.* 2003). Vereringe kaudu liigub onkosfäär eri kehaosadesse, tavaliselt maksa või kopsudesse, kus ta areneb edasi tsüstiks. Tsüsti sees hakkavad arenema tuhanded protoskooleksid, mis on kõik võimelised nakatama lõpp-peremeest (Eckert *et al.* 2001; Moro ja Schantz 2009).

Parasiit jõuab lõpp-peremeheni kui lõpp-peremees sööb ehhinokoki tsüste sisaldavaid vaheperemehe tooreid organeid. Lõpp-peremehe soolestikus protoskooleksid evagineeruvad ja kinnituvad nookudega peremehe sooleseinale. Seal nad imavad soolestikust läbivaid toitained ja kasvavad kuni nad jõuavad suguküpsuseni. Kõik isendid on hermafrodiitsed ehk neil esinevad nii isas- kui ka emassuguorganid ja nad on võimelised iseviljastuma (Lymbery 2017). Munad valmivad isendi kõige viimases kehalülis, mis küpsuseni jõudmisel eraldub ussi kehast ja kandub väliskeskkonda lõpp-peremehe väljaheitega. Pärast seda hakkab valmima järgmine munadega täidetud kehalüli (Eckert *et al.* 2001; McManus *et al.* 2003; Thompson 2017).

Varasemalt käsitleti tsüstilise ehhinokokoosi haigustekitajat kui ühte liiki *Echinococcus granulosus*, kuid samal ajal oli täheldatud ka selle liigis väga kõrget varieeruvust levikus, peremehevalikus ja morfoloogias (Romig *et al.* 2015). Liigisiseste selgelt eristunud populatsioonide kirjeldamiseks hakati kasutama mõistet „tüvi“ (ingl. *strain*) (Thompson ja McManus 2001), samas nende tüvede kohta puudusid veel geneetilise andmed. Hilisemad tööd, mis kasutasid mitokondriaalse DNA geenifragmente *cytochrome c oxidase subunit I (cox1, 366 ap)* ja *NADH dehydrogenase subunit I (nad1, 471 ap)*, toetasid varem defineeritud tüvede

jaotust ning uute andmete valguses eristati liigisiselt 10 erinevat genotüüpi: G1–G10 (Bowles *et al.* 1992; Bowles ja Mcmanus 1994; Scott *et al.* 1997; Lavikainen *et al.* 2003). Nüüdisajal on aga ametlikult tunnustatud neist kaheksa, kus genotüüp G2 on loetud G3 alamtüübiks (Kinkar *et al.* 2017) ja G9 on loetud G7 alamtüübiks (Kedra *et al.* 1999; Thompson 2008).



Joonis 1. (CDC, Wikimedia Commons). *Echinococcus granulosus sensu lato* elutsükel. 1) Täiskasvanud uss reprodutseerub lõpp-peremehe soolestikus. 2) Väljaheitega sattuvad munad keskkonda. 3) Pärast muna alla neelamist vaheperemehe poolt, koorub munast onkosfäär, mis tungib läbi sooleseina vereringesse. 4) Onkosfäärid migreeruvad eri kehaosadesse, kus nad arenevad tsüstiks. Tsüstide see hakkavad arenema protoskooleksid. 5) Lõpp-peremees sööb parasiidiga nakatunud organeid või tsüsti ning protoskooleksid jõuavad tema soolestiku. 6) Protoskooleksid evagineeruvad ning kinnituvad soolestiku seinale, kus nad kasvavad suguküpsuseni. Inimene on selles elutsüklis juhuslik tupikperemees.

Üle aastate kogunes põistang-paelussi genotüüpide leviku, peremehevaliku ja morfoloogia kohta rohkem andmeid, millele toetudes jagati genotüübid liikideks (Romig *et al.* 2015). Selle tulemusena klassifitseeriti *E. granulosus* liikide kompleksiks *E. granulosus sensu lato*. Nendest liikidest laialdaselt tunnustatud on *E. granulosus sensu stricto* (G1/G3), *E. equinus* (G4) ja *E. ortleppi* (G5).

Vaidluse alla on jätkuvalt jäänud genotüüpide G6–G8 ja G10 taksonoomiline klassifitseerimine. Algselt oli pakutud G6–G8/G10 klatri liitmist üheks liigiks - *E. canadensis* (Thompson ja McManus 2001; Nakao *et al.* 2006). Hilisemad tuumageenide andmed toetasid klatri kaheks erinevaks liigiks jagamist - *E. intermedius* (G6/G7) ja *E. canadensis* (G8/G10) (Saarma *et al.* 2009; Laurimäe *et al.* 2018a). Välja on pakutud ka jaotus, mis jagab klatri kolmeks: *E. intermedius* (G6/G7), *E. borealis* (G8) ja *E. canadensis* (G10) (Lymbery *et al.* 2015a). Tänapäevani pole G6-G8/G10 klatri fülogeenes lõplikult välja selgitatud, kuna hetkel pole küllalt põhjaliku tuumagenoomi andmestikku liigistaatuse kinnitamiseks (Lymbery *et al.* 2015b; Nakao *et al.* 2015). Suur osa genotüüpidest on nüüdseks jagatud eri liikideks, aga genotüübi termin kinnistus juba enne seda teaduskogukonnas, mistõttu on see termin tänapäevani jätkuvalt kasutuses ehinokokkide-alases teaduskirjanduses (Vuitton *et al.* 2020).

Põistang-paelussi liigikompleksi genotüüpidest on G1–G7 elutsükkel enamasti seotud kodustatud loomadega, nakatades vaheperemehena erinevaid kariloomi ja kasutades lõpp-peremehena koeri (Romig *et al.* 2017). Genotüübid G8 ja G10 aga nakatavad enamasti metsikuid sõralisi ja kasutavad hunti lõpp-peremehena (Thompson 2017). Genotüübi G6 kõige sagedasemad vaheperemehed on kaamel ja kits ning genotüübi G7 korral kodusiga, lõpp-peremeheks on mõlemal genotüübil tavaliselt koer (Cardona ja Carmena 2013; Romig *et al.* 2017). Genotüüpidel G6/G7 on täheldatud ka nakkusi metsloomades, näiteks metsseas (Onac *et al.* 2013; Umhang *et al.* 2014; Sgroi *et al.* 2019) ja hundis (Ito *et al.* 2013; Guerra *et al.* 2013; Kilinc *et al.* 2023). Metsikus looduses olevad vahe- ja lõpp-peremehe populatsioonid võivad seega kujuneda haiguse reservuaariks (Thompson 2013). Samas on hetkel leitud ühest regioonist metsloomade seas vaid nakatunud vahe- või lõpp-peremees, kuid mitte mõlemat korraga. Seetõttu puudub hetkel tõestus, et need genotüübid suudavad moodustada tervikliku elutsükli metsikus looduses (Romig *et al.* 2017).

Enamus põistang-paelussi liigikompleksi liikmetest on aga võimelised nakatama palju erinevaid imetajaid, kaasaarvatud inimesi (Cardona ja Carmena 2013). Erandiks sellele on vaid *E. equinus* (G4) ja *E. ortleppi* (G5), kelle peremeeste ring on väiksem ja inimnakkuste arv peaaegu olematu (Romig *et al.* 2017). Alvarez Rojas *et al.* (2014) leidsid oma ülevaateartiklis, et põistang-paelussi liigikompleksis on kõige laiema leviku ja peremehe valikuga kui ka kõige sagedasem (88,4%) inimnakkuse põhjustaja *E. granulosus s.s.* Teine kõige tüüpilisem (11,1%) inimnakkuse põhjustaja on genotüüpide G6/G7 klaster, millest omakorda sagedamini (7,3%) on inimnakkustega seostatud genotüüp G6. Samas on genotüüp G7 samuti kujunenud oluliseks nakkuste allikaks inimestele (Schneider *et al.* 2010).

Põistangtõbi on levinud peaaegu üle kogu maailma, kus mitmes regioonis on see endeemne ehk ehhinokokoos esineb nendel aladel pidevalt. (Alvarez Rojas *et al.* 2014). Kui genotüüp G6 on eelkõige endeemne Lähis-Ida ja Põhja-Aafrika regioonides, siis genotüübi G7 korral on olulisemad endeemsed alad Euroopas ja Lõuna-Ameerikas (Dakkak 2010; Carmena ja Cardona 2013; Deplazes *et al.* 2017). Endeemsed alad asuvad enamasti vaestes riikides või regioonides, kus enamus populatsioonist elab agraarkogukondades (Borhani *et al.* 2020). Ehhinokokkide ohjamine on aga väga aja- ja rahakulukas, kuna probleemi tuleb lahendada mitmel tasemel (nt. haridus, ravimid ja seire), mistõttu on see haigus jäänud paljudes endeemsetes alades tähelepanuta (Brunetti *et al.* 2011; Casulli *et al.* 2012). Seega on Maailma Terviseorganisatsioon (WHO) märkinud ehhinokokoosi nende tähelepanuta jäetud troopiliste haiguste nimekirja (WHO 2010), mille eesmärk on tuua rohkem tähelepanu nendele haigustele ja aktiivselt neid haigusi ohjata.

Ehchinokokkide ohjamine on oluliselt raskendanud piiratud andmestik selle parasiidi levikust, nakkusmuutritest ja patogeensusest (Budke *et al.* 2017; Casulli *et al.* 2023). Tuleneb see nii rahastus probleemidest kui ka parasiidi proovide (nt. munad, tsüst või täiskasvanud isend) puudusest (Brunetti *et al.* 2011). Näiteks, puudub vaesemates regioonides adekvaatne veterinaarne järelevalve nii tapamajades kui ka koduste loomade tapmise korral (Baptista *et al.* 2023). Samaselt on olnud probleeme ka tapamajade varustuse puudumisega, mille olemasolu võimaldaks paremini tuvastada ja teavitada ehchinokokkide leide (Bardosh *et al.* 2016; Alvi *et al.* 2021). Potentsiaalne probleem võib olla ka tapamajade tahtlik ehchinokokkide mitteteatamine, kuna sellega võib kaasneda oluline majanduslik kahju. Tähtis on ka märkida, et ehchinokokkide tsüstide tuvastamine ja kogumine on samuti vaeariikkas töö (Laurimäe *et al.* 2023). Selle kõige tõttu on ehhinokoki proove üldiselt piiratud koguses.

Ehchinokokkide geneetika uuringud on enamasti läbi viidud kasutades samasid mitokondriaalse DNA geenifragmentide järjestusi (*cox1*, 366 ap; *nad1*, 471 ap) (Casulli *et al.* 2012; Addy *et al.* 2017; Hua *et al.* 2022), mida kasutati ka nende genotüüpide algsel iseloomustamisel (Bowles *et al.* 1992; Bowles ja Mcmanus 1994). Nende uuringute tulemusena moodustati esmane andmebaas ehchinokokkide mitmekesisusest ja populatsiooni struktuuridest. Samas oli nendest järjestustest saadud informatsioon piiratud. See kajastus fülogeneetilistes võrgustikes, milles enamus proove koondusid reeglina ühte või kahte kesksesse haplotüüpi, mille alusel oli keeruline kirjeldada populatsiooni geneetilisi struktuure, mitmekesisust ja fülogeograafiat. Kohati jäi puudulikuks ka nende geenifragmentide järjestuste varieeruvuse eristusvõime, kus genotüüpide G6 ja G7 korral oli vähese geneetilise varieeruvuse tõttu kohati võimatu eristada

genotüüpe üksteisest, mistõttu määrati proovi kuuluvuseks G6/G7 (Ito *et al.* 2013; Nakao *et al.* 2013). Hiljem hakati analüüsima ka geenide tervikjärjestusi (nt. *cox1*, 1608 ap) (Yanagida *et al.* 2017; Bold *et al.* 2019), mille korral oli saadud geneetiline variatsioon küll oluliselt suurem, kuid mitte piisavalt, mistõttu eelpool mainitud probleemid jäid püsima.

