

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**  
**Katedra za parazitologiju**

**Mr Zoran R. Debeljak**

**PARAZITOLOŠKA I MOLEKULARNA  
ISPITIVANJA GENOTIPOVA I  
HAPLOTIPOVA METACESTODA  
*ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*  
*SENSU LATO* I EPIZOOTIOLOŠKE  
KARAKTERISTIKE HIDATIDOZE KOD  
RAZLIČITIH VRSTA ŽIVOTINJA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2016.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**  
**FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**  
**Department of Parasitology**

**Mr Zoran R. Debeljak**

**PARASITOLOGICAL AND MOLECULAR  
EXAMINATION OF GENOTYPES AND  
HAPLOTYPES OF METACESTODA  
*ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*  
*SENSU LATO* AND EPIZOOTIOLOGICAL  
CHARACTERISTICS OF HYDATIDOSIS  
IN DIFFERENT SPECIES OF ANIMALS**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2016.**

**Mentor:**

Dr Zoran Kulišić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Članovi Komisije:**

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Tamara Ilić, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Aleksandar Džamić, vanredni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Beograd

# **Parazitološka i molekularna ispitivanja genotipova i haplotipova metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod različitih vrsta životinja**

## **Rezime**

Sprovedenim istraživanjima definisane su patomorfološke, morfometrijske, parazitološke karakteristike metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* kao i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod 96 životinja (49 domaćih svinja, 2 divlje svinje, 25 goveda i 20 ovaca), poreklom sa teritorije različitih epizootioloških područja (20 opština) Republike Srbije. Molekularnim ispitivanjima pregledan je materijal poreklom od 52 životinje (15 goveda, 18 ovaca, 17 domaćih i 2 divlje svinje). Karakteristike ustanovljenih hidatidnih cista u potpunosti su odgovarale načinu gajenja i starosti pregledanih životinja. Fertilne ciste su ustanovljene kod 61,9% ovaca, 22,4% svinja i 8,0% goveda. Samo kod goveda sve fertilne ciste (100%) su bile vijabilne. Degenerativne ciste su ustanovljene kod svinja i ovaca, a kalcifikovane samo kod ovaca. Identifikacija vrste, genotipova i haplotipova metacestoda *E. granulosus sensu lato*, u uzorcima hidatidnih cista rađena je analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksிடaze 1 (cox1) gena. Korišćen je protokol MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite u Rimu (EU RFLP, 2010), a u okviru ispitivanja rađene su: lančana reakcija polimeraze, sekvenciranje i haplotipizacija. U okviru *E. granulosus s.l.* determinisane su 2 vrste: *E. granulosus s.s.* i *E. canadensis*, 4 genotipa (G1, G2, G3 i G7) i 7 haplotipova (Hap 1 - Hap 7). Kod domaćih svinja ustanovljen je *E. canadensis*, genotip G7, kod goveda 2 genotipa *E. granulosus s.s.*, (G1 i G3) i 5 haplotipova, kod ovaca prisustvo sva tri genotipa *E. granulosus s.s.*, (G1, G2 i G3) i 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7), a kod 2 ovce ustanovljena je mešovita infekcija, na nivou genotipa i haplotipa. Od 7 ustanovljenih haplotipova (Hap 1 - Hap 7), dva haplotipa (Hap 2 i Hap 5) su dominantni kod 40,4% životinja i zajednički su za goveda i ovce. Sekvence dobijene kod goveda i ovaca (koje pripadaju haplotipu 5 - genotip G1), 100% su identične sa haplotipom koji je globalno rasprostranjen u svetu. S obzirom na različite biološke i epizootiološke karakteristike pojedinih genotipova i haplotipova *E. granulosus s.l.*, njihova identifikacija i definisanje prevalencije predstavljaju značajan doprinos poznavanju epizootioloških i molekularnih karakteristika hidatidoze kod domaćih životinja na širem prostoru

Republike Srbije i važni su za razumevanje biološkog ciklusa parazita i predlog mera kontrole.

**Ključne reči:** *Echinococcus granulosus sensu lato*, metacestoda, svinje, goveda, ovce, molekularna epizootiologija, Republika Srbija

**Naučna oblast:**

Veterinarska medicina

**Uža naučna oblast:**

Parazitologija

**UDK broj:** 576.89:616.993:636.03

# **Parasitological and molecular examination of genotypes and haplotypes of metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* and epizootiological characteristics of hydatidosis in different species of animals**

## **Summary**

According to conducted researches we defined histological, morphometric and parasitological characteristics of metacestoda *Ecchinococcus granulosus sensu lato* as well as epizootiological characteristics of hydatidosis in 96 animals (49 domestic pigs, 2 wild boars, 25 cattle and 20 sheep) originating from the territory of different epizootiological areas (20 municipalities) of the Republic of Serbia. By molecular analysis, examined material originated from 52 animals (15 cattle, 18 sheep, 17 domestic pigs and 2 wild boars). The characteristics of established hydatid cysts completely fit the manner of cultivation and the age of examined animals. Fertile cysts are established in 61.9% of sheep, 22.4% of pigs and 0.8% of cattle. Only in cattle, all fertile cysts (100%) were viable. Degenerative cysts are established in pigs and sheep, while calcified are found only in sheep. Identification of the species, genotypes and haplotypes of metacestoda *E. granulosus sensu lato* in samples of hydatid cyst was performed by analyzing DNA sequence of mitochondrial cytochrome C-oxidase 1 (cox 1) gene. We used MI-05 protocol of European Reference Laboratory for Parasites in Rome (EU RFLP, 2010) and within examination we performed: polymerase chain reaction, sequencing and haplo standardization. Within the scope of *E. granulosus s.l.* we determined 2 species: *E. granulosus s.s.* and *E. canadensis*, 4 genotypes (G1, G2, G3 and G7) and 7 haplotypes (Hap1-Hap7). In domestic pigs we established *E. canadensis*, genotype G7; in cattle we established 2 genotypes *E. granulosus s.s.* (G1 and G3) and 4 haplotypes; in sheep there is a presence of all three genotypes: *E. granulosus s.s.* (G1, G2 and G3) and 4 haplotypes (Hap 2, Hap 3, Hap 5 and Hap 7). In two sheep we established mixed infections at the level of genotype and haplotype. From 7 established haplotypes (Hap1-Hap7), two haplotypes (Hap 2 and Hap 5) are dominant at 40,4% of animals and are common for both cattle and sheep. The sequences we got in cattle and sheep (that belong to haplotype 5 - genotype1) are 100% identical with the haplotype which is globally prevalent. Considering different biological and epizootiological characteristics of certain genotypes and haplotypes of *E. granulosus*

*s.l.*, their identification and definition of prevalence represent a significant contribution to the knowledge of epizootiological and molecular characteristics of hydatidosis in domestic animals in the wider area of the Republic of Serbia and are important for understanding the biological cycle of the parasite and proposed control measures.

**Key words:** *Echinococcus granulosus sensu lato*, metacestoda, pigs, cattle, sheep, molecular epizootiology, Republic of Serbia

**Scientific field:**

Veterinary medicine

**Field of academic expertise:**

Parasitology

**UDK number:** 576.89:616.993:636.03

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED LITERATURE</b> .....	5
2.1. Istorijat oboljenja .....	5
2.2. Etiologija oboljenja .....	6
2.2.1. Genetska raznolikost roda <i>Echinococcus</i> .....	7
2.2.2. Vrste roda <i>Echinococcus</i> .....	10
2.2.2.1. <i>Echinococcus granulosus</i> s.s. ....	12
2.2.2.2. <i>Echinococcus equinus</i> .....	12
2.2.2.3. <i>Echinococcus ortleppi</i> .....	13
2.2.2.4. <i>Echinococcus canadensis</i> .....	13
2.2.2.5. <i>Echinococcus multilocularis</i> .....	14
2.2.2.6. <i>Echinococcus shiquicus</i> .....	15
2.2.2.7. <i>Echinococcus vogeli</i> .....	16
2.2.2.8. <i>Echinococcus oligarthra</i> .....	16
2.2.2.9. <i>Echinococcus felidis</i> .....	16
2.2.3. Morfologija i razvoj <i>Echinococcus granulosus</i> .....	17
2.2.4. Morfologija i razvoj hidatidne ciste u prelaznom domaćinu .....	18
2.2.5. Otpornost razvojnih oblika parazita .....	21
2.3. Patogeneza <i>Echinococcus granulosus</i> infekcije .....	22
2.4. Epizootologija hidatidoze kod životinja .....	23
2.4.1. Izvori infekcije životinja .....	23
2.4.2. Putevi prenošenja i inficiranja životinja .....	23
2.4.3. Raširenost hidatidoze kod životinja u Srbiji.....	24
2.5. Patomorfološke promene kod životinja .....	25
2.6. Epidemiologija hidatidoze kod ljudi .....	27
2.6.1. Izvori infekcije ljudi .....	27
2.6.2. Raširenost hidatidoze kod ljudi u Srbiji .....	27
2.7. Molekularna epizootologija i epidemiologija .....	29
2.7.1. Geografska distribucija <i>Echinococcus granulosus sensu lato</i> .....	30
<b>3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA</b> .....	35
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	37
4.1. Materijal .....	37
4.1.1. Materijal poreklom od životinja - organi sa hidatidnim cistama...	37
4.1.2. Oprema za uzorkovanje i pripremu materijala za parazitološka ispitivanja .....	41
4.1.3. Uzorkovanje materijala za patomorfološka i morfometrijska ispitivanja .....	42
4.1.4. Uzorkovanje materijala za parazitološka ispitivanja .....	43
4.1.5. Uzorkovanje i priprema materijala za molekularna ispitivanja.....	43