Pikad (>8,000 ap) mitokondriaalse DNA järjestused on ehinokokkide andmestikku lisandunud alles hiljuti (Laurimäe *et al.* 2016, 2018b; Kinkar *et al.* 2018a, b) ja sellealaseid genotüüpide G6 ja G7 töid on vaid üksikuid (Laurimäe *et al.* 2018b). Pikkade järjestuste põhjal on aga kujunenud oluliselt põhjalikum andmestik, mille analüüsil on leitud nendes genotüüpides varasemast oluliselt laiem mitmekesisus ja komplekssem fülogeograafiline struktuur. Näiteks, genotüübi G7 korral leiti, et see jaguneb kaheks haplogrupiks - G7a ja G7b, kus varasemalt oli G7b proovid lühemate järjestuste korral määratud genotüübiks G6 (Laurimäe *et al.* 2018b). Genotüüpide G6 ja G7, kaasa arvatud haplogruppide G7a ja G7b, määramiseks ei ole vaja aga täismitokondriaalset järjestust, vaid nüüdseks on leitud, et selleks sobivad ka järjestuste kombinatsioon *NADH dehydrogenase subunit 2 (nad2, 714 ap)* ja *NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5, 680 ap)* (Laurimäe *et al.* 2019a). Tuumagenoomi korral on ehinokokke uuritud kasutades erinevaid geene (Saarma *et al.* 2009; Knapp *et al.* 2011; Kinkar *et al.* 2017; Yanagida *et al.* 2017; Laurimäe *et al.* 2018a), kuid tuumagenoomi laiemalt hõlmavad mitmekesisuse uuringud veel puuduvad. Sellest tulenevalt ei ole hetkel täpset arusaama, kas ja kuidas mitokondriaalne mitmekesisus kajastub tuumagenoomis ning kuidas see mitmekesisus mõjutab parasiidi bioloogilisi tunnuseid ja funktsioone.

Ehinokokkide uurimisel omavad populatsioonigeneetika uuringud suurt tähtsust, kuna tegemist on krüptilise eluviisiga liigiga, mille kirjeldamine ja seiramine on keeruline. Mitokondri geneetilised uuringud aga võimaldavad kirjeldada parasiitide populatsioone, nende levikut, siseseid ja vahelisi geneetilisi struktuure ning fülogeograafiat. Sellistes populatsioonigeneetika uuringutes kogutud informatsioon on üks oluline osa parasiitide epidemioloogia mõistmisest, kuid see moodustab ka olulise alustala tulevastele uuringutele. Näiteks saame tuumagenoomi uuringute kaasamisega täpsustada kas ja mil määral on mitokondriaalse geneetilise mitmekesisuse mustrid peegeldunud tuumagenoomis, mis omakorda rajaks alustala järgnevateks põhjalikeks uuringuteks (nt. võrdlevad integreeritud transkriptoomi/sekretoomi/metabooloomika/proteoomika uuringud erinevatel geneetilistel variantidel), et paremini mõista selle parasiidi bioloogiat, levikut ja peremeesliikide eelistust. Need tulemused panustavad ehinokokkide ohjamisse, kus täpne ja selge andmestik nende

populatsioonidest, iseärasustest ja muustritest, võimaldab edasi arendada paremaid ja efektiivsemaid lähenemisi erinevate genotüüpidele/haplogruppide ohjamisel.

Selle töö uurimisobjektiks oli põistang-paelussi genotüübid G6 ja G7, mis on teine kõige tüüpilisem inimnakkust põhjustav genotüüpide paar põistang-paelussi liigikompleksis *E. granulosus s.s.* (G1 ja G3) järel (Alvarez Rojas *et al.* 2014). Samas on G6/G7 geneetiline andmestik piiratud, eriti arengumaades, kus puuduvad ressursid sellisteks uuringuteks (Cardona ja Carmena 2013). Kuigi viimaste aastatega on andmestik oluliselt täiendunud uute pikemate mitokondri järjestuste sekveneerimise ja analüüsiga, on siiski jäänud nende genotüüpidega seotud teadmistes hulga lünki. Seniajani puudub põhjalik arusaam genotüüpide G6/G7 fülogeograafiast ja levikust ning sellega kaasnevast geneetilisest mitmekesisusest ja struktuurist. Sarnaselt, on leitud G6/G7 klastris varasemalt divergentseid haplotüüpe, kuid pole olnud võimalust kindlaks teha, kas tegemist on üksiku juhtumiga või iseärase haplogruppiga.

Seega, käesoleva töö eesmärgid olid järgnevad:

- 1) Analüüsida inimtervise seisukohast oluliste *E. granulosus s.l.* genotüüpide G6 ning G7 mitokondriaalset geneetilist mitmekesisust ja fülogeograafiat, kaasates analüüsi proove ka seni vähesel määral uuritud piirkondadest.
- 2) Analüüsida potentsiaalsete divergentsete haplogruppide olemasolu piirkondadest, kust varasemalt on tuvastatud vaid üksikud geneetiliselt divergentsed juhuleiud.

2. Metoodika

2.1. Proovid

Käesolevas magistritöös analüüsiti kokku 286 proovi, neist 213 olid saadetud tööruhma koostööpartnerite poolt koematerjali (tsüsti) kujul ning 73 puhastatud DNA kujul (Lisa 2.). Algsest proovide valimist amplifitseeriti PCR meetodiga edukalt 207, millest 96, mis osutusid genotüüpideks G6 ja G7, saadeti sekveneerimisele. Pärast sekveneerimist ja andmete korrastamist kaasati lõppanalüüsi 71 proovi (Joonis 2.). Lõppanalüüsi kaasatud proovid pärinesid kuult erinevalt vaheperemees-liigilt: inimene (n=13), kodusiga (n=33), kaamel (n=18), kodukits (n=4), veis (n=2), lammas (n=1). Proovid olid pärit 7 erinevast riigist: Prantsusmaa (n=9), Poola (n=3), Moldova (n=1), Türgi (n=2), Argentiina (n=32), Mongoolia (n=19) ja Iraan (n=5).

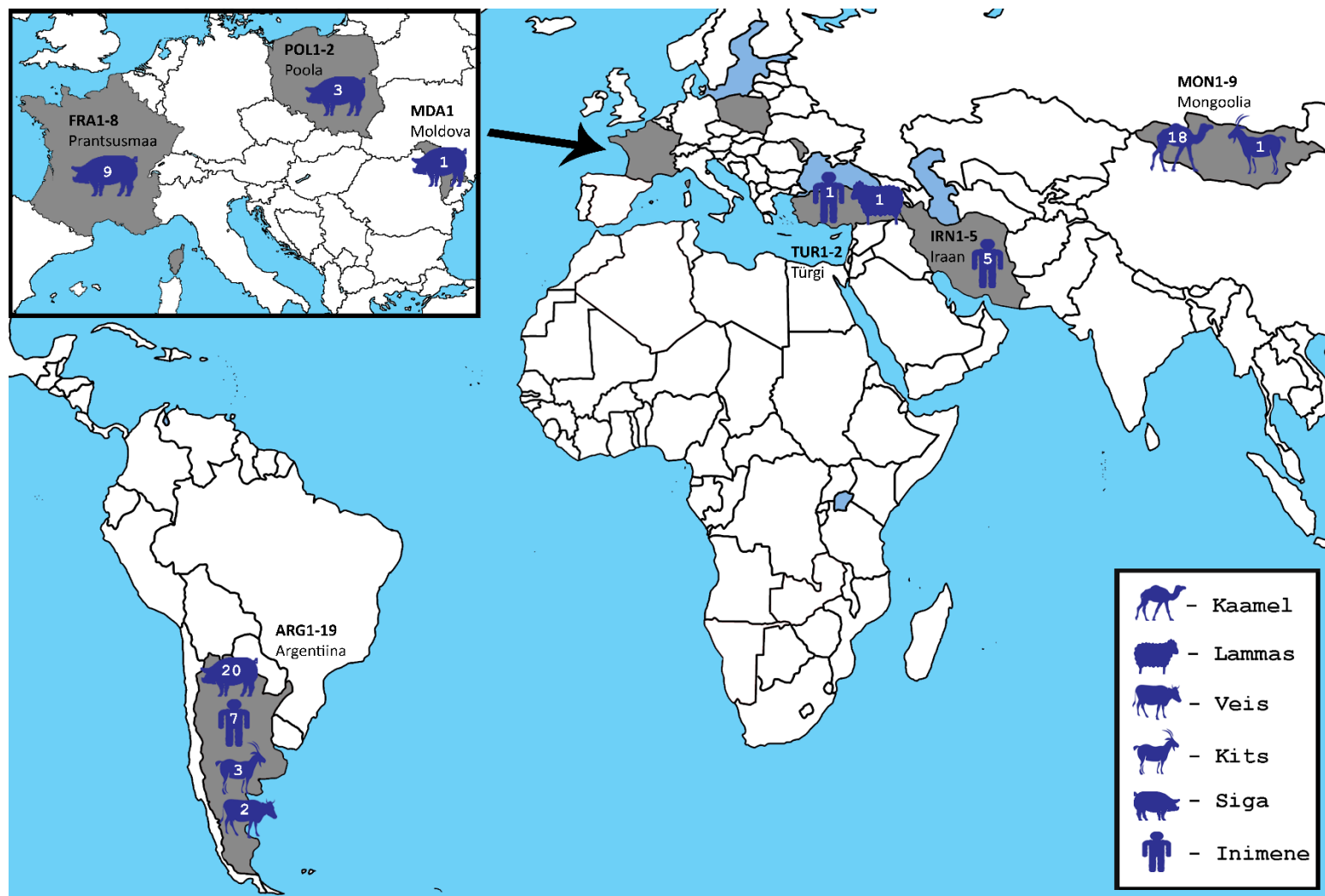
2.2. DNA eraldamine, PCR amplifikatsioon ja sekveneerimine

Parasiidi koeproovidest eraldati DNA Thermo Scientific GeneJET Genomic Purification Kit'iga (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). DNA eraldamisel järgiti tootja poolt koostatud protokoll. PCR amplifikatsiooniks kasutati Laurimäe *et. Al* (2018b) töös kirjeldatud 13 praimeripaari. Esialgne PCR reaktsioon viidi läbi praimeripaariga nr. 11 ja neil, mis osutusid positiivseks, viidi läbi PCR ka ülejäänud 12 praimeripaariga. PCR reaktsioonid tehti 20 µl-s, mis koosnes: 1x BD Advantage 2 PCR puhver (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 0,2 mM dNTP segu (10 mM, Thermo Fisher Scientific), 0,25 µM vastavaid primereid, 1 U Advantage 2 polümeraasisegu ja 20-50 ng puhastatud DNA-d.

Kasutatud PCR programm oli *touchdown* programm varem avaldatud Laurimäe *et al.* (2016) töös: algne DNA denatureerimine toimus 95 °C juures 1 min jooksul, millele järgnes 10 tsükli 95 °C juures 25 s, 55 °C 45s (kus iga uue tsükliga langes temperatuur 0,5 °C võrra) ja 68 °C juures 2 min; selle järgnes 25 tsükli 95 °C juures 20s, 50 °C 45s ja 68 °C 2min; lõppedes 68 °C juures 3 min.

PCR produktist 10 µl kasutati geel-elektroforeesil, et kontrollida PCR produkti olemasolu. Valmistati 1% agarose geel 1x TAE puhvrts, kasutades Atlas ClearSight Gold Agarose tablette (BioAtlas, Tartu, Eesti) ning seejärel asetati geel 1x TAE puhvrtsse elektroforeesiks. Ülejäänud 10 µl produkti puhastati kasutades aluselist fosfataasi FastAP (1U, Thermo Fisher Scientific) ja eksonukleasi EXO I (1U, Thermo Fisher Scientific) segu. Seejärel inkubeeriti proove 37 °C juures 30 min ja kuumutati 80 °C juures 15 minutit, et inaktiveerida ensüümid.

Puhastatud proovid saadeti sekveneerimiseks Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaborisse.



Joonis 2. Töös analüüsitud *Echinococcus granulosus sensu lato* G6 ja G7 proovide päritoluriigid ja vaheperemehed. Vaheperemehed on välja toodud legendis, number kujutise (vaheperemehe) sees näitab proovide arvu. ARG: Argentiina, FRA: Prantsusmaa, MDA: Moldaavia, MON: Mongoolia, IRN: Iraan, POL: Poola, TUR: Türgi.

2.3. Andmeanalüüs

Konsensusjärjestus pandi kokku kasutades programmi Codon Code Aligner v.10.0.2. Programmis Bioedit (Hall 1999) kontrolliti polümorfsete positsioonide kvaliteeti ja õigsust kromatogrammi abil, vajadusel parandati. Samas programmis kasutati joendamiseks Clustal W algoritmi (Thompson *et al.* 1994). Proovide genotüübi määramiseks kõrvutati need erinevate *E. granulosus s.l.* mitokondri genoomide järjestustega. Referentsjärjestused leiti GenBankist: G6 ligipääsukood MH300929, G7 ligipääsukood MH300955, G1 ligipääsukood MK774655 ja G5 ligipääsukood AB235846.

Fülogeneesi võrgustike loomiseks kasutati ühendatud mediaanide meetodit (Bandelt *et al.* 1999) programmis Network v.10.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd., 2004). Fülogeneesipuud arvutati programmiga MEGAX v.11.0.10 (Kumar *et al.* 2018) kasutades suurima tõepära meetodit, puude toetuste arvutamiseks *bootstrapiti* puud 1000 korda. Evolutsioonimudeliks valiti *General Time-Reversible* mudel (Waddell ja Steel 1997) ja mudeliks, mis võimaldab mutatsioonimäärade pidevat varieerumist nukleotiidide lõikes, valiti *Gamma Distributed With Invariant Sites* (Uzzell ja Corbin 1971).

Programmiga DnaSP v.6.12.03 (Rozas *et al.* 2017) arvutati järgmised populatsiooni mitmekesisuse indeksid: haplotüüpide arv (H_n), haplotüüpide mitmekesisus (H_d) ja nukleotiidide mitmekesisus (π). Programmiga Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier *et al.* 2007) arvutati geneetilise diferentseerumise indeks (F_{st}) (Wright 1951). Mitmekesisuse indeksid määrati eraldi järgmistele rühmadele: genotüübid G6, G7, haplogrupid G7a, G7b ja Mongoolia haplogrupp ning teised populatsioonid, millest oli pärit rohkem kui 5 proovi.

2.4. Töö autori roll

Parasiidi proovid koguti eri riikidest rahvusvaheliste koostööpartnerite abil (Lisa 2.) Proovid sekveneeriti Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklabori poolt. Ülejäänud magistritöö osad (ehk laboritöö, andmete analüüs ja töö kirjutamine) viis autor läbi iseseisvalt.

3. Tulemused

Selle töö tulemusena sekveeriti 71 *E. granulosus s.l.* genotüüpide G6 ning G7 mitokondri genoomi järjestust pikkusega 12156-12163 aluspaari (Lisa 3.). Mitokondri järjestuste põhjal kuuluvad selles töös analüüsitud proovidest 16 genotüüpi G6, 16 Mongoolia haplogruppi ja 39 genotüüpi G7 (Lisa 1.).

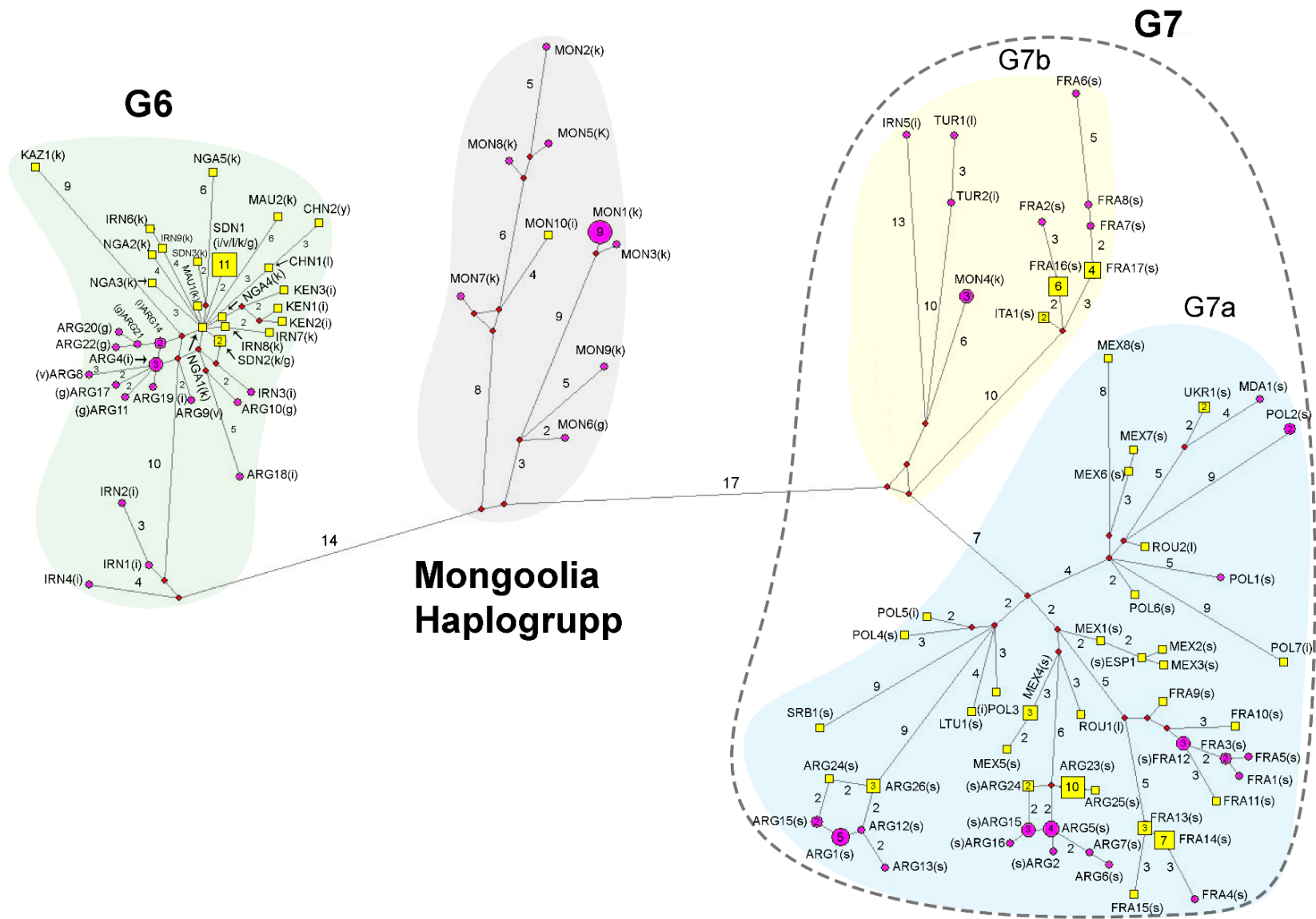
3.1. Täiendatud andmestik

Proovide võrdluseks ja andmete globaalsesse konteksti paigutamiseks loodi laiendatud andmestik, milles oli nii käesolevas töös sekveeeritud 71 proovi kui ka 103 lisaproovi varasemalt avaldatud G6/G7 täismitogeenoomidest (Lisa 4.). Uue andmestiku proovide pikkuseks sai 12156-12163 ap ning proovide koguarvuks 174.

3.1.1. Fülogeneetiline võrgustik

G6 klastrisse kuulus 35 haplotüüpi, millest enamus moodustasid ühe keskse klatri (Joonis 3.). Haplotüüpidel puudus geograafilise asukoha põhine klasterdumine, kus geograafiliselt eraldatud riikide haplotüübid olid siiski geneetiliselt sarnased. Näiteks, Argentiina haplotüüp ARG14 oli Nigeeria haplotüübist NGA1 eraldatud vaid 2 mutatsiooni võrra, kus Hiina haplotüüp CHN1 oli Mauritaania haplotüübist MAU1 eraldatud vaid 4 mutatsiooni võrra. Samas esines ka kolm divergentsed haplotüüpi Iraanist (IRN1,2,4), mis erinesid teistest G6 haplotüüpidest minimaalselt 12–16 mutatsiooni võrra.

Genotüübi G7 klaster koosnes 52 haplotüübist, mis jagunesid kaheks haplogrupiks - G7a ja G7b. G7a haplogruppi kuulus 43 ja G7b haplogruppi 9 haplotüüpi. G7a klatri struktuur oli kompleksne, kohati esines geograafilise asukoha põhine struktuuri, kohati see puudus. Näiteks, moodustasid Argentiina proovid klatriid, mille siseselt erinesid haplotüübid üksteisest vaid 1-2 mutatsiooni võrra. Samas jagunesid Argentiina proovid kaheks klatriks, kus klatriite vaheline kaugus oli minimaalselt 21 mutatsiooni. Sarnane struktuur esines Prantsusmaa haplotüüpides, kus haplotüübid üldiselt erinesid üksteisest 1–3 mutatsiooni võrra, kuid maksimaalne erinevus kahe proovi vahel oli 15 mutatsiooni (FRA4 ja FRA11). Samas esines ka haplotüüpe, mis olid geograafiliselt kaugetest regioonidest, kuid geneetiliselt sarnased. Näiteks, erinesid Mehhiko haplotüübid MEX2 ja MEX3 Hispaania haplotüübist ESP1 vaid 1 mutatsiooni võrra.



Joonis 3. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotüüpide G6 ja G7 täiendatud fülogeneetiline võrgustik (n = 174). Lilla ringiga on tähistatud selles töös sekveneeritud proovid, kollaste ruutudega on tähistatud teistest töödes avaldatud proovid. Rohelisel taustavärvil on genotüüp G6, hallil Mongoolia haplogrupp, kollasel G7b ja sinisel G7a klaster. Punktiir joonega on ümbrisetud genotüüp G7. Haplotüübi nimed tulenevad nende päritolu riigi rahvusvahelisest ISO koodist. Nime juures sulgudes olev täht tähistab vaheperemees liiki, need on: (k) - kaamel, (g) - kits, (s) - siga, (i) - inimene, (l) - lammas, (v) – veis, (y) - jakk. Ringi- ja ruudusisesed arvud tähistavad proovide arvu selles haplotüübis, joonte kõrval olevad arvud tähistavad mutatsioonide arvu.

G7b klastris jaotusid Prantsusmaa ja Itaalia haplotüübid ühte geneetiliselt sarnasesse klastrisse, milles siseselt erinesid proovid 2–5 mutatsiooni võrra. Prantsusmaa ja Itaalia proovidest eraldi, jaotus G7b klastrisse 4 divergentset haplotüüpi: Iraanist IRN5, Türgist TUR1 ja TUR2 ning Mongooliast MON4. Divergentsetest haplotüüpidest olid geneetiliselt lähedased vaid Türgi haplotüübid (3 mutatsiooni), teised haplotüübid erinesid üksteisest minimaalselt 16 mutatsiooni võrra.