4.2. Metode .....	46
4.2.1. Patomorfološko i morfometrijsko ispitivanje .....	46
4.2.2. Parazitološko ispitivanje .....	47
4.2.3. Molekularno ispitivanje .....	48
4.2.3.1. Oprema za izvođenje molekularnih ispitivanja .....	49
4.2.3.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	50
4.2.3.2.1. Ekstrakcija DNK i priprema smeše .....	50
4.2.3.2.2. Reakcija lančane polimeraze (PCR) .....	51
4.2.3.2.3. Identifikacija PCR proizvoda .....	51
4.2.3.2.4. Prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda .....	52
4.2.3.3. Sekvenciranje .....	53
4.2.3.3.1. Tumačenje rezultata sekvenciranja .....	54
4.2.3.4. Haplotipizacija .....	57
4.3. Mesta gde su istraživanja sprovedena .....	57
4.4. Statistička analiza podataka .....	58
<b>5. REZULTATI .....</b>	<b>59</b>
5.1. Rezultati patomorfoloških i morfometrijskih ispitivanja hidatidoze .....	59
5.1.1. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod domaćih i divljih svinja .....	59
5.1.2. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod goveda .....	61
5.1.3. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod ovaca .....	63
5.2. Rezultati parazitoloških ispitivanja hidatidoze .....	66
5.2.1. Opšti podaci od značaja u epizootiološkoj analitici .....	66
5.2.1.1. Opšti podaci za domaće i divlje svinje .....	66
5.2.1.2. Opšti podaci za goveda .....	67
5.2.1.3. Opšti podaci za ovce .....	68
5.2.2. Rezultati ispitivanja fertlnosti i vijabilnosti .....	68
5.2.2.1. Fertlnost i vijabilnost kod domaćih i divljih svinja .....	69
5.2.2.2. Fertlnost i vijabilnost kod goveda .....	70
5.2.2.3. Fertlnost i vijabilnost kod ovaca .....	71
5.3. Epizootiološka situacija hidatidoze .....	73
5.4. Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidoze .....	74
5.4.1. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod domaćih i divljih svinja .	75
5.4.2. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod goveda .....	78
5.4.3. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod ovaca .....	83
5.4.4. Zajednički haplotipovi kod goveda i ovaca .....	89
5.4.5. Mreža ustanovljenih haplotipova kod goveda i ovaca.....	90
<b>6. DISKUSIJA.....</b>	<b>92</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>106</b>
<b>8. SPISAK LITERATURE .....</b>	<b>108</b>

## 1. UVOD

Kao kompleks oboljenja, ehinokokoza i hidatidoza predstavljaju ozbiljan zdravstveni problem globalnih razmera. Svake godine broj obolelih životinja i ljudi raste geometrijskom progresijom, kako u zemljama trećeg sveta sa niskim socio-ekonomskim standardom i ekstenzivnim stočarenjem, tako i u razvijenim zemljama (Al-Salmari i sar., 2010).

Oboljenje izaziva više vrsta i genotipova parazita koji pripadaju rodu *Echinococcus*, familiji Taeniidae. Ehinokokoza je oboljenje više vrsta karnivora – stalnih domaćina (pas, mačka, vuk, lisica, šakal) koji se inficiraju ingestijom fertile hidatidne ciste poreklom iz organa prelaznog domaćina. Odrasli oblici parazita su lokalizovani u tankom crevu stalnih domaćina, iz koga se u kontinuitetu eliminišu u spoljašnju sredinu člančici sa jajima. Hidatidoza je infekcija više vrsta domaćih i divljih životinja (ovca, svinja, goveče, koza, bivo, konj, zec, jelenska i srneća divljač) i čoveka koji predstavljaju prelazne domaćine ove infekcije. Posle ingestije infektivnih jaja u različitim organima prelaznih domaćina odvija se larveni razvoj *E. granulosus*. Oboljenje kod prelaznih domaćina poznato je kao hidatidoza, hidatidna bolest ili cistična ehinokokoza. Morfološka forma koja nastaje u toku razvoja metacestode kao larvenog oblika pantljičare *E. granulosus* naziva se *E. polymorphus syn. cysticus* (hidatidna cista, ehinokokusna cista, ehinokokus, vodeni mehur, žednjak).

Pored ugrožavanja zdravlja ljudi i životinja, hidatidoza nanosi značajne ekonomske štete stočarskoj proizvodnji. Pored direktnih šteta zbog odbacivanja ogromnih količina iznutrica, indirektno štete se ogledaju u zaostajanju u rastu i razvoju, smanjenju produktivnosti i kvaliteta proizvoda, smanjenju radne sposobnosti i opšte otpornosti životinja (Pavlović i Ivanović, 2006; Tavakoli i sar., 2008).

U okviru proučavanja hidatidoze, parazitološka ispitivanja daju brojne korisne podatke u rasvetljavanju epizootičkih karakteristika bolesti. Pored određivanja prevalencije infekcije kod pojedinih vrsta životinja, ustanovljava se i značaj pojedinih vrsta



životinja u širenju infekcije. Podaci o fertilnosti, vijabilnosti, diverzitetu i prostornoj distribuciji infekcije značajni su za javno zdravlje.

Bolest je od davnina do današnjih dana poznata i značajna u mnogim delovima sveta, posebno u regijama gde postoji povezanost u gajenju pasa i domaćih životinja (Siguardarson, 2010). Kao deo Balkanske regije i Mediteranskog basena, Srbija je sastavni deo endemskog područja hidatidoze. U Balkanskoj regiji poseban značaj ima infekcija sa *E. granulosus* u okviru koje se nalazi veći broj vrsta i genotipova koji izazivaju ozbiljnu zoonozu.

U Republici Srbiji procenat domaćih životinja kod kojih je ustanovljeno prisustvo *E. polymorphus* značajno varira u odnosu na vrstu, način gajenja, geografsku lokaciju i socio-ekonomske uslove. Hidatidoza je najčešće dijagnostikovana kod ovaca, goveda i svinja, a najveća prevalencija je kod ovaca i svinja, kod kojih je najveći procenat fertilnih hidatidnih cista. Razlozi značajno različite prevalencije po vrstama su višestruki. Svinje i ovce se u velikoj meri kolju za potrebe domaćinstava bez veterinarsko-sanitarnog pregleda. Istovremeno, nizak nivo znanja stočara o ovoj parazitozi uslovljava neadekvatan postupak sa hidatidnim cistama i izostanak kontrole bolesti na ovom nivou. Sa druge strane, držanje pasa na niskom higijenskom nivou i bez adekvatne zdravstvene zaštite, kao i nekontrolisan broj ne vlasničkih pasa (pasa lotalica) omogućava zatvaranje kruga infekcije i njenog širenja sa mogućnošću inficiranja ljudi.

Savremene metode molekularnih proučavanja uzročnika dale su značajan doprinos detaljnijem rasvetljavanju epizootioloških i epidemioloških karakteristika bolesti. Genotip kompleksa *E. granulosus sensu lato (s.l.)* je raznovrstan i uspešno se determiniše analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksidaza 1 (*cox1*) gena. Za ova ispitivanja projektovani su specifični prajmeri, a proučavanjem proizvoda sekvenciranja moguće je identifikovati vrstu i genotip parazita.

Genetska raznorodnost kompleksa *E. granulosus s.l.* ogleda se u postojanju 10 genotipova (sojeva) označenih od G1 do G10. Oni imaju različiti stepen adaptacije na pojedine domaćine i nazvani su po dominantnom prelaznom domaćinu. Različiti genotipovi imaju različite, a više njih čak i iste stalne i prelazne domaćine, što zavisi od vrste i genotipa. U slučaju *E. granulosus s.l.* kompleksa, termin „soj“ odnosi se na grupu sa specifičnim genetskim razlikama. Sojevi kompleksa *E. granulosus s.l.* razlikuju se u biološkim karakteristikama, tako da njihova identifikacija značajno pomaže u razumevanju

biološkog ciklusa parazita (Parsa i sar., 2010). Neki od sojeva imaju status vrste, a u određenom broju slučajeva više sojeva pripada jednoj vrsti.