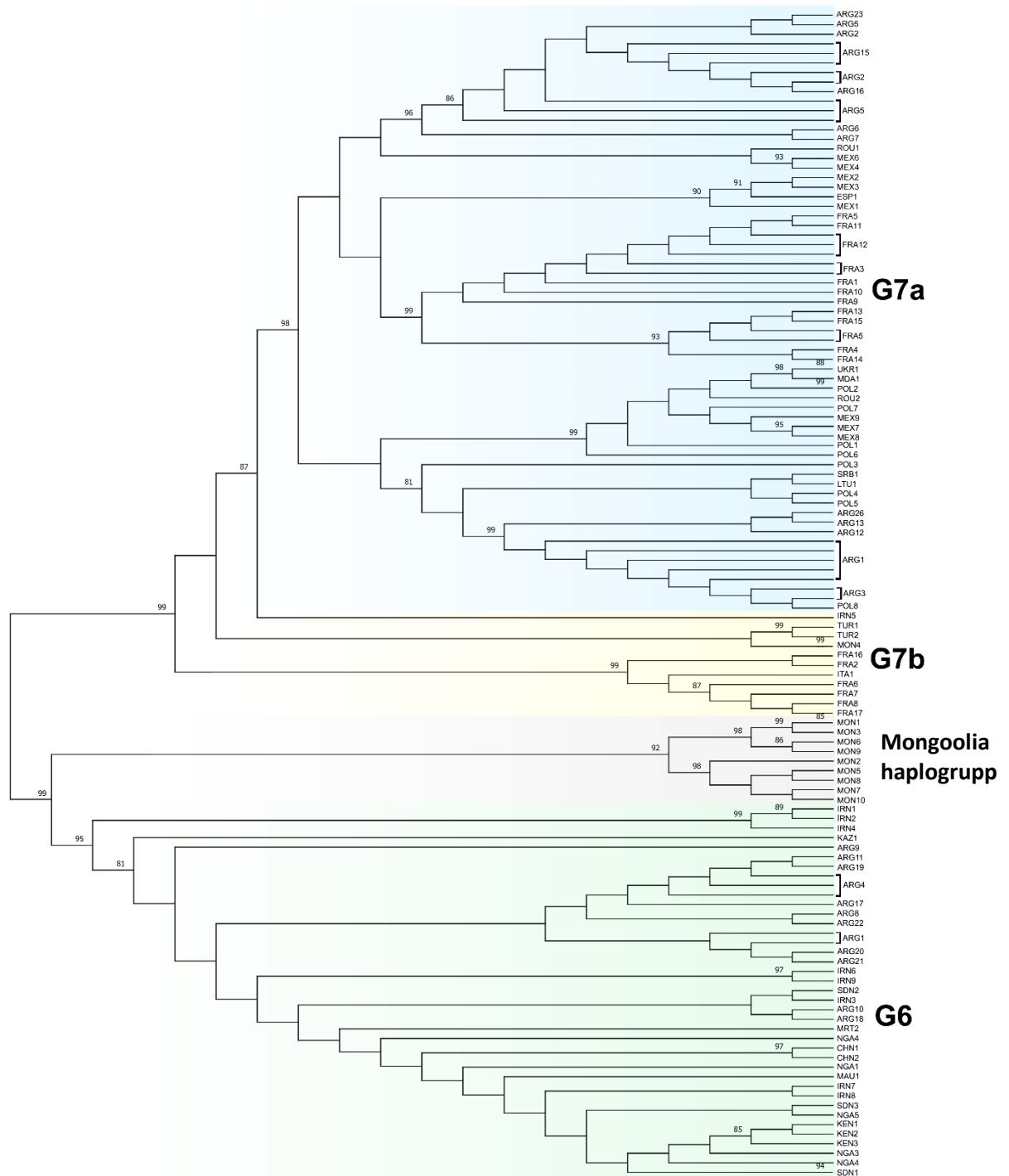
Mongoolia haplogruppi kuulus 9 haplotüüpi Mongooliast. Mongoolia haplogrupp eristus geneetiliselt nii G6 klastrist (14 mutatsiooni) kui ka G7 klastrist (17 mutatsiooni). Mongoolia haplotüübid jagunesid kaheks haruks. Esimese haru liikmed erinesid üksteisest 3–9 mutatsiooni võrra, kus kõige suurem erinevus oli 14 mutatsiooni (MON7 ja MON2). Teise haru liikmed erinesid üksteisest 1–7 mutatsiooni võrra, kus kõige suurem erinevus oli 15 mutatsiooni (MON9 ja MON1/MON3). Üksteisest olid kahe haru haplotüübid eraldatud minimaalselt 16 mutatsiooni võrra.

3.1.2. Fülogeneesipuu

Laiendatud andmestiku 174 proovi jaotusid nelja klaadi (Joonis 4.): G7a (sinine), G7b (kollane), Mongoolia haplogrupp (hall) ja G6 (roheline). Kõigi nende klaadide jaotused olid kõrge toetusega (bs > 95%).

G7a klatri siseselt klasterdusid geograafilise asukoha põhiliselt vaid kahe riigi proovid - Prantsusmaa ja Argentiina. Prantsusmaa proovid moodustasid ühe kõrge toetusega (bs = 99%) monofüleetilise klaadi, aga Argentiina proovid moodustasid kaks kõrge toetusega (bs > 95%) monofüleetilist klaadi, millest vaid üks oli klasterdunud geograafilise asukoha alusel, kuna teises esines ka proov Poolast (POL8). Teised G7a klatri proovid samuti ei jaotunud geograafilise asukoha alusel. G7b klastris oli kõrge toetusega (bs = 99%) monofüleetiline

klaad vaid Korsika (Prantsusmaa)/Sardiinia (Itaalia) klaster. G6 klastri korral samuti puudus geograafilise asukoha põhiline klasterdumine. Kõrge toetusega (bs = 95%) oli divergentsete Iraani haplotüüpide lahknemine ülejäänud G6 klastrist.



Joonis 4. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotüüpide G6 ja G7 proovidest (n = 174) suurima tõepära meetodiga koostatud fülogeneesipuu. Haplogrupp G7a on märgitud sinises,

G7b haplogrupp kollases, Mongoolia haplogrupp hallis ja G6 haplogrupp rohelises. Puul on kujutatud toetused üle 80%.

3.1.3. Populatsiooni neutraalsuse ja mitmekesisuse indeksid

Kui haplotüübi mitmekesisuse indeksi H_d väärtus oli genotüübil G7 kõrge (0,972), siis genotüübil G6 oli see indeks väiksem ($H_d = 0,949$). Nukleotiidide mitmekesisus oli G7 korral $\pi = 0,00158$, kus G6 korral oli see märgatavamalt väiksem ($\pi = 0,00063$). Mongoolia haplogrupi H_d väärtus oli väiksem ($H_d = 0,735$), kuid nukleotiidide mitmekesisus oli kõrgem kui genotüübil G6 ($\pi = 0,00108$). Haplogrupi G7a mitmekesisusindeksite väärtused olid kõrged ($H_d = 0,966$, $\pi = 0,00127$). G7b indeksi väärtused olid märgatavalt madalamad ($H_d = 0,853$, $\pi = 0,00091$), kuid siiski kõrgema haplotüübi mitmekesisusega kui Mongoolia haplogrupp.

G7 klatri siseselt oli kõige kõrgema mitmekesisusindeksiga Poola proovid ($H_d = 0,972$) ja kõige väiksema mitmekesisusega Argentiina proovid ($H_d = 0,870$). Prantsusmaa proovide mitmekesisus oli ($H_d = 0,904$) ja Mehhiko proovide korral ($H_d = 0,933$). Nukleotiidide mitmekesisuse väärtustest oli kõige kõrgem Prantsusmaa proovidel ($\pi = 0,00139$) ja kõige madalam Argentiina proovidel ($\pi = 0,00083$).

G6 klatri oli kõrgeima haplotüübi mitmekesisusega Iraani ja Nigeeria proovid ($H_d = 1$). Argentiina proovide väärtused olid samuti kõrged ($H_d = 0,943$), kus Sudaani proovidel oli aga märgatavalt madalam väärtus ($H_d = 0,385$). Nukleotiidide mitmekesisuse korral oli suurima väärtusega Iraani proovid ($\pi = 0,00101$), kus teiste väärtused jäid alla 0,00050. Kõige väiksema nukleotiidide mitmekesisuse väärtusega olid Sudaani proovid ($\pi = 0,00015$).

Tabel 1. Haplotüübi ja nukleotiidi mitmekesisus indeksid *Echinococcus granulosus sensu lato* genotüüpide G6, G7 ja Mongoolia haplogrupi proovidele mitokondri genoomi järjestuste põhjal (12155-121615 ap). n - proovide arv, H_n - haplotüüpide arv, H_d - haplotüübi mitmekesisus, π - nukleotiidide mitmekesisus, σ - standardhälve.

Mitmekesisus				
	n	H_n	$H_d \pm \sigma$	$\pi \pm \sigma$
Genotüüp				
G6	50	35	$0,949 \pm 0,024$	$0,00063 \pm 0,00007$
G7	107	52	$0,972 \pm 0,006$	$0,00158 \pm 0,00005$
Mongoolia	17	9	$0,735 \pm 0,117$	$0,00108 \pm 0,00018$

G7 haplogrupid				
G7a	85	43	0,966 ± 0,008	0,00127 ± 0,00004
G7b	22	9	0,853 ± 0,048	0,00091 ± 0,00017
G6 riigid				
Argentiina	15	11	0,943 ± 0,045	0,00031 ± 0,00007
Iraan	8	8	1 ± 0,063	0,00101 ± 0,00016
Nigeeria	5	5	1 ± 0,126	0,00049 ± 0,00013
Sudaan	14	3	0,385 ± 0,149	0,00015 ± 0,00006
G7 riigid				
Argentiina	36	11	0,870 ± 0,032	0,00083 ± 0,00008
Prantsusmaa	37	15	0,904 ± 0,024	0,00139 ± 0,00007
Mehhiko	10	8	0,933 ± 0,077	0,00088 ± 0,00015
Poola	9	8	0,972 ± 0,064	0,00115 ± 0,00014

* statistiliselt oluline ($p \leq 0,05$)

** statistiliselt oluline ($p \leq 0,01$)

3.1.4. Populatsioonide eristumine

Kõik leitud F_{st} väärtused olid statistiliselt olulised ($p < 0,00001$), väljaarvatud genotüübis G6 esinenud Iraani ja Nigeeria proovide vaheline väärtus. Genotüüpide G6 ja G7 proovide vaheline geneetilise diferentseerumise indeksi väärtus oli kõrge ($F_{st} = 0,652$). F_{st} väärtus oli Mongoolia haplogrupi ja genotüübi G6 ($F_{st} = 0,699$) vahel kõrgem kui Mongoolia haplogrupi ja genotüübi G7 ($F_{st} = 0,586$) proovide vahel.

Haplogruppidest olid F_{st} väärtused kõige suuremad G6/G7b ($F_{st} = 0,762$) ja G6/G7a ($F_{st} = 0,721$) proovide vahel. Haplogruppide G7a ja G7b üksteise vaheline F_{st} oli oodatavalt kõige madalam ($F_{st} = 0,495$). Mongoolia haplogrupi proovide korral oli G7a ja G7b vahelised väärtused sarnased, kus Mongoolia/G7a F_{st} väärtus oli 0,660 ja Mongoolia/G7b oli 0,668.

Riikide proovide vahelistest väärtustest oli kõige kõrgem F_{st} G6 klastris Argentiina ja Sudaani proovide vahel ($F_{st} = 0,550$) ja G7 klastris Prantsusmaa ja Argentiina proovide vahel ($F_{st} = 0,410$). Genotüübi G6 klatri Sudaani proovid olid üldiselt kõige kõrgemate väärtustega, kus F_{st} väärtused jäid vahemiku 0,400 – 0,550. G6 klastris oli kõige madalam statistiliselt oluline F_{st} väärtus Argentiina ja Nigeeria proovide vahel ($F_{st} = 0,263$). G7 klastris oli kõige madalam F_{st} väärtus Poola ja Mehhiko ($F_{st} = 0,164$) proovide vahel.

Tabel 2. Geneetilise diferentseerumise indeks *Echinococcus granulosus sensu lato* genotüüpide G6, G7 ja Mongoolia haplogruppi proovide vahel mitokondri genoomi järestuste põhjal (12155-121615 ap). Fst - geneetilise diferentseerumise indeks.

Genotüübiti	Riigiti				
	Fst	G6	Fst	G7	Fst
Mongoolia/G6	0,69932	IRN/ARG	0,25441	FRA/POL	0,31769
Mongoolia/G7	0,58621	IRN/SDN	0,40011	FRA/ARG	0,40975
G6/G7	0,65160	IRN/NGA	0,10464 ^o	FRA/MEX	0,28364
G7a/G7b	0,47959	ARG/SDN	0,54975	POL/ARG	0,32821
G6/G7a	0,72102	ARG/NGA	0,26277	POL/MEX	0,16432
G6/G7b	0,76192	SDN/NGA	0,41347	ARG/MEX	0,31096
Mongoolia/G7a	0,66065				
Mongoolia/G7b	0,66895				

^o statistiliselt mitteoluline ($p \geq 0,05$)

4. Arutelu

Käesolevas magistritöös analüüsiti inimtervise seisukohast oluliste *E. granulosus s.l.* genotüüpide G6 ning G7 geneetilist mitmekesisust ja fülogeograafiat pea täismitokondriaalsete järjestuste alusel, mille tulemusena täienesid oluliselt teadmised antud genotüüpide sisestest ning vahelistest geneetilisest seostest. Varasemalt on genotüüpide G6 ning G7 mitmekesisust eelkõige uuritud üksikute mitokondriaalsete geenide või geenifragmentide alusel (nt. *cox1*, 366 ap või 1608 ap), ning seejuures täismitokondriaalset DNA-d on kasutanud harva (Laurimäe *et al.* 2018). Sellest tulenevalt on lahendamata jäänud mitmed küsimused. Nendest olulisemateks on nii antud genotüüpide levik ja kompleksete fülogeneetiliste seoste parem mõistmine kui ka seni tuvastamata divergentsete haplogruppide olemasolu. Käesoleva töö tulemusena selgus, et genotüüpide G6 ja G7 geneetiline struktuur on märksa komplekssem kui varem arvatud, moodustades haplogruppe, mille genotüübiline kuuluvus on raskesti määratletav ning mille levik ulatub ka piirkodadesse, kust varasemalt pole antud geneetilisi variante tuvastatud. Hetkel ei ole veel teada, kas ja milline mõju võib nendel mitokondriaalsetel geneetistel variantidel olla parasiidi bioloogiale (nt. patogeensus, peremehe eelistus/spetsiifilisus, resistentsus ravimitele) ning kas antud mitokondriaalne geneetiline struktuur on peegeldunud ka tuumagenoomis. Samas moodustavad käesoleva töö tulemused olulise alustala edasisteks põhjalikeks analüüsideks mõistmaks paremini selle parasiidi epidemioloogiat, bioloogiat ning levikut.

Genotüüpide G6/G7 struktuuri analüüsist kõige silmapaistvam leid oli uue haplogrupi tuvastamine Mongooliast (Joonis 3.). Esimene sinna haplogruppi kuuluv täismitokondriaalne järjestus avaldati Laurimäe *et al.* (2018b) töös. Eelpool mainitud töös oli tegu üksiku prooviga Mongooliast, mille osas tõstatas küsimus, kas tegemist võis olla üksiku juhuleiuga või on see haplotüüp eraldiseisva haplogrupi osa, mille peremeeste ring ning geograafiline levik on laiem. Selle töö andmestiku analüüsil selgus, et tegemist on haplogrupiga, kuhu kuulub proove nii kitselt (MON9), inimeselt (MON10) kui ka kaamelilt. Fülogeneetilises võrgustikus (Joonis 3.) on näha, et Mongoolia haplogrupp on selgelt eristunud genotüüpidest G6 (14 mutatsiooni) ja G7 (17 mutatsiooni), positsioneerudes nende kahe vahele. Sarnaselt eristus Mongoolia haplogrupp geneetilise diferentseerumise indeksi (F_{st}) alusel, kus Mongoolia haplogrupi ja genotüübi G6 vaheline F_{st} väärtus oli 0,699 ning Mongoolia haplogrupi ja genotüübi G7 vaheline F_{st} väärtus oli 0,586. Samas fülogeneesipuul

(Joonis 4.) moodustab Mongoolia haplogrupp sōsarrühma (bs = 99%) G6 klastrile. Mongoolias on ehhinokokooos laialdaselt levinud (Jabbar *et al.* 2011; Ito *et al.* 2014; Bold *et al.* 2019), samas hetkel puuduvad teadmised Mongoolia haplogrupi rollist inimnakkuste seas. Samuti ei ole teada, kas selle haplogrupi isenditel on bioloogilisi iseārasusi ning kas ja kuidas need iseārasused võiksid mõjutada kohalikku epidemioloogilist situatsiooni. Seetõttu oleks tulevikus oluline põhjalikumalt uurida antud haplogrupi mitokondriaalset genotüüpilist kuuluvust ja levikut läbi täpsustavate fülogeneetiliste analüüside, sealhulgas kaasates antud piirkonnast ja lähiregioonidest rohkem proove ning kasutades erinevaid üksteist täiendavaid fülogeneesi meetodeid.

Antud töös tuvastati esmakordselt G7b haplogruppi kuuluvaid proove Türgist, Iraanist ja Mongooliast, kus varasemalt on leitud G7b proove vaid Itaalia maismaal (Laurimäe *et al.* 2019b) ning Sardiinia ja Korsika (Prantsusmaa) saartel (Laurimäe *et al.* 2018b). Mongooliast on genotüübi G7 isendeid varem täheldatud (Bold *et al.* 2019), kuid siin töös on sealt riigist esmakordselt tuvastatud haplogruppi G7b kuuluvaid proove. Türgi ja Iraani korral on samuti genotüübi G7 isendeid varem identifitseeritud (Šnábel *et al.* 2009; Mirbadie *et al.* 2019), kuid erinevalt Mongooliast leidub Lähis-Idas vähemal arvul genotüübi G7 eelistatud peremeest, kodusiga (Gilbert *et al.* 2018). See kajastub genotüübi G7 levikus, kus see on selles regioonis pigem haruldane leid (Sadjjadi 2006; Lymbery *et al.* 2015a). Sellest hoolimata on Türgis aastate jooksul leitud üksikuid genotüübi G7 proove inimestest ja lammastest (Šnábel *et al.* 2009; Eryildiz ja Sakru 2012; Mehmood *et al.* 2020), ning samuti on Iraanist hiljuti leitud genotüüpi G7 ka kitsedelt (Fadakar *et al.* 2015). Oluline on aga seejuures märkida, et genotüübile G7 on nii kitsed kui lambad pigem ebatüüpilised vaheperemehed (Romig *et al.* 2017), kelles G7 isendid tavaliselt ei moodusta nakkusvõimelisi tsüste ning ei panusta seetõttu parasiidi elutsükli jätkamisele. Iraanis aga leidub koeri, kes on samuti nakatunud genotüübiga G7 (Mirbadie *et al.* 2019), mis viitab tõenäoliselt toimivale kiskja-vaheperemees tsüklile ja seeläbi ühe või mitme sobiliku vaheperemeesliigi olemasolule antud regioonis. Lisaks siin töös tuvastatud nakatunud lambale, võib potentsiaalseks vaheperemeheks antud piirkonnas olla ka kits, kellelt on Kreekast varasemates töödes tuvastatud genotüübi G7 nakkusvõimelisi tsüste (Varcasia *et al.* 2007). Alternatiivselt võib Lähis-Idas vaheperemeheks olla ka metssiga, kellelt on varem leitud genotüübi G7 nakkusvõimelisi tsüste Euroopas (Onac *et al.* 2013; Sgroi *et al.* 2019). Metsloomadelt võib genotüüp G7 jõuda koerte kaudu koduloomade ja inimesteni. Seega

mõistmaks paremini antud piirkonnas selle genotüübi levikut ja peremeesteringi, oleks oluline uurida ka metssigade ja kitsede rolli nakkuse levikul.

Siin töös tuvastati genotüübil G6 kõrgem geneetiline mitmekesisus kui seda oli varem täheldatud ($Hd = 0,949$, $\pi = 0,00063$) Laurimäe *et al.* (2018b) töös ($Hd = 0,828$, $\pi = 0,00040$), mis võib viidata veel avastamata mitmekesisusele. Kuigi antud tulemus oli mõnevõrra oodatav, kuna käesolevas töös kaasati pea täispika mitokondriaalse DNA analüüsi varasemalt sarnases analüüsis katmata jäänud piirkondadest pärit genotüübi G6 proove (ntks Argentiina), siis käesoleva töö tulemus siiski laiendas teadmisi seni kaardistamata geneetilisest mitmekesisusest antud genotüübil. Samuti leiti paremini defineeritud struktuur genotüübis G6 (Joonis 3.), kus proovid moodustasid tiheda klastri. Klastrisiselt olid proovid väga sarnased, mida toetas ka G6 klastri proovide vahelised F_{st} väärtused (Tabel 2.) Klastris geograafilise asukoha põhine jaotumine enamasti puudus, ka geograafiliselt eraldatud Argentiina ja Aafrika riikide proovid olid sarnased. See nähtus võib peegeldada ajaloolist loomakaubandust nende riikide vahel (Andresiuk *et al.* 2013; Laurimäe *et al.* 2016). Sarnasele järeltulele on jõutud ka teiste genotüüpide ja riikide proovide geneetiliste mustrite uurimisel (Kinkar *et al.* 2017, 2018a; Laurimäe *et al.* 2018b). G6 klastris esines ka kolm divergentset Iraani proovi (IRN1,2,4), mis jäid teistest proovidest minimaalselt 11-15 mutatsiooni eemale. Fülogeneesipuul (Joonis 4.) moodustasid nad kõrge toetusega ($bs = 95\%$) monofüleetilise sõsarrühma ülejäänud G6 klastri proovidele, mis võib viidata võimaliku divergentse populatsiooni olemasolule.

Käesolev magistritöö laiendas oluliselt teadmisi genotüüpide G6 ja G7 geneetilisest mitokondriaalsest mitmekesisusest, struktuurist ja divergentsetest haplogruppidest. Antud töös tuvastati uus Mongoolia haplogrupp, täiendati oluliselt teadmisi G7b haplogrupi levikust ja süvendati arusaama genotüübi G6 mitmekesisusest. Selle töö tulemused moodustavad ühe olulise osa selle parasiidi epidemioloogilistest teadmistest, samas need tulemused loovad ka olulise taustainfo, millele saavad toetuda tuleviku uuringud. Need uuringud võivad peale mitokondri andmestiku ka kaasata tuumagenoomi andmestiku ja seeläbi leida, kas mitokondriaalne mitmekesisus kajastub ka tuumagenoomis, millele toetudes saaks edasi uurida selle parasiidid bioloogilisi iseärasusi. Tulevikus on plaanis jätkata ehhinokokkide mitokondriaalse genoomi ja tuumagenoomi uuringutega, mille andmed võiks võimaldada eelpool kirjeldatud edasisi põhjalike uuringuid, mis tulevikus võivad aidata ravimite ja ohjamisstrateegiate loomisel.