Na osnovu rezultata filogenetske analize mitohondrijalne DNK (mtDNK) vrste kompleksa *E. granulosus s.l.* su sledeće: *Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.)* – genotipovi G1–G3, *E. equinus* – genotip G4, *E. ortleppi* – genotip G5, *E. canadensis* – genotipovi G6–G10.

Vrsta *E. granulosus s.s.* uključuje više genotipova: G1 – ovčiji soj, podtip ovčijeg soja (G1BC), G2 – soj Tasmanijske ovce i G3 – bivolji soj.

Vrsta *E. canadensis* obuhvata sledeće genotipove: G6 – kamilji soj, G7 – svinjski soj, G8 – jelenski soj, G9 – soj kod ljudi i G10 – soj Norveških jelena. Genotip G9 dokazan je samo kod ljudi u Poljskoj i neki autori smatraju da je to varijanta svinjskog soja – G7.

Kompleks *E. granulosus s.l.* beleži svetsku rasprostranjenost, sa različitom geografskom distribucijom pojedinih vrsta i genotipova. Genotip G1 – ovčiji soj, je kosmopolitski rasprostranjen genotip, čije je prisustvo dokazano u: Evropi, Srednjem Istoku, Africi, Australiji, Novom Zelandu, Južnoj Americi, delovima Azije i Meksiku, kao i u zapadnom delu Severne Amerike. Genotip G2 – soj Tasmanijske ovce, dokazan je u: Aziji, Južnoj Americi, Africi i Evropi. Genotip G3 – bivolji soj, prisutan je u: Aziji, Evropi i Južnoj Americi, a genotip G4 (*E. equinus*) u: Evropi, Srednjem Istoku i Africi. Genotip – G5 (*E. ortleppi*), prisutan je u: Evropi, Africi, Južnoj Americi i delovima Azije. Genotip G6 – kamilji soj, rasprostranjen je u: Africi, Aziji, Južnoj Americi i Srednjem Istoku. Genotip G7 – svinjski soj, identifikovan je u: Evropi, Rusiji, Južnoj Americi i Meksiku, a njemu blizak genotip G9, dokazan je kod ljudi, samo u Poljskoj. Genotipovi: G8 – jelenski soj i G10 – soj norveških jelena, dokazani su u Severnoj Americi (uglavnom u Kanadi i severnim delovima USA), kao i u zemljama Evroazije.

Mitohondrijalna DNK pruža korisne genetske markere u proučavanju populacije, zato što je haploidna, ne rekombinuje se, brzo se razvija i nasleđuje se preko majke. Termin haplotip upotrebljava se da opiše genetske mikrovarijante uočene u okviru *E. granulosus s.s.*: ovčiji soj – genotip G1, podtip ovčijeg soja – genotip G1BC, soj Tasmanijske ovce – genotip G2 i bivolji soj – genotip G3. To su geni koji se ne rekombinuju, ali se menjaju mutacijama koje remete redosled nukleotida i mogu zahvatiti jedan ili više nukleotida. Ova promena nukleotida može, a ne mora, dovesti do



promene redosleda aminokiselina. Indeks diverziteta populacije (broj haplotipova, diverzitet haplotipova i nukleotidni diverzitet) ispituje se upotrebom namenskih softvera sa ciljem ustanovljavanja razlika i povezanosti niskog nivoa odstupanja (Casuli i sar., 2012).

Proučavanjem materijala iz hidatidnih cista domaćih životinja i ljudi u različitim regijama i državama ustanovljeno je prisustvo različitog broja i vrsta haplotipova (u Istočnoj Evropi 23, na Tibetanskoj visoravni 43 u Italiji 7 mtDNK haplotipova). Proučavanjem haplotipova u Italiji i zemljama Istočne Evrope (Bugarske, Rumunije i Mađarske), ustanovljeno je da haplotipovi EG1–EG3 odgovaraju G1–G3 genotipovima (Casuli i sar., 2012).

Ispitivanja genetskih mikrovarijanti unutar genotipa G1 potvrđuje da se radi o genetski veoma varijabilnom genotipu, sa niskom i srednjom specifičnošću prema domaćinima i širokom geografskom distribucijom. Dominantni haplotip evropskog *E. granulosus s.s.* je EG1. Istovremeno, ovo je jedan od haplotipova svetske rasprostranjenosti (Andresiuk i sar., 2009). Rezultati ispitivanja diverziteta haplotipova mogu biti značajan doprinos odgovoru o poreklu nekih sinantropnih vrsta (Nakao i sar., 2013).

U okviru *E. granulosus s.l.* kompleksa poseban epidemiološki značaj ima 7 sojeva koji su zoonoznog karaktera: ovčiji soj – G1, soj Tasmanijske ovce – G2, bivolji soj – G3, goveđi soj – G5, kamilji soj – G6, svinjski soj – G7 i jelenski soj – G8. Najvažniji sojevi za infekciju ljudi su: ovčiji – G1 i goveđi soj – G5 (Gottstein i sar., 2010).

Molekularna proučavanja parazita *E. granulosus* kao kosmopolitskog parazita, pored toga što omogućava rasvetljavanje epizootiološko-epidemioloških karakteristika oboljenja, pomažu u antropološkim istraživanjima ljudske civilizacije (Yanagida i sar., 2012).

Poznavanje epizootioloških i epidemioloških karakteristika ehinokokoze i hidatidoze, bazirane na rezultatima parazitoloških i molekularnih ispitivanja kompleksa *E. granulosus s.l.*, od vitalnog je značaja za razradu programa pravovremene dijagnostike, terapije i prevencije ove kosmopolitske parazitoze (OIE, 2011; OIE, 2014).



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Istorijat oboljenja

Hidatidoza predstavlja vekovima poznatu zoonozu. Ozbiljna bolest sa karakterističnim cistama bila je prepoznata i opisana još od strane grčkih lekara, kao što su: Hipokrat, Galen i Arateus. Etiologija bolesti je dugo bila nepoznata, dok u narednim vekovima nije definisano njeno parazitsko poreklo (Nakao i sar., 2013).

Danas hidatidoza predstavlja oboljenje svetskih razmera, izuzimajući Island, Grenland i Irsku u kojoj nema autohtonih humanih slučajeva (Siracusano i sar., 2012). Zbog odsustva fosilnih dokaza, istorija distribucije uzročnika ehinokokoze/hidatidoze može se pratiti samo indirektno, uz pomoć životinja koje su uključene u životni ciklus cestoda i koji može biti precizno dokumentovan. Istorija ovih parazita vezana je za istoriju ljudske civilizacije.

Hronologija pripitomljavanja različitih vrsta životinja razlikovala se u zavisnosti od vrste do vrste. Vuk je prva vrsta koja je pripitomljena na tlu Evrope. Genetska istraživanja su pokazala da su se vuk i pas razdvojili procesom pripitomljavanja pre oko 125.000 godina. Sa druge strane, čovek je koze, ovce, goveda, verovatno i svinje, pripitomio oko 80.000 godina pre nove ere. Pripitomljavanje mačke je počelo pre oko 10.000 godina, prestankom nomadskog načina života i ona neprekidno živi pored čoveka od pre oko 6.000 godina (drevni Egipat). Smatra se da je konj pripitomljen pre oko 3.500 godina.

U poslednjoj fazi glacijalnog perioda, pre oko 18.000 godina, fauna sisara Centralne Evrope bila je karakteristična za severne šume, sa dominacijom sledećih vrsta divljih životinja: vuk (*Canis lupus*), lisica (*Vulpes vulpes*), divlja svinja (*Sus scrofa*), crveni jelen (*Cervus elaphus*), srna (*Capreolus capreolus*), los (*Alces alces*) i evropsko divlje goveče – tur (*Bos primigenius*).



U današnjoj formi, odnos parazita *E. granulosus* i domaćina mogao je biti uspostavljen u kasnom pleistocenu. Fauna sisara Evrope u pleistocenu je u znatnoj meri ista kao u današnje vreme i tada već nije bilo poznatih novih vrsta u tom regionu koje su otkrivene posle zadnjeg interglacijalnog perioda (završio se pre oko 150.000 godina). Krajem ovog perioda kontinentalni glečeri su se povukli, a tundre na severu Evrope zamenjene su šumama. To je uslovalo promenu distribucije vrsta sisara karakterističnih za tundre.

Uslovi za razvoj sinantropnog ciklusa *E. granulosus* formirani su u Evropi, upravo od ranog neolitskog perioda, tako što je originalni silvatični ciklus: vuk–divlji papkari postepeno osvajao domicilni ciklus pripitomljenih životinja: pas–domaći papkari.