Kokkuvõte

Pöistang-paeluss (*Echinococcus granulosus sensu lato*) on kosmopoliitse levikuga liigikompleks, milles eristatakse viit liiki, mis jagunevad kaheksaks genotüübiks (mitokondriaalse DNA makrohaplogruppi). Need parasiidid põhjustab eluohtlikku zoonootilist haigust nimega tsüstiline ehinokokkoos, millega on nakatunud maailmas hinnanguliselt kuni 1 miljon inimest. Selles liigikompleksis, on genotüübid G6 ja G7 ühed kõige tüüpilisemad inimnakkuste põhjustajad, kuid nende geneetilise mitmekesisuse ja fülogeograafia kohta on teavet vähe.

Selle töö eesmärgiks oli analüüsida genotüüpide G6 ja G7 geneetilist mitmekesisust ja fülogeograafiat, kaasates analüüsi ka proove varasemalt vähe uuritud regioonidest. Samuti oli eesmärk analüüsida potentsiaalsete haplogruppide olemasolu regioonides, kust varasemalt on tuvastatud divergentseid haplotüüpe.

Antud töös analüüsiti genotüüpide G6 ja G7 geneetilist mitmekesisust, struktuuri ja fülogeograafiat kasutades pea-täismitokondriaalseid DNA järjestusi (12156–12163 ap). Sekveneeritud proove oli 71 ning need pärinesid seitsmest riigist Euroopas, Aasias ja Lõuna-Ameerikas. Proovide võrdluseks ja andmete globaalsesse konteksti paigutamiseks loodi laiendatud andmestik varasemalt avaldatud täismitokondriaalsetest järjestustest ning lõplik analüüsiks kasutatud andmestiku suurus oli 174 pea täielikku mitokondriaalse DNA järjestust.

Käesoleva magistritöö tulemusel selgus, et genotüüpide G6/G7 mitmekesisus oli märgatavalt suurem kui seda varem oli tuvastatud ning gruppide sisesed ja vahelised struktuurid olid keerukad. Mongooliast tuvastati uus haplogrupp, mis erines nii genotüübist G6 kui ka G7, ning mille genotüübilist kuuluvust oli seetõttu keeruline määrata. Genotüübi G6 korral leiti, et klatri siseselt oli proovid väga sarnased – ka geograafiliselt kauged Argentiina ja Aafrika riikide proovid sarnanesid üksteisele. Türgist, Iraanist ja Mongooliast leiti esmakordselt proove haplogrupist G7b – varasemalt on G7b haplogrupi kuuluvaid proove identifitseeritud vaid Vahemeremaadest.

Tulevikus oleks oluline uurida, kas erinevatel haplogruppidel ja/või genotüüpidel võib esineda erisusi sellistes bioloogilistes tunnustes nagu näiteks resistentsus ravimitele, peremeesliikide eelistus ja/või patogeensus. Seega on käesolev magistritöö oluliseks aluseks edasistele uuringutele selle parasiidi epidemioloogia paremaks mõistmiseks.

Summary

Genetic diversity and phylogeography of *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6 and G7

Anti Biedermann

Echinococcus granulosus sensu lato is a cosmopolitan species complex, in which five species are recognized, which in turn are divided into eight genotypes (mitochondrial DNA macrohaplogroups). This species complex is the cause of a life-threatening zoonotic disease known as cystic echinococcosis (CE), which affects an estimated 1 million people worldwide. Genotypes G6 and G7 are one of the most common causes of human CE, yet relatively little is known about the genetic diversity and phylogeography of these genotypes.

The aim of this thesis was to assess the genetic diversity and phylogeography of genotypes G6 and G7 and to also include samples from regions that have so far not been comprehensively studied. An additional aim was to explore whether the previously identified single divergent haplotype represents a distinct haplogroup.

In this thesis, the genetic diversity, structure and phylogeography of genotypes G6 and G7 was explored using near-complete mitochondrial genome sequences (12156-12163 bp). A total of 71 samples were sequenced which originated from seven different countries from Europe, Asia and South America. To analyze and compare the acquired data in a global context, an expanded dataset was compiled from previously published G6/G7 mitochondrial genome sequences, bringing the total number of sequences included in the analysis to 174.

The current thesis showed that the genotypes G6 and G7 are significantly more genetically diverse and that inter- and intra-cluster structures were far more complex than previously thought. Several previously undetected divergent haplotypes emerged alongside a new haplogroup from Mongolia, which positioned between G6 and G7, and for which the genotypic identity remains to be determined. Additionally, samples belonging to a divergent haplogroup of genotype G7 (namely G7b) were identified from Turkey, Iran and Mongolia. This haplogroup has previously only been identified from the Mediterranean region. In the future, it would be interesting to assess whether these divergent haplogroups and/or genotypes might have an impact on the biology and epidemiology of this parasite.

Tänuavaldused

Suured tänud juhendajatele Teivi, Liina ja Urmas, kelle nõuanded ja toetus võimaldasid selle töö valmimise.

A special thanks to our collaborators across the world for providing valuable Echinococcus samples: L. Kamenetzky, T. Romig, M. Wassermann, J. Karamon, S. Nasibi, M.Harandi, S. Housseem, A. Laatamna, S.V. Soriano, H. Ahmad, A. Varcasia, D.Yasur-Landau, N. Mahmood and G. Umhang.

Kasutatud kirjandus

- Addy F, Wassermann M, Kagendo D, et al (2017) Genetic differentiation of the G6/7 cluster of *Echinococcus canadensis* based on mitochondrial marker genes. *International Journal for Parasitology* 47:923–931.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.003>
- Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW (2014) *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans – review of current knowledge. *International Journal for Parasitology* 44:9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008>
- Alvi MA, Li L, Saqib M, et al (2021) Serologic evidence of *Echinococcus granulosus* in slaughterhouses in Pakistan: global alarm for butchers in developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries* 15:861–869.
<https://doi.org/10.3855/jidc.14029>
- Andresiuk MV, Gordo FP, Saarma M, et al (2013) *Echinococcus granulosus* genotype G1 dominated in cattle and sheep during 2003–2006 in Buenos Aires province, an endemic area for cystic echinococcosis in Argentina. *Acta Tropica* 127:136–142.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.008>
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Baptista LSG, Laurimäe T, Muchaamba G, et al (2023) First isolation of *Echinococcus granulosus sensu lato* Genotype 7 in the Archipelago of Cape Verde. *Parasitology* 1–38. <https://doi.org/10.1017/S003118202300046X>
- Bardosh KL, Berbri IE, Ducrotoy M, et al (2016) Zoonotic Encounters At The Slaughterhouse: Pathways And Possibilities For The Control Of Cystic Echinococcosis In Northern Morocco. *Journal of Biosocial Science* 48:S92–S115.
<https://doi.org/10.1017/S0021932015000486>
- Bold B, Boué F, Schindler C, et al (2019) Evidence for camels (*Camelus bactrianus*) as the main intermediate host of *Echinococcus granulosus sensu lato* G6/G7 in Mongolia.

Parasitology Research 118:2583–2590. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06391->

x

- Borhani M, Fathi S, Lahmar S, et al (2020) Cystic echinococcosis in the Eastern Mediterranean region: Neglected and prevailing! PLOS Neglected Tropical Diseases 14:e0008114. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008114>
- Bowles J, Blair D, McManus DP (1992) Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54:165–173. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90109-w](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90109-w)
- Bowles J, Mcmanus DP (1994) Molecular Genetic Characterization of the Cervid Strain (‘Northern form’) of *Echinococcus Granulosus*. *Parasitology* 109:215–221. <https://doi.org/10.1017/S0031182000076332>
- Brunetti E, Garcia HH, Junghanss T, on behalf of the members of the International CE Workshop in Lima P (2011) Cystic Echinococcosis: Chronic, Complex, and Still Neglected. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5:e1146. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001146>
- Budke CM, Casulli A, Kern P, Vuitton DA (2017) Cystic and alveolar echinococcosis: Successes and continuing challenges. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005477>
- Cardona GA, Carmena D (2013) A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Veterinary Parasitology* 192:10–32. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.027>
- Carmena D, Cardona GA (2013) Canine echinococcosis: Global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica* 128:441–460. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.002>
- Casulli A, Abela-Ridder B, Petrone D, et al (2023) Unveiling the incidences and trends of the neglected zoonosis cystic echinococcosis in Europe: a systematic review from the MEmE project. *The Lancet Infectious Diseases* 23:e95–e107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00638-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00638-7)

- Casulli A, Interisano M, Sreter T, et al (2012) Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 12:377–383.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.014>
- Dakkak A (2010) Echinococcosis/hydatidosis: A severe threat in Mediterranean countries. *Veterinary Parasitology* 174:2–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.009>
- Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, et al (2017) Chapter Six - Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ (eds) *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp 315–493
- Eckert J, Deplazes P, Craig PS, et al (2001) Echinococcosis in animals: clinical aspects, diagnosis and treatment. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern 72–99
- Eryildiz C, Sakru N (2012) Molecular Characterization of Human and Animal Isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace Region, Turkey. *Balkan Medical Journal* 2012:261–267. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2012.072>
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50
- Fadakar B, Tabatabaei N, Borji H, Naghibi A (2015) Genotyping of *Echinococcus granulosus* from goats and sheep indicating G7 genotype in goats in the Northeast of Iran. *Veterinary Parasitology* 214:204–207.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.029>
- Gilbert M, Nicolas G, Cinardi G, et al (2018) Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in 2010. *Scientific Data* 5:180227.
<https://doi.org/10.1038/sdata.2018.227>
- Guerra D, Armua-Fernandez MT, Silva M, et al (2013) Taeniid species of the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) in Portugal with special focus on *Echinococcus* spp.

- International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife 2:50–53.
<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.007>
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series 41:95–98
- Hua R-Q, Du X-D, He X, et al (2022) Genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu lato* in China: Epidemiological studies and systematic review. *Transboundary and Emerging Diseases* 69:e1382–e1392. <https://doi.org/10.1111/tbed.14469>
- Ito A, Chuluunbaatar G, Yanagida T, et al (2013) *Echinococcus* species from red foxes, corsac foxes, and wolves in Mongolia. *Parasitology* 140:1648–1654.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013001030>
- Ito A, Dorjsuren T, Davaasuren A, et al (2014) Cystic Echinococcoses in Mongolia: Molecular Identification, Serology and Risk Factors. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8:e2937. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002937>
- Jabbar A, Narankhajid M, Nolan MJ, et al (2011) A first insight into the genotypes of *Echinococcus granulosus* from humans in Mongolia. *Molecular and Cellular Probes* 25:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.11.001>
- Kedra AH, Z S, V.v T, et al (1999) Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* 4:
- Kilinc SG, Celik F, Kesik HK, et al (2023) Co-infection of *Echinococcus equinus* and *Echinococcus canadensis* (G6/7) in a gray wolf in Turkey: First report and genetic variability of the isolates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 20:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.01.006>
- Kinkar L, Laurimäe T, Acosta-Jamett G, et al (2018a) Global phylogeography and genetic diversity of the zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G1. *International Journal for Parasitology* 48:729–742.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.006>