Genetska istraživanja su pokazala da je dug evolucionni proces adaptacije cestoda na svoje domaćine rezultirao njihovom stabilnom međusobnom vezom, a time i značajnom mogućnošću za zajedničko proučavanje i poređenje kroz vremenske periode.

Molekularna proučavanja parazita *E. granulosus s.s.* kao kosmopolitskog parazita omogućavaju nova saznanja koja pomažu u antropološkim istraživanjima ljudske civilizacije (Yanagida i sar., 2012).

Prvi pisani dokument o hidatidozi u Srbiji datira iz 1899. godine, a nalazi se u izveštaju o aktivnostima u prvih deset godina Državne bolnice u Beogradu. U ovom izveštaju navodi se 6 slučajeva bolesti od ukupno pregledanih 26.748 pacijenata. Pre II svetskog rata bolest je retko dijagnostikovana u Srbiji (Subotić, 1989).

## 2.2. Etiologija oboljenja

Ehinokokoza/hidatidoza je hronična parazitska bolest životinja i ljudi (ciklozoonoza), za čiji razvoj su neophodni stalni i prelazni domaćini. Međusobno su povezane istim uzročnikom bolesti, ali se i jasno razlikuju po razvojnim oblicima parazita koji ih izaziva i vrstama koje oboljevaju i koje su prelazni domaćini.

- Ehinokokoza je parazitska bolest pasa i drugih kanida (vuk, lisica, hijena, šakal...), kao i nekih felida (mačka, lav...) izazvana pantljičarama iz roda *Echinococcus*, familije Taeniidae, potklase Eucestoda, klase Cestoda. Kod prelaznih domaćina može se razviti više formi oboljenja u zavisnosti od uzročnika.



- Hidatidoza (hidatidna bolest, cistična ehinokokoza) je hronično oboljenje koje se javlja kod brojnih prelaznih domaćina (domaći i divlji papkari, kopitari, čovek i drugi), uzrokovana metacestodom *E. polymorphus syn. cysticus*, larvenim oblikom pantljičare *E. granulosus s.l.*
- Alveolarna ehinokokoza je prouzrokovana metacestodom *E. alveolaris*, larvenim oblikom pantljičare *E. multilocularis*.
- Policistična ehinokokoza je izazvana metacestodom vrste *E. vogeli*.

### 2.2.1. Genetska raznolikost roda *Echinococcus*

Od posebnog epizootiološkog i epidemiološkog značaja je genetska raznolikost vrsta roda *Echinococcus*, a posebno kompleksa *E. granulosus s.l.*

U okviru kompleksa *E. granulosus s.l.*, termin „soj“ odnosi se na grupu sa specifičnim genetskim razlikama koje su povezane biološkim karakteristikama, a koje su potencijalno značajne u suzbijanju hidatidoze. Sojevi kompleksa *E. granulosus s.l.* razlikuju se u karakteristikama kao što su: morfologija, biohemija, fiziologija, patogeneza i infektivnost za životinje i čoveka, sa značajnim uticajem na epizootiologiju i epidemiologiju hidatidoze (Bowles i sar., 1992; Parsa i sar., 2010).

Na osnovu rezultata filogenetske analize rodu *Echinococcus* pripada sledećih devet vrsta (Nakao i sar., 2013):

1. *Echinococcus granulosus sensu stricto (s.s.)*,
2. *Echinococcus multilocularis*,
3. *Echinococcus felidis*
4. *Echinococcus shiquicus*,
5. *Echinococcus equinus*
6. *Echinococcus oligarthra*
7. *Echinococcus vogeli*
8. *Echinococcus ortleppi*
9. *Echinococcus canadensis*

Genetska raznovrsnost roda *Echinococcus* ogleda se u velikom broju genotipova. Oni imaju različit stepen adaptacije na pojedine domaćine i nazvani su po dominantnom prelaznom domaćinu. Neki od njih imaju status vrste. U okviru roda *Echinococcus*, na



osnovu molekularnih ispitivanja, četiri vrste sa više genotipova formiraju kompleks *E. granulosus s.l.*, i to:

- 1) *Echinococcus granulosus s.s.*: genotip G1 – ovčiji soj, genotip G1BC – podtip ovčijeg soja, genotip G2 – soj Tasmanijske ovce i genotip G3 – bivolji soj;
- 2) *Echinococcus equinus*, genotip G4 – soj konja i ekvida;
- 3) *Echinococcus ortleppi*, genotip G5 – goveđi soj;
- 4) *Echinococcus canadensis*: genotip G6 – kamilji soj, genotip G7 – svinjski soj, genotip G8 – soj Severnoameričkih jelena, genotip G9 – soj kod ljudi u Poljskoj i genotip G10 – soj Skandinavskih jelena.

**Tabela 1.** Vrste i genotipovi kompleksa *E. granulosus s.l.*

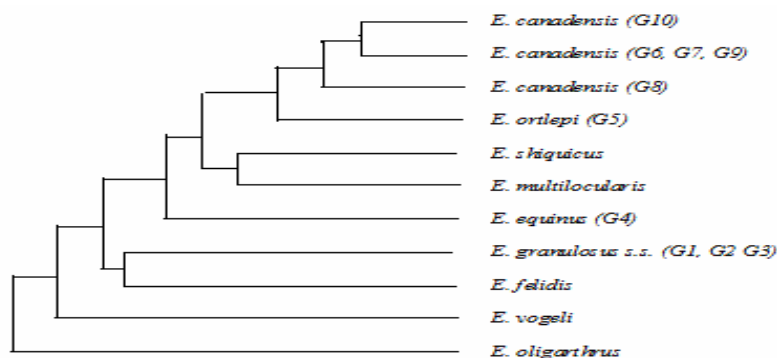
Red. br.	Vrsta	Genotipovi – sojevi	Kompleks
1.	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1 – ovčiji soj G1BC – podtip ovčijeg soja G2 – soj Tasmanijske ovce G3 – bivolji soj	<i>Echinococcus granulosus s.l.</i>
2.	<i>E. equinus</i>	G4 – soj konja i ekvida	
3.	<i>E. ortleppi</i>	G5 – goveđi soj	
4.	<i>E. canadensis</i>	G6 – kamilji soj	
		G7 – svinjski soj	
		G8 – soj Severnoameričkih jelena	
		G10 – soj Skandinavskih jelena	
		G9 – soj kod ljudi u Poljskoj	*/ pripada soju G7

Genetska raznovrsnost kompleksa *E. granulosus s.l.* uspešno se determiniše analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksidaža 1 (*cox1*) gena (Vural i sar., 2008). Mitohondrijalni citohrom C-oksidaža 1 (*cox1*) gen pokazao se kao odličan u klasifikaciji genetske varijabilnosti *E. granulosus s.l.*, čak i sa veoma kratkom dužinom oligonukleotidnih sekvenci. U tu svrhu projektovani su specifični prajmeri CO1 markera: CO1.F =5'-TTT.TTT.GGC.CAT.CCT.GAG.GTT.TAT-3' i

CO1.R= 5'-TAA.CGA.CAT.AAC.ATA.ATG.AAA.ATG-3' (EURLP, 2010; Casuli i sar., 2012).

Korišćenjem metodologije MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite, kao i poređenjem proizvoda sekvenciranja sa referentnim sekvencama registrovanim u Banci gena moguće je identifikovati ispitivanu vrstu/genotip *E. granulosus* kompleksa (EURLP, 2010).

Na osnovu rezultata filogenetske analize mitohondrijalne DNK i jedarne DNK determinisane su vrste roda *Echinococcus*. Holartička *E. multilocularis*, tibetanska *E. shiquicus*, afrička *E. felidis* i neotropске *E. oligarthrus* i *E. vogeli* koriste divlje životinje kao prirodne domaćine. Sa druge strane, pripadnici kompleksa *E. granulosus s.l.* (*E. granulosus s.s.*, *E. equinus*, *E. ortleppi* i *E. canadensis*), održavaju sinantropni životni ciklus, uključujući domaćeg psa i papkare u brojnim svetskim regionima (Nakao i sar., 2007).



**Slika 1.** Filogenetsko stablo *E. granulosus* (Sharma i sar., 2009)

Varijante *E. granulosus s.s.* uključuju: ovčiji soj – G1, podtip ovčijeg soja – G1BC, soj Tasmanijske ovce – G2 i bivolji soj – G3. Ta tri genotipa imaju široku geografsku distribuciju i pokazuju nisku i srednju specifičnost za domaćina (Sanchez i sar., 2010).

Ispitivanja genetskih mikrovarijanti u okviru genotipa G1 potvrđuju da se radi o genetski veoma varijabilnom genotipu. To je u skladu sa niskom i srednjom specifičnošću prema domaćinima i širokom geografskom distribucijom koja je ustanovljena (Andresiuk i sar., 2009).

Genetske varijacije mogu reflektovati razliku u morfologiji i infektivnosti pojedinih sojeva prema vrstama domaćina. Mitohondrijalna DNK pruža korisne genetske markere u proučavanju populacije zato što je haploidna, ne rekombinuje se, brzo se razvija i nasleđuje se preko majke. Iz tih razloga mtDNK se najčešće upotrebljava za diferenciranje srodnih taksona (Boore, 2001).

Termin „haplotip“ upotrebljava se za opisivanje genetskih mikrovarijanti uočenih u okviru *E. granulosus s.s.*, genotipova: G1, G1BC, G2 i G3. To su geni koji se ne rekombinuju, ali se menjaju mutacijama koje remete redosled nukleotida, a mogu zahvatiti jedan ili više nukleotida. Ova promena nukleotida može, a ne mora, dovesti do promene redosleda aminokiselina. Indeks diverziteta populacije (broj haplotipova, diverzitet haplotipova i nukleotidni diverzitet) utvrđuju se upotrebom namenskih softvera (Arelquin 3.1.). Haplotip identifikacija i crtanje mreže kompjuterizovani su upotrebom TCS 1.21 softvera za statističku obradu podataka, sa ciljem ustanovljavanja povezanosti niskog nivoa odstupanja (Casuli i sar., 2012).

U okviru *E. granulosus s.l.* poseban epidemiološki značaj ima 7 sojeva koji su zoonoznog karaktera: G1 – ovčiji soj, G2 – soj Tasmanijske ovce, G3 – bivolji soj, G5 – goveđi soj, G6 – kamilji soj, G7 – svinjski soj i G8 – jelenski soj (Nakao i sar., 2013).

U narednom periodu brojne molekularne tehnike, koje su postale dostupne, omogućiće dalja proučavanja sojeva različitih vrsta u okviru roda *Echinococcus*, što će obezbediti razumevanje nekadašnjih, trenutnih i potencijalnih epidemioloških situacija u pojedinim regionima (Maillard i sar., 2008; Čolović i sar., 2009; Miladinović-Tasić i Otašević, 2014).

### 2.2.2. Vrste roda *Echinococcus*

Vrste roda *Echinococcus*, sa genotipovima, geografskom distribucijom, stalnim i prelaznim domaćinima, karakteristikama cista i zoonoznim potencijalom, prikazani su u Tabeli 2.

Taksonomija je klasičan i osnovni sistem za prikazivanje biodiverziteta u biološkim naukama. Raniji opisi taksonomije roda *Echinococcus* bazirali su se na tadašnjim metodološkim mogućnostima koje su imale značajnih ograničenja. Ova sistematika je trpela stalne revizije, dok u toku molekularnih ispitivanja ova znanja nisu sistematizovana na osnovu razumevanja genetskog diverziteta u okviru roda. U ovoj oblasti značajan pomak je napravljen tek u poslednjim decenijama 20. veka molekularnom taksonomskom analizom *Echinococcus* vrsta, upotrebom mtDNK sekvence gena za citohrom C-oksidadazu subjedinice 1 (cox1) i NADH dehidrogenaze subjedinice 1 (nad1) (Wardle i Mc Leod, 1970; Nakao i sar., 2013).



**Tabela 2.** Vrste i genotipovi roda *Echinococcus* sa geografskom distribucijom, stalnim i prelaznim domaćinima

R. br.	Vrsta	Genotipovi - sojevi	Rasprostranjenost	Domaćin		Infek. ljudi
				stalni	prelazni	
1.	<i>E. granulosus</i> s.s.	G1 – ovčiji soj G1BC– podtip ovčijeg soja G2 – soj Tasmanijske ovce G3 – bivolji soj	G1-širom sveta	pas	ovca koza goveče bivo	G1-da
			G2 Argentina Tasmanija			G2-da
			G3-Azija, Evropa			G3-da
2.	<i>E. equinus</i>	G4 – soj konja i ekvida	Azija, Evropa, S.Istok	pas	ekvidi	ne
3.	<i>E. ortleppi</i>	G – 5goveđi soj	širom sveta	pas	goveče	da-retka
4.	<i>E. canadensis</i>	G6 – kamilji soj	širom sveta	pas	svinja kamila goveče koza ovca	da
		G7 – svinjski soj				
		G8 – soj S. Američkih jelena	S. Arktik	vuk	Severnoam. jelen	da
		G10 – soj Skandinavskih jelena	S. Arktik	vuk, pas	miš, crvenorepi jelen Severnoam. jelen	da
		G9 – soj ljudi, var. G7	Poljska	pas	čovjek	da
5.	<i>E. multilocularis</i>	M1 soj	Evropa	crvena lisica  arktička lisica	glodari	da
		M2 soj	Kina Aljaska Amerika			
6.	<i>E. shiquicus</i>	Genetski jedinstvena	Tibet	lisica	tibetanska pika	nedokazana
7.	<i>E. vogeli</i>	Genetski jedinstvena	Severna i J. Amerika	divlji pas	pacov	da
8.	<i>E. oligarthra</i>	Genetski jedinstvena	J. Amerika	divlji felidi	pacov	da
9.	<i>E. felidis</i>	Genetski jedinstvena	Afrika	lav	zebra antilopa	nedokazana

### 2.2.2.1. *Echinococcus granulosus s.s.* (Batsch, 1786)

Pantljičara *E. granulosus s.s.* je sinantropna vrsta i njen životni ciklus je dominantno povezan sa odnosima pasa i ovaca u pašnim regijama širom sveta. Brojnim molekularnim ispitivanjima ustanovljeno je skromnije učešće koza, goveda i kamila kao prelaznih domaćina (Dinkel i sar., 2004; Vural i sar., 2008).

*Echinococcus granulosus* je pantljičara malih dimenzija sa 3–4 proglotide. Pored pasa kao najznačajnijih stalnih domaćina, mogu parazitirati u tankom crevu više vrsta životinja pripadnika familija Canidae i Felidae. Stalni domaćini se inficiraju jedući organe sa fertilnim hidatidnim cistama prelaznih domaćina.

Larveni razvoj *E. granulosus* obavlja se u različitim organima kod više vrsta životinja (ovca, svinja, goveče, koza, bivo) i čoveka, koji predstavljaju prelazne domaćine (Kulišić i sar., 1999). U silvatičnom ciklusu bolest kruži, najčešće između vuka i lisice i pripadnika cervida (OIE, 2012).

S obzirom na rezultate arheoloških i genetskih istraživanja koji ukazuju da su ovce pripitomljene u regiji Bliskog Istoka, ova regija se smatra prostorom njenog porekla. Ova vrsta je postala svetski rasprostranjena verovatno kao posledica različitih migracija ljudi i domaćih životinja, uz širenje pašnog načina držanja ovaca, koje su bile čuvane uz pomoć pasa. Rezultati filogeografskih istraživanja *E. granulosus s.s.* u Kini i Peruu potvrđuju prisustvo zajedničkih genotipova i haplotipova koji su dominantni u obe zemlje, što sugerše da je predački rod globalno rasprostranjen i da ima zajednički izvor (Nakao i sar., 2013).

Genetske varijante *E. granulosus s.s.* uključuju genotipove: G1 – ovčiji soj, G2 – soj Tasmanijske ovce i G3 – bivolji soj. Sva tri genotipa imaju široku geografsku distribuciju (G1 – svetska rasprostranjenost, G2 – Australija i Tasmanija G3 – Evropa i Azija) i pokazuju nisku i srednju specifičnost za domaćina (Sanchez i sar., 2010).

### 2.2.2.2. *Echinococcus equinus* (Sweatman i Williams, 1963)

Cistična hidatidoza kod konja praćena je razvojem unilokularne ciste, uglavnom na jetri, i skoro da je svetske rasprostranjenosti. Stalni domaćin je pas, a prelazni domaćini pored konja mogu biti magarac i zebra. Njena visoka prevalencija u Engleskoj u periodu 1960–1970. godine rezultirala je intenzivnim proučavanjem i jasnim diferenciranjem od ostalih vrsta. Pripada kompleksu *E. granulosus s.l.*, genotip G4 – soj



konja i ekvida. Nedvosmisleno je ustanovljeno da se javlja isključivo kod ekvida i da nema zoonozni potencijal (Rezabek i sar., 1993; Blutke i sar., 2010; Nakao i sar., 2013).

#### **2.2.2.3. *Echinococcus ortleppi*** (Lopez-Neyra i Planas, 1943)

Vrsta *E. ortleppi* ustanovljena je 1943. godine na osnovu ranijih opisa iz 1934. godine, od strane Ortlepa koji su se odnosili na uzorke poreklom od pasa iz Južne Afrike, kada je nazvana *E. granulosus ortleppi*. Tek na osnovu morfoloških razlika između parazita goveđeg soja poreklom iz Švajcarske i ranije definisanih karakteristika *E. granulosus ortleppi*, kao i molekularne identifikacije bazirane na mtDNK sekvenci, napravljena je jasna razlika. Definisan je značaj govečeta i vodenog bizona kao prelaznih domaćina *E. ortleppi* i potvrđena njena geografska distribucija u: Evropi, Africi, Južnoj Aziji i Americi. Ovo je imalo velikog značaja u epidemiologiji infekcije, s obzirom na to da je *E. ortleppi* evidentno infektivan za ljude (Grenouillet i sar., 2014).