- Kinkar L, Laurimäe T, Balkaya I, et al (2018b) Genetic diversity and phylogeography of the elusive, but epidemiologically important *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G3. *Parasitology* 145:1613–1622.
<https://doi.org/10.1017/S0031182018000549>
- Kinkar L, Laurimäe T, Sharbatkhori M, et al (2017) New mitogenome and nuclear evidence on the phylogeny and taxonomy of the highly zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu stricto*. *Infection, Genetics and Evolution* 52:52–58. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.023>
- Knapp J, Nakao M, Yanagida T, et al (2011) Phylogenetic relationships within *Echinococcus* and *Taenia* tapeworms (Cestoda: Taeniidae): An inference from nuclear protein-coding genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:628–638.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.022>
- Kumar S, Stecher G, Li M, et al (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laurimäe T, Kinkar L, Andresiuk V, et al (2016) Genetic diversity and phylogeography of highly zoonotic *Echinococcus granulosus* genotype G1 in the Americas (Argentina, Brazil, Chile and Mexico) based on 8279bp of mtDNA. *Infection, Genetics and Evolution* 45:290–296. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.09.015>
- Laurimäe T, Kinkar L, Moks E, 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.
<https://doi.org/10.1017/S0031182018000719>
- Laurimäe T, Kinkar L, Moks E, et al (2023) Exploring the genetic diversity of genotypes G8 and G10 of the *Echinococcus canadensis* cluster in Europe based on complete mitochondrial genomes (13 550–13 552 bp). *Parasitology* 1–7.
<https://doi.org/10.1017/S0031182023000331>
- Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, et al (2018b) The benefits of analysing complete mitochondrial genomes: Deep insights into the phylogeny and population structure

- of *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes G6 and G7. *Infection, Genetics and Evolution* 64:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.016>
- Laurimäe T, Kinkar L, Romig T, et al (2019a) Analysis of *nad2* and *nad5* enables reliable identification of genotypes G6 and G7 within the species complex *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Infection, Genetics and Evolution* 74:103941. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103941>
- Laurimäe T, Kinkar L, Varcasia A, et al (2019b) First detection of zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus sensu lato* genotype G7 in continental Italy. *Parasitology Research* 118:2193–2201. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06346-2>
- Lavikainen A, Lehtinen MJ, Meri T, et al (2003) Molecular genetic characterization of the Fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 127:207–215. <https://doi.org/10.1017/S0031182003003780>
- Lymbery AJ (2017) Chapter Three - Phylogenetic Pattern, Evolutionary Processes and Species Delimitation in the Genus *Echinococcus*. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ (eds) *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp 111–145
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RCA (2015a) *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends in Parasitology* 31:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.003>
- Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RCA (2015b) Response to Nakao *et al.* - is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends in Parasitology* 31:343–344. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.05.005>
- McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB (2003) Echinococcosis. *The Lancet* 362:1295–1304. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14573-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14573-4)
- Mehmood S, Simsek S, Celik F, et al (2020) Molecular survey on cattle and sheep hydatidosis and first detection of *Echinococcus canadensis* (G6/G7) in sheep in Turkey. *Parasitology* 147:1055–1062. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000785>

- Mirbadie SR, Najafi Nasab A, Mohaghegh MA, et al (2019) Molecular phylodiagnosis of *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Taenia hydatigena* determined by mitochondrial Cox1 and SSU-rDNA markers in Iranian dogs: Indicating the first record of pig strain (G7) in definitive host in the Middle East. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 65:88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.05.005>
- Moro P, Schantz PM (2009) Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases* 13:125–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.03.037>
- Nakao M, Lavikainen A, Hoberg E (2015) Is *Echinococcus intermedius* a valid species? *Trends Parasitol* 31:342–343. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.04.012>
- Nakao M, McMANUS DP, Schantz PM, et al (2006) A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134:713–722. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001934>
- Nakao M, Yanagida T, Konyaev S, et al (2013) Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology* 140:1625–1636.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013000565>
- Onac D, Györke A, Oltean M, et al (2013) First detection of *Echinococcus granulosus* G1 and G7 in wild boars (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) in Romania using PCR and PCR-RFLP techniques. *Veterinary Parasitology* 193:289–291.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.044>
- Romig T, Deplazes P, Jenkins D, et al (2017) Chapter Five - Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ (eds) *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp 213–314
- Romig T, Ebi D, Wassermann M (2015) Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Veterinary Parasitology* 213:76–84.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.035>

- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, et al (2009) A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology* 136:317–328. <https://doi.org/10.1017/S0031182008005453>
- Sadjjadi SM (2006) Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *Parasitology International* 55:S197–S202. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.030>
- Schneider R, Gollackner B, Schindl M, et al (2010) *Echinococcus canadensis* G7 (Pig Strain): An Underestimated Cause of Cystic Echinococcosis in Austria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82:871–874. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0639>
- Scott JC, Stefaniak J, Pawlowski ZS, McManus DP (1997) Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology* 114 (Pt 1):37–43. <https://doi.org/10.1017/s0031182096008062>
- Sgroi G, Varcasia A, Dessi G, et al (2019) Cystic echinococcosis in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Italy: Epidemiological survey and molecular characterization. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 9:305–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.04.013>
- Šnábel V, Altintas N, D'Amelio S, et al (2009) Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country. *Parasitology Research* 105:145–154. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1376-2>
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

- Thompson RCA (2017) Chapter Two - Biology and Systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ (eds) *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp 65–109
- Thompson RCA (2008) The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. *Experimental Parasitology* 119:439–446.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.016>
- Thompson RCA (2013) Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology* 43:1079–1088.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.007>
- Thompson RCA, McManus DP (2001) Aetiology: parasites and life cycles. In: *Manual on Echinococcus in Humans and Animals a Public Health Problem of Global Concern*. World Health Organisation, Paris, pp 1–19
- Umhang G, Richomme C, Hormaz V, et al (2014) Pigs and wild boar in Corsica harbor Echinococcus canadensis G6/7 at levels of concern for public health and local economy. *Acta Tropica* 133:64–68.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.005>
- Uzzell T, Corbin KW (1971) Fitting discrete probability distributions to evolutionary events. *Science* 172:1089–1096. <https://doi.org/10.1126/science.172.3988.1089>
- Varcasia A, Canu S, Kogkos A, et al (2007) Molecular characterization of Echinococcus granulosus in sheep and goats of Peloponnesus, Greece. *Parasitology Research* 101:1135–1139. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0568-x>
- Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, et al (2020) International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. *Parasite* 27:41.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>
- Waddell PJ, Steel MA (1997) General time-reversible distances with unequal rates across sites: mixing gamma and inverse Gaussian distributions with invariant sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:398–414.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1997.0452>

WHO (2021) Echinococcosis. In: Fact sheet (updated May 2021).

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis>. Vaadatud:
05.04.2023

WHO (2010) First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323–354.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>

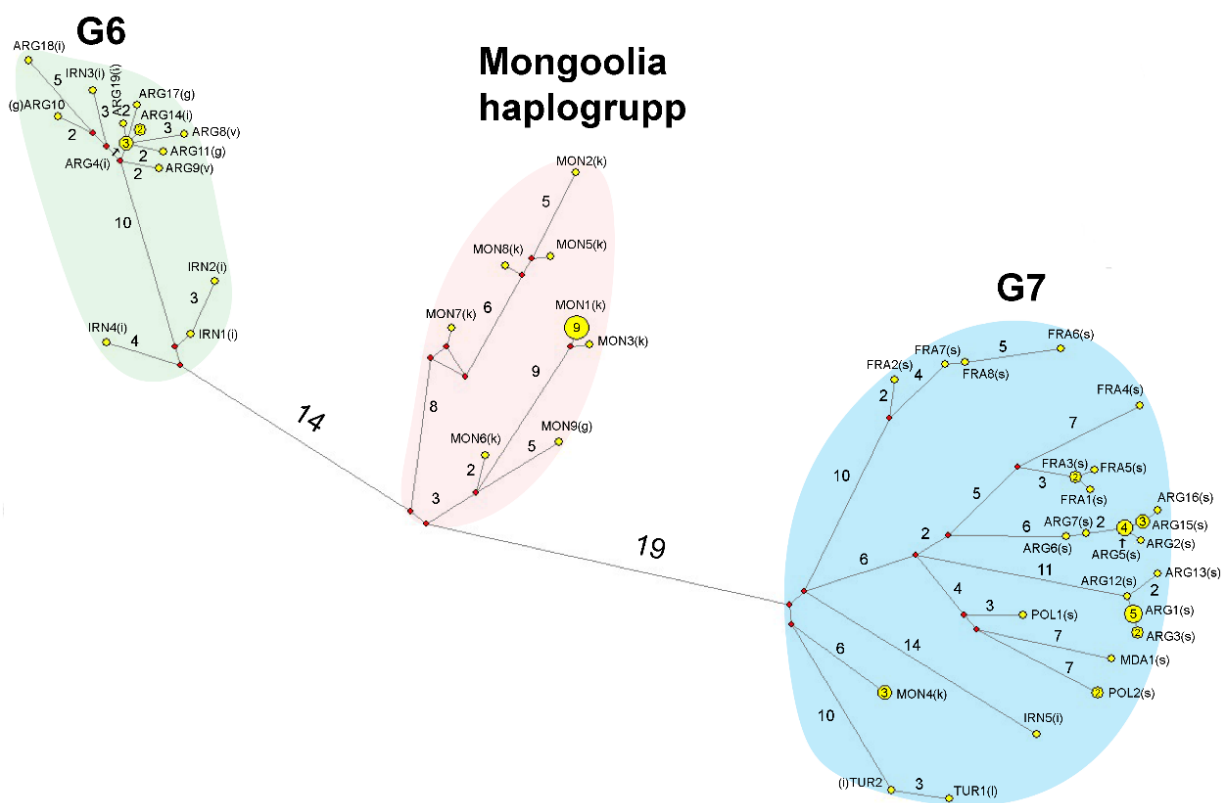
Yanagida T, Lavikainen A, Hoberg EP, et al (2017) Specific status of *Echinococcus canadensis* (Cestoda: Taeniidae) inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *International Journal for Parasitology* 47:971–979.

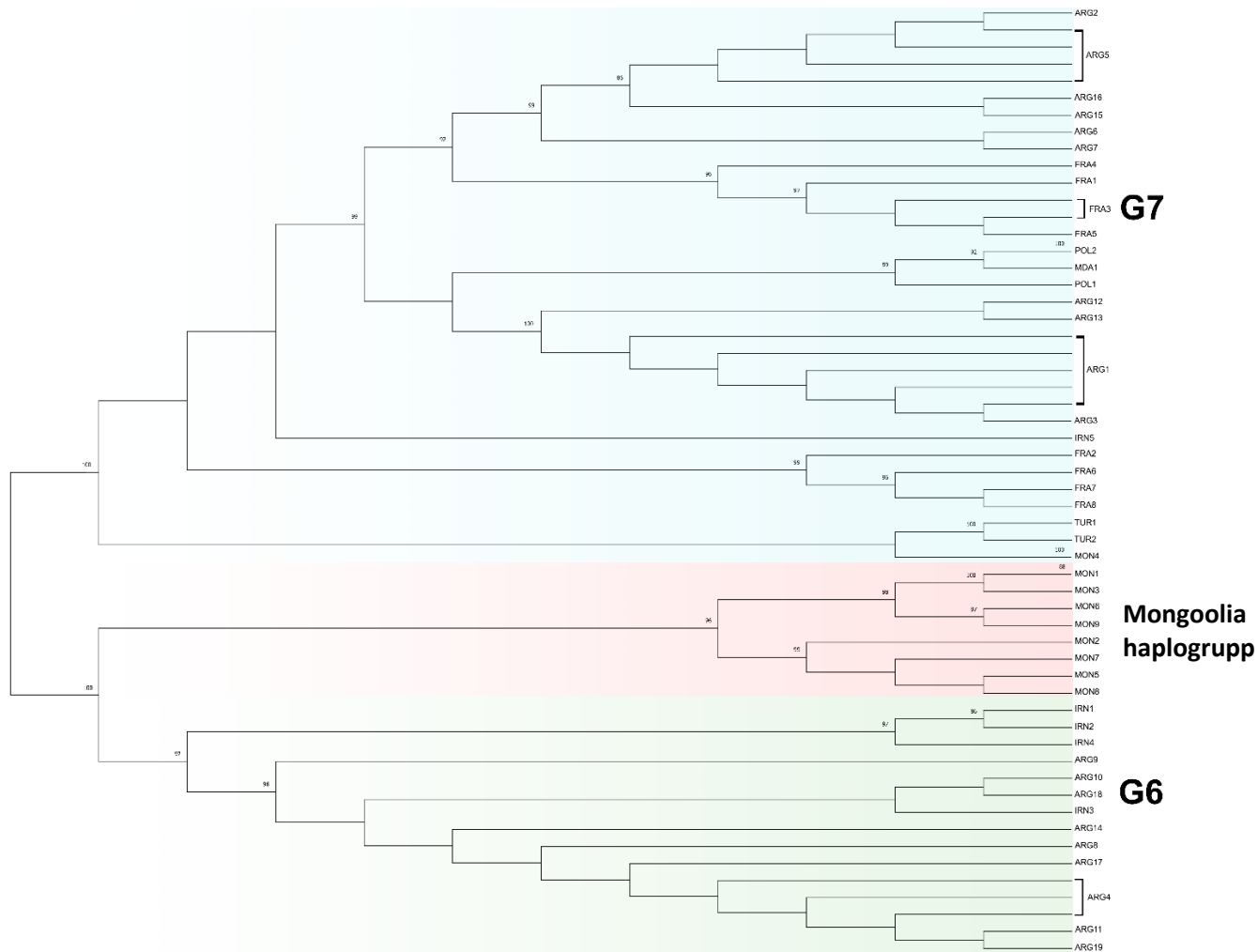
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.001>

Lisa 1. Lisajoonised

Ainult selles töös sekveneritud proovidega koostatud fülogeneetiline võrgustik (Joonis A.) ja fülogeneesipuu (Joonis B.).