Molekularnim proučavanjem *E. ortleppi* ustanovljena je njena značajna bliskost sa genotipovima *E. canadensis*. Bliski odnosi između *E. ortleppi* i *E. canadensis* potkrepljeni su morfološkim sličnostima, kao i preklapanjem istih prelaznih domaćina za obe vrste. *Echinococcus ortleppi* je adaptirana na goveče kao prelaznog domaćina, ali fertilne ciste mogu produkovati i svinje i Filipinski jelen (*Rusa alfredi*). Sa druge strane, ciste izazvane genotipom G6, vrste *E. canadensis*, identifikovane su i kod goveda (Nakao i sar., 2013).

*Echinococcus ortleppi*, pripada kompleksu *E. granulosus s.l.* kao goveđi soj – genotip G5.

#### **2.2.2.4. *Echinococcus canadensis*** (Cameron, 1960)

U okviru vrste *E. canadensis*, na osnovu molekularnih ispitivanja determinisana su četiri genotipa koji imaju dominantne prelazne domaćine, na osnovu čega su dobili i nazive: G6 – kamilji soj, G7 – svinjski soj, G8 – soj Severnoameričkih jelena i G10 – soj Skandinavskih jelena. Kamilji soj se jasno razlikuje od ostalih sojeva koji se mogu sresti kod goveda, ovaca i konja. Svinjski soj prisutan je u Evropi i karakteriše se specifičnom morfologijom i brzim razvojem kod pasa. Stalni domaćin za ova dva soja je pas. Takođe, postoje indicije da kamilji i svinjski soj imaju zajedničko poreklo. Blisku vezu ova dva soja potvrđuju molekularne analize mtDNK sekvence. U filogenetskoj analizi oni su bliski i sa



jelenskim sojevima G8 i G10. Njihovi stalni domaćini je pas i vuk. Genotip G9 – soj dokazan kod ljudi u Poljskoj, verovatno je varijanta genotipa G7 – svinjskog soja. Genotipovi: G6, G7 i G10 pripadaju istoj podgrupi, za razliku od G8 koji im je blizak, ali ima specifične morfološke i ekološke razlike, zbog kojih ne mogu biti u istoj podgrupi. Zbog svih ovih karakteristika pojedinih genotipova, *E. canadensis* se smatra genetski i ekološki veoma kompleksnom i raznolikom vrstom.

I pored toga što su svi genotipovi relativno niske infektivnosti za ljude, u ovom pogledu postoji značajna različitost među genotipovima (Nakao i sar., 2013).

*Echinococcus canadensis* sa svoja četiri genotipa: G6 – kamilji soj, G7 – svinjski soj, G8 – soj Severnoameričkih jelena i G10 – soj Skandinavskih jelena, pripada kompleksu *E. granulosus s.l.*

#### **2.2.2.5. *Echinococcus multilocularis* (Leuckart, 1863)**

*Echinococcus multilocularis* razlikuje se od *E. granulosus* po biološkim i morfološkim karakteristikama. Dužina strobile polno zrele pantljičare *E. multilocularis* iznosi 2,3–2,4 mm. Broj proglotida varira od 3 do 5. Genitalni otvori nalaze se bliže prednjoj ivici proglotida. Broj semenika kreće se od 21 do 29 (Kulišić, 2001).

U prirodnim uslovima u silvatičnom ciklusu bolesti stalni domaćin su crvena lisica (*Vulpes vulpes*), kao i arktička lisica (*Vulpes lagopus*), a prelazni domaćini različite vrste glodara arvikolina, koji nastanjuju ovaj ekosistem. U domaćem ciklusu razvoja parazita domaći pas i mačka kao stalni domaćini su izvor za inficiranje čoveka.

Larveni oblik ove tenide poznat je pod imenom *E. alveolaris*. Osim kod čoveka, sreće se kod goveda, svinja i divljih glodara. U odnosu na unilokularnu cistu ima sasvim drugačiji razvoj i morfologiju. Membrana proligeri zamenjena je bujajućom plazmodijalnom masom koja se grana u svim pravcima. U formiranoj cisti u različitim organima nastaje mnoštvo vezikularnih šupljina prečnika 300–500 µm. Te vezikule nepravilnog oblika sadrže veoma malo hidatidne tečnosti, zbog čega se u njima retko formiraju protoskoleksi. Vezikule su odeljene jedna od druge granulacionim tkivom koje se vremenom pretvara u fibrozno. Na preseku cista ima izgled šupljikavog sira, a alveolarni izgled je najviše izražen na periferiji. Centralni deo često nekrotizuje, a mehurići se ispunjavaju pihijastom masom. Prostor između odvojenih mehurića sastoji se od infiltrirajućeg tkiva zahvaćenog organa, koje se preobražava u granulaciono tkivo,



pa se organ smežurava, nekrotizuje i raspada. Alveolarni ehinokokus ima karakteristike maligne tvorevine. Egzogenim pupljenjem nastaju vezikule koje se u toku rasta otkidaju od primarne ciste i slično metastazama prodiru u okolno tkivo ili organ, gde nastavljaju razvoj kao nezavisne ciste (Kulišić, 2001; Aleksić, 2004).

Genetske varijacije *E. multilocularis* analizirane su upotrebom mtDNK sekvenci. Samo nekoliko substitucionih mesta u kratkoj mtDNK je nađeno kao osnov za razlikovanje dva geografska genotipa, nazvanih M1 (evropski) i M2 (severnoamerički). Molekularna istraživanja sugerišu da je severnoamerički genotip (M2), manje patogen za čoveka od evropskog genotipa (M1). Međutim, ovi genotipovi nisu isključivo vezani za navedena područja. Genetskim istraživanjem materijala poreklom od domaćeg psa iz Britanske Kolumbije (Kanada) ustanovljeno je prisustvo evropskog genotipa. Isti genotip odraslog parazita ustanovljen je i kod kojota (*Canis latrans*) u istom regionu. Pretpostavlja se da je poreklo evropskog genotipa u Britanskoj Kolumbiji u Kanadi posledica unosa evropske crvene lisice u ovaj region (Nakao i sar., 2013).

Značajan je nalaz metacestode *E. multilocularis* kod evropskog dabra (*Castor fibre* L.) u Srbiji (Ćirović i sar., 2012).

#### **2.2.2.6. *Echinococcus shiquicus* (Xiao, 2005)**

Ekološkim i morfološkim studijama, kao i sekvenciranjem mtDNK, identifikovana je *E. shiquicus* kao nova vrsta koja se značajno razlikuje od svih ostalih. Silvatični ciklus razvoja se odvija između stalnog domaćina, tibetanske lisice (*Vulpes ferrilata*), i prelaznog domaćina, malog sisara poznatog kao crvenousta pika (*Ochotona curzoniae*), koji žive na nadmorskim visinama od 3.000 do 5.000 m na Tibetskoj visoravni, gde je samo i dokazano prisustvo ovog parazita. U ovoj regiji kod tibetanskih lisica dokazano je prisustvo i *E. shiquicus* i *E. multilocularis* (Xiao i sar., 2005; Nakao i sar., 2013).

Molekularna filogeneza, bazirana na mitohondrijalnoj i jedarnoj DNK, ukazuje na blisku genetsku srodnost *E. shiquicus* i *E. multilocularis*. Međutim, genetski diverzitet *E. shiquicus* je mnogo veći nego kod *E. multilocularis*. Uzrok ovome može biti značajna, vremenski duga izolovanost ovog silvatičnog ciklusa u odnosu na druge vrste roda *Echinococcus* koje su naknadno unete. I pored brojnih slučajeva cistične i alveolarne ehinokokoze, koja je ustanovljena kod ljudi u ovom području zoonozni





potencijal *E. shiquicus* još uvek je nepoznat (Moro i sar., 2009; Nakao i sar., 2013; Spotin, 2015).

#### **2.2.2.7. *Echinococcus vogeli* (Rausch i Bernstein, 1972)**

Neotropska vrsta, čiji su stalni domaćini divlji pas (*S. venaticus*) i drugi kanidi, a dominantni prelazni domaćin neotropski glodar (*Cuniculus paca*), vezana je za Centralnu i Južnu Ameriku. Prelazni domaćini mogu biti i druge vrste glodara ove regije: (*Dasyprocta spp*), nutrije, kao i čovek, odnosno neke vrste primata kao što su orangutani i gorile. Metacestoda *E. vogeli* izaziva policističnu hidatidozu. U razvojni ciklus se može uključiti i domaći pas, koji postaje glavni izvor za inficiranje čoveka (Knapp i sar., 2009; Nakao i sar., 2013).