Joonis (A). *Echinococcus granulosus sensu lato* genotüüpide G6 ja G7 fülogeneetiline võrgustik (n = 71). Roheline märgib genotüüp G6, punane Mongoolia haplotüüp ja sinine G7 klastrit. Haplotüübi nimed tulenevad nende päritolu riigi rahvusvahelisest ISO koodist. Nime juures sulgudes olev täht tähistab vaheperemees liiki, need on: (k) - kaamel, (g) - kits, (s) - siga, (i) - inimene, (l) - lammas, (v) - veis. Ringisisesed arvud tähistavad proovide arvu selles haplotüübis, joonte kõrval olevad arvud tähistavad mutatsioonide arvu.





Joonis (B). Fülogeneesipuu koostatud suurima tõepära meetodiga *Echinococcus granulosus sensu lato* G6 ja G7 proovides (n = 71). Genootüübi G7 klaster on märgitud sinises, Mongoolia haplogrupi klaster punases ja G6 klaster rohelises. Toetused kujutatud vaid sõlmedel, mille *bootstrap* väärtus oli kõrgem kui 80%.

Lisa 2. Ülevaatlik tabel kõikidest töös käsitletud proovidest

Tabel on Excel failina ja selles on välja toodud iga proovi laborikood, leiuriik, genotüüp, PCR tulemused, sekveneeritud proovid, proovi tüüp (tsüst, protoskooleks, DNA) ja koostööpartner, kellelt proovid olid saadud.

Lisa 3. Selles töös sekveeritud proovid

Selles töös sekveeritud proovid nimed, haplotüübi nimed, päritolu riigid ja genotüüp.

Haplotüüp	Proovi nimi	Riik	Peremees	Genotüüp
MON1	13216	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13217	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13219	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13221	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13222	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13223	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13224	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13228	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON1	13232	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON2	13229	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON3	13233	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON4	13235	Mongoolia	kaamel	G7
MON4	13238	Mongoolia	kaamel	G7
MON4	13239	Mongoolia	kaamel	G7
MON5	13236	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON6	13240	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON7	13241	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON8	13243	Mongoolia	kaamel	Mongoolia haplogrupp
MON9	13245	Mongoolia	kits	Mongoolia haplogrupp
POL1	JK1	Poola	sig	G7
POL2	JK2	Poola	sig	G7
POL2	JK3	Poola	sig	G7
IRN1	NH1	Iraan	inimene	G6
IRN2	NH2	Iraan	inimene	G6
IRN3	NH5	Iraan	inimene	G6
IRN4	NH10	Iraan	inimene	G6
IRN5	NH15	Iraan	inimene	G7
ARG1	PH14	Argentiina	sig	G7
ARG1	QH4.2	Argentiina	sig	G7
ARG1	QH7.2	Argentiina	sig	G7
ARG1	QH7.3	Argentiina	sig	G7
ARG1	QH9	Argentiina	sig	G7
ARG2	QH11	Argentiina	sig	G7
ARG3	QH13	Argentiina	sig	G7
ARG3	QH14	Argentiina	sig	G7
ARG4	QH15	Argentiina	inimene	G6
ARG4	S424	Argentiina	inimene	G6
ARG4	S426	Argentiina	inimene	G6
ARG5	QH2	Argentiina	sig	G7
ARG5	QH19,20	Argentiina	sig	G7
ARG5	QH22	Argentiina	sig	G7

ARG5	QH5	Argentiina	sig	G7
ARG6	QH4	Argentiina	sig	G7
ARG7	QH7	Argentiina	sig	G7
ARG8	S273	Argentiina	veis	G6
ARG9	S274	Argentiina	veis	G6
ARG10	S330	Argentiina	kits	G6
ARG11	S331	Argentiina	kits	G6
ARG12	S367	Argentiina	sig	G7
ARG13	S368	Argentiina	sig	G7
ARG14	S425	Argentiina	inimene	G6
ARG14	S498	Argentiina	inimene	G6
ARG15	S507	Argentiina	sig	G7
ARG15	S509	Argentiina	sig	G7
ARG15	S511	Argentiina	sig	G7
ARG16	S514	Argentiina	sig	G7
ARG17	S518	Argentiina	kits	G6
ARG18	S587	Argentiina	inimene	G6
ARG19	S588	Argentiina	inimene	G6
TUR2	TIP-9	Türgi	inimene	G7
TUR1	S44	Türgi	lammas	G7
FRA1	EM4647	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA2	EM4648	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA3	EM4649	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA3	EM4911	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA4	EM4651	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA5	EM4654	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA6	EM4655	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA7	EM4656	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
FRA8	EM4910	Prantsusmaa (Korsika)	sig	G7
MDA1	EM12203	Moldova	sig	G7

Lisa 4. Analüüsiks andmebaasist GenBank kaasatud proovid

GenBanki andmebaasist analüüsi kaasatud referentsjärjestused, proovide nimed, haplotüübi nimed, päritolu riigid, genotüüp ja allikas.

Haplotüüp	Proovi nimi	Riik	Peremees	Genotüüp	Allikas
				Mongoolia	
MON10	Sample43_Gmon	Mongoolia	inimene	haplogrupp	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
IRN6	Sample1_IRA1	Iraan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
IRN7	Sample2_IRA2	Iraan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
IRN8	Sample3_IRA2	Iraan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
IRN9	Sample4_IRA3	Iraan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG20	Sample5_ARG1	Argentiina	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG21	Sample6_ARG2	Argentiina	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG22	Sample7_ARG3	Argentiina	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample27_ARG4	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample28_ARG5	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample29_ARG5	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample30_ARG5	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample31_ARG5	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample32_ARG5	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample33_ARG6	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample36_ARG8	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample37_ARG9	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG23	Sample38_ARG10	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG24	Sample34_ARG7	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG24	Sample35_ARG7	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG25	Sample39_ARG11	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG26	Sample40_ARG12	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG26	Sample41_ARG12	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ARG26	Sample42_ARG12	Argentiina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
KEN1	Sample8_KEN1	Keenia	inimene	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
KEN2	Sample9_KEN2	Keenia	inimene	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
KEN3	Sample10_KEN3	Keenia	inimene	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample11_SUD1	Sudaan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample12_SUD1	Sudaan	lammas	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample13_SUD1	Sudaan	lammas	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample14_SUD1	Sudaan	lammas	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample15_SUD1	Sudaan	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample16_SUD1	Sudaan	veis	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample17_SUD1	Sudaan	veis	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample18_SUD1	Sudaan	veis	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample19_SUD1	Sudaan	lammas	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample20_SUD1	Sudaan	lammas	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN1	Sample21_SUD1	Sudaan	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN2	Sample22_SUD2	Sudaan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)

SDN2	Sample23_SUD2	Sudaan	kits	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SDN3	Sample24_SUD3	Sudaan	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MRT1	Sample25_MAU1	Mauritaania	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MRT2	Sample26_MAU2	Mauritaania	kaamel	G6	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX1	Sample44_MEX1	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX2	Sample45_MEX2	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX3	Sample46_MEX3	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX4	Sample47_MEX4	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX4	Sample48_MEX5	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX4	Sample49_MEX5	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX5	Sample50_MEX6	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX6	Sample51_MEX7	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX7	Sample52_MEX8	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
MEX8	Sample53_MEX9	Mehhiko	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ROU1	Sample54_ROM1	Rumeenia	lammas	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ROU2	Sample55_ROM2	Rumeenia	lammas	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
SRB1	Sample56_SER1	Serbia	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ESP1	Sample57_SPA1	Hispaania	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA9	Sample58_FRA1	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA10	Sample59_FRA2	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA11	Sample60_FRA3	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA12	Sample61_FRA4	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA12	Sample62_FRA4	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA12	Sample63_FRA4	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA13	Sample64_FRA5	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA13	Sample65_FRA5	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA13	Sample66_FRA5	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample67_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample68_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample69_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample70_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample71_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample72_FRA6	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA14	Sample73_FRA7	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA15	Sample74_FRA8	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample80_FRA9	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample81_FRA9	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample82_FRA10	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample83_FRA10	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample84_FRA10	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA16	Sample85_FRA10	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA17	Sample86_FRA11	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA17	Sample87_FRA12	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA17	Sample88_FRA13	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
FRA17	Sample89_FRA14	Prantsusmaa	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)

POL3	Sample75_POL1	Poola	inimene	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
POL4	Sample76_POL2	Poola	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
POL5	Sample77_POL3	Poola	inimene	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
POL6	Sample78_POL4	Poola	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
POL7	Sample79_POL5	Poola	inimene	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
	GenBank:				
POL8	AB235847.1	Poola	sig	G7	(Nakao <i>et al.</i> 2007)
ITA1	Sample90_ITA1	Itaalia	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
ITA1	Sample91_ITA1	Itaalia	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
LTU1	Sample92_LIT1	Leedu	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
UKR1	Sample93_UKR1	Ukraina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
UKR1	Sample94_UKR1	Ukraina	sig	G7	(Laurimäe <i>et al.</i> 2018)
	GenBank:				
CHN1	MN340039.1	Hiina	lammas	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2019)
	GenBank:				
CHN2	MN340038.1	Hiina	jakk	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2019)
	GenBank:				
NGA1	MT166290.1	Nigeeria	kaamel	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2020)
	GenBank:				
NGA2	MT166289.1	Nigeeria	kaamel	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2020)
	GenBank:				
NGA3	MT166288.1	Nigeeria	kaamel	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2020)
	GenBank:				
NGA4	MT166287.1	Nigeeria	kaamel	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2020)
	GenBank:				
NGA5	AB208063.1	Nigeeria	kaamel	G6	(Nakao <i>et al.</i> 2020)
	GenBank:				
KAZ1	MT166286.1	Kasahstan	kaamel	G6	(Ohiolei <i>et al.</i> 2020)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anti Biedermann

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Põistang-paelussi (*Echinococcus granulosus sensu lato*) genotüüpide G6 ja G7 geneetiline mitmekesisus ja fülogeograafia,

mille juhendajad on Teivi Laurimäe, Liina Kinkar ja Urmas Saarma,

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 Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, 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.

Anti Biedermann

26.05.2023