#### **2.2.2.8. *Echinococcus oligarthra* (Diesing, 1863)**

Neotropska vrsta *E. oligarthra* primarno je otkrivena kod kuguara (*Puma concolor*) u Brazilu i opisana kao *Taenia oligarthra* (Diesing, 1863). Početkom 20. veka nakon ustanovljenih morfoloških sličnosti parazita sa *E. granulosus*, a koji je poticao iz materijala od jaguara (*Puma yagouaroundi*), naziv je spelovan kao *E. oligarthrus* i korišćen je sve do 4. izdanja Međunarodnog Kodeksa zoološke nomenklature (2000), kada je vraćen ispravan naziv – *E. oligarthra*. Prelazni domaćini su više vrsta velikih brazilskih glodara roda *Dasyprocta*. Posle ranih otkrića *E. oligarthra* je ustanovljena i kod više vrsta divljih neotropskih mačaka u Argentini, kao i u severnim regijama Meksika. Infekcija ljudi je retka, tako da je potvrđeno samo nekoliko slučajeva u Južnoj Americi.

Filogenetske studije, bazirane na korišćenju mitohondrijalne i jedarne DNK, svrstavaju *E. oligarthra* kao člana roda koji se veoma rano jasno diferencirao kao posebna vrsta. Genetski diverzitet *E. oligarthra* nije jasno proučen, s obzirom na mali broj raspoloživih materijala (Nakao i sar., 2013).

#### **2.2.2.9. *Echinococcus felidis* (Ortlepp, 1937)**

Specifičan status ove vrste uslovljen je bliskim filogenetskim srodstvom sa *E. granulosus s.s.*, kao i činjenicom o relativno izdvojenom prostoru Afričkog kontinenta na kome se razvijala. Njen razvoj odvija se u silvatičnom ciklusu: afrički lav–divlji papkari (zebra, antilopa, žirafa i druge), kod kojih se razvijaju unilokularne ciste. Stalni domaćini



mogu biti i druge felide, kanide i hijena. Lav (*Panthera leo*) je evoluirao od predaka u Aziji u toku kasnog pliocena, a naseljen je u Afriku u ranom pleistocenu. Imajući u vidu zajedničku teritoriju (Azija i Bliski Istok) i genetsku bliskost sa *E. granulosus s.s.*, pretpostavlja se da je sa sobom u Afriku doneo i cestodu *E. felidis*. U toku istorijskih perioda lavovi su zaposeli teritoriju Afrike, Bliskog i Dalekog Istoka, kao i delove Indije. Molekularna ispitivanja potvrđuju da je *E. felidis* i danas kod ove životinje veoma čest parazit (Huttner i sar., 2009; Nakao i sar., 2013; Spootin, 2015).

Za sada nema podataka o patogenosti *E. felidis* za ljude. Ipak, s obzirom na bliske odnose sa *E. granulosus s.s.* moguće je postojanje zoonoznog potencijala koji nema velikog praktičnog značaja (Moro i Schoutz, 2009; Nakao i sar., 2013).

### 2.2.3. Morfologija i razvoj *Echinococcus granulosus*

*Echinococcus granulosus* je parazit koji se nalazi u tankom crevu psa, vuka i šakala, ali i drugih pripadnika porodice Canidae i nekih vrsta porodice Felidae. Rasprostranjen je širom sveta, a naročito u zemljama sa intenzivnim gajenjem ovaca, goveda i koza. Njen glavni domaćin je pas.

Stalni domaćin se inficira protoskoleksima koji su nastali bespolnim razmnožavanjem u hidatidnoj cisti prelaznog domaćina. Evaginacija protoskoleksa započinje u tankom crevu psa, pod uticajem enzima digestivnog trakta koji se kukicama zakače za sluzokožu creva (Čolović, 2009).

Paraziti žive pripijeni za sluzokožu tankog creva i prilikom pregleda vide se kao sitne, ne baš lako uočljive resice.

Telo parazita sastoji se iz glave, vrata i 3–4 člančića. Pantljičara je malih dimenzija, dužine 3–6 mm i širine 0,5–0,6 mm. Skoleks je okruglast, veličine do 330 µm u prečniku. Na njemu se nalazi retraktilni rostrum sa dvostrukim vencem kukica čiji broj varira od 28 do 50, veličine 18–25 µm. Pijavke su okrugle, prečnika do 130 µm. Vrat je kratak i na njega se nastavlja strobila koja se sastoji iz 3–4 proglotide. Poslednja proglotida je duga 2–3 mm, a široka oko 600 µm. Genitalni otvori se nalaze na jednoj ili drugoj ivici proglotide bez pravilnog rasporeda. U polno zrelih proglotidama ima 40–60 semenika. Ovarijum je u obliku potkovice. Žumančišta se nalaze iza ovarijuma. Uterino stablo se nalazi samo u poslednjem člančiću i sa njega polazi na obe strane po nekoliko slabo izraženih bočnih ogranaka. Genitalni začetak se pojavljuje 14 dana posle formiranja

prvog proglotisa. Vrste roda *Echinococcus* su hermafroditi sposobni za samooplodnju i za unakrsnu oplodnju između dve jedinke. Vremenski period potreban da nastane zreli proglotis u kojem se produkuju jaja zavisi od vrste. Jedino zadnja proglotida sadrži jaja (od 400–1000). Jaja su ovalnog oblika, duga 32–36, a široka 25–30  $\mu\text{m}$ . Opna jaja je dvostruka i radijalno izbrazdana (Kulišić, 2001; Nevenić i sar., 1955; Nevenić, 1957; Simić i Petrović, 1962;).

Kada pas kao stalni domaćin pojede fertilnu cistu, u njegovom tankom crevu iz svakog skoleksa razvija se po jedna pantljičara *E. granulosus*. Polno zrela pantljičara razviće se za 58–85 dana. U razvojnom ciklusu *E. granulosus* potrebno je 32–58 dana da bi se u zrelom proglotisu našlo do 1000 jaja. Ovaj proces može da traje do 80 dana, pri čemu na svakih 14 dana sazreva novi proglotis. Psi inficirani fertilnim cistama nakon 6 meseci fecesom počinju da izlučuju veliki broj jaja parazita, kontinuirano tokom cele godine. Parazit *E. granulosus* živi u crevu stalnog domaćina oko 2 godine, nakon čega dolazi do njegovog izbacivanja (Kulišić, 2001; Aleksić, 2004; Gottstein i sar., 2014).

#### 2.2.4. Morfologija i razvoj hidatidne ciste u prelaznom domaćinu

Kada stalni domaćin izbaci u spoljašnju sredinu člančice s jajima *E. granulosus*, jaja su embrionirana i infektivna za prelaznog domaćina. Prelazni domaćini se inficiraju ingestijom jaja preko kontaminirane hrane ili vode. Razvojem metacestode *E. granulosus* u različitim organima kod više vrsta životinja (ovca, svinja, goveče, koza, bivo) i čoveka, razvija se larveni oblik koji se naziva *E. polymorphus syn. cysticus*. Bolest koju izaziva naziva se hidatidoza (sin. hidatidna bolest, cistična ehinokokoza).

U želucu i početnom delu tankog creva prelaznog domaćina jaje prska i iz njega izlazi embrion heksakant. Veličina ove larve iznosi 20–25  $\mu\text{m}$ . Oslobođeni embrion probija zid creva i putem krvotoka *v. porte* dospeva do jetre. Pošto ovaj organ predstavlja prvu barijeru za embrione, najveći deo njih se ovde i zadržava i nastavlja razvoj. Zahvaljujući malim dimenzijama i elastičnosti, deo embriona prolazi barijeru jetre i preko srca i malog krvotoka dospeva do pluća. Deo embriona se zadrži u plućima, ali deo može nastaviti svoj put kroz sistemski krvotok do svih delova tela gde postoji vaskularizacija.

Kada se embrion zaustavi u nekom od organa, izgubi stilete i počinje rast ciste, koji vrlo sporo napreduje. Za 15 dana u sredini larve pojavljuje se vezikula ispunjena



tečnošću. Posle mesec dana ona dostiže veličinu 250–350  $\mu\text{m}$ , a čitav čvorić u kome se nalazi nije veći od 1mm. Posle 3 meseca veličina ciste dostiže 1,5–2 mm, a posle 5 meseci 0,5–1 cm u prečniku. Tek posle nekoliko godina dostiže veličinu jajeta, pesnice, pa i dečje glave.

Struktura ciste je složena i sastoji se iz više slojeva. Spolja se nalazi vezivno-tkivna opna (adventicija), debljine oko 1mm i nastaje kao posledica zapaljenske reakcije u okviru odgovora organizma domaćina na prisustvo metacestode. Naziva se i pericista. Ispod nje se nalazi spoljašnja, acelularna laminarna membrana (kutikula). Između ove dve membrane nalazi se uski, golim okom nevidljivi pericistični prostor preko koga cista komunicira sa domaćinom. Kutikula, koja je spoljašnji sloj membrane hidatidne ciste, bele ili sivobeke boje je kod mlađih cista, dok je kod starijih cista deblja, neprozirna i često naborana. Sastoji se iz mnogobrojnih koncentričnih lamela u kojima ima i hitina. Ona je čvrsta i kompaktna, ne propušta bakterije, ali je propustljiva za koloidne rastvore. Ispod kutikule se nalazi unutrašnji parenhimski sloj – germinativna membrana (*membrana prolygera seu parenchymatosa*), koji oblaže celu unutrašnju površinu ciste. Ona je tanka, debljine 20–25  $\mu\text{m}$ , nežne strukture. Njene ćelije pokazuju zrnastu građu, sadrže više jedara i glikogena. *Membrana prolygera* se uvraća u hidatidnu tečnost i gradi *vesiculae prolygera* prečnika 250–500  $\mu\text{m}$ . To su mali mehurići koji nastaju pupljenjem germinativne membrane. One su plodni deo ciste, jer se u njihovu unutrašnjost uvraćaju skoleksi (protoskoleksi) dimenzija 190x160  $\mu\text{m}$ .

Na njima se nalaze pijavke i kukice rostruma u uvraćenom položaju, kao i peteljka kojom su vezani za zid vezikula ili otkinuti plivaju u tečnosti. Njihov broj zavisi od veličine ciste. U većim cistama ima ih više stotina hiljada. U svakoj od ovih *vesiculae prolygera* nalazi se više skoleksa (10–30) (Kulišić, 2001; Jovanović i sar., 2012).

Produkcija *vesiculae prolygera* i protoskoleksa ne zavisi od veličine ciste, već od odnosa parazita i domaćina.

Sedimentacijom sadržaja hidatidne ciste, na dnu se formira talog od istaloženih *vesiculae prolygera*, koji se naziva „hidatidni pesak“ i bistra tečnost iznad taloga, koja se naziva hidatidna tečnost (Slika 10). U 1cm<sup>3</sup> sedimenta nalazi se u proseku 400.000 protoskoleksa. Iz ovog proizilazi da se u jednoj cisti prosečne veličine, u kojoj ima 3–6 cm<sup>3</sup> „hidatidnog peska“ nalazi 1.200.000–2.400.000 skoleksa. Skoleksi su ovalnog oblika



sa rostrumom koji je obično uvraćen. Dugi su oko 190, a široki oko 160  $\mu\text{m}$ . Broj kukica na rostrumu kreće se od 32–40, a njihova dužina je 21–29  $\mu\text{m}$ .

Hidatidna tečnost je neutralne ili slabo alkalne reakcije. Njena specifična težina je između 1007 i 1015. Ne koaguliše na toploti ni posle dodavanja kiselina, s obzirom na to da belančevine sadrži samo u tragovima. U njoj se nalaze rastvorene soli (natrijum-hlorid, natrijum-fosfat i natrijum-sulfat), glukoza, leucin, tirozin, sirćetna, propionska, valerijanska i ćilibarna kiselina, kao i više masnih kiselina. Takođe, u njoj se nalaze i proteolitički i glikolitički fermenti, o čijem dejstvu na organizam domaćina nema usaglašenih podataka. Hidatidna tečnost je po pravilu sterilna, nezagađena bakterijama.

Međutim, dokazana je kvalitativna razlika u biohemijskom sastavu sadržaja hidatidne ciste kod različitih životinja i čoveka. Dokazana je značajna sličnost biohemijskog sastava sadržaja cista kod ovaca i čoveka i njihova razlika u odnosu na koze, goveda i kamile. U okviru hemijskih analiza sastava hidatidne tečnosti, ustanovljeno je da kod koza ona ima značajno veći sadržaj lipida nego kod ovaca, ali da je taj sadržaj manji nego kod goveda, ljudi i kamila. Sa druge strane, u sadržaju cista kod ovaca nalazi se više glukoze i proteina nego kod goveda, ali bez značajne razlike u nivou triglicerida (Refik i sar., 2000).

*Echinococcus polymorphus* može se podeliti po: nastanku, zastupljenosti i plodnosti. Po nastanku može biti primarni i sekundarni. Primarni *E. polymorphus* je najčešći larveni oblik, kako kod životinja, tako i kod čoveka. Sekundarni *E. polymorphus* nastaje usled razlivanja sadržaja primarne ciste, najčešće usled mehaničke traume, pri čemu se iz svakog uvraćenog skoleksa razvija novi *E. polymorphus*. U slučajevima prskanja primarne ciste (najčešće na površini organa - jetra, pluća), sekundarne ciste se razvijaju na peritoneumu, pleuri i perikardu. Građa sekundarne unilokularne ciste razlikuje se od primarne, između ostalog, po tome što nema spoljnu opnu niti kutikularni sloj.

Po zastupljenosti, ciste mogu biti unilokularne i multilokularne. Napred opisane su unilokularne, pojedinačne. One mogu biti i multiple sa različitim brojem cista u zavisnosti od intenziteta infekcije. Kod nekih prelaznih domaćina, kao što je čovek, unutar hidatidne ciste mogu da se razviju ciste ćerke. Poreklo cisti ćerki unutar hidatidne ciste još uvek nije rasvetljeno u potpunosti. Moguće je da ciste ćerke nastaju od protoskoleksa u primarnoj hidatidnoj cisti koji se razvija u vezikulu, usled određenih promena nastalih u primarnoj



cisti. Moguće je i da nastaju od fragmenata germinativne membrane, pri čemu dođe do izvrtanja fragmenta tako da unutrašnji deo germinativne membrane bude unutar buduće ciste ćerke. Neka istraživanja pokazuju da mogu nastati unutar primarnih cista koje su pretrpele određena oštećenja, kao što su manje rupture zida ciste i eventualne komunikacije sa žučnim putevima i prisustvo žuči u primarnoj cisti (Čolović, 2009). U ovim slučajevima govorimo o endogenoj cisti ćerki.

Zid hidatidne ciste može da pukne iz različitih razloga, a najčešće kao posledica mehaničke traume. Jedan od rezultata može biti nastanak cista ćerki u pericističnom limfnom prostoru, kada govorimo o egzogenim cistama. Kod egzogene hidatidne ciste ćerke, vezikule majke i vezikule ćerke poseduju jednu zajedničku vezivno-tkivnu (reaktivnu) membranu.

Multilokularne ciste se razlikuju od unilokularnih po tome što je cista nepravilnog oblika. Na preseku organa sa multilokularnim cistama vide se šupljine različite veličine i oblika. Takve ciste su protkane i fibroznim tkivom. Nikada ne dolazi do nekroze u centru, ne daju metastaze i nema maligne proliferacije. Veoma je bitno razlikovati ih od alveolarnih cista.

Po plodnosti ciste se dele na plodne (fertilne) i neplodne (sterilne). U slučaju da nedostaje germinativna membrana (*membrana prolygera*) ili je zakržljala, odnosno delimično razvijena, ne dolazi do formiranja skoleksa. Sterilni *E. polymorphus* nije infektivan za stalnog domaćina. Zastupljenost fertilnih cista kod pojedinih prelaznih domaćina značajno se razlikuje kod različitih vrsta. Kod ovaca je oko 93%, svinja 70%, a najmanja je kod goveda oko 13% (Simić i Petrović, 1962; Kulišić, 2001).

### **2.2.5. Otpornost razvojnih oblika parazita**

Po napuštanju digestivnog trakta stalnog domaćina jaja *E. granulosus* su embrionirana i sposobna za infekciju prelaznog domaćina. Spoljašnji omotač jajeta, embriofora, sastoji se od prizmi proteina sličnog keratinu, međusobno spojenih cementnom supstancom, što im daje radijalnu strukturu. U sredini se nalazi embrion heksakant sa šest kukica, kao i sekretorne, mišićne i germinalne ćelije (Čolović, 2009).

U spoljnim uslovima jaja *E. granulosus* su veoma otporna i mogu da prežive od 6 do 12 meseci, u zavisnosti od uslova sredine (Miladinović-Tasić i Otašević, 2014). Za



ovu otpornost svakako je zaslužna i građa jajeta, a posebno njenog omotača – embriofore.

U vlažnoj zemlji na temperaturi od +4 do +15°C jaja mogu da prežive do godinu dana. Na temperaturi od -1°C mogu da prežive 4 meseca, a u plitkoj vodi ili vlažnom pesku preko 3 nedelje. Takođe, mogu da ostanu sposobna za infekciju ako se drže 16 dana u vodi ili 11 dana na vazduhu (bez izlaganja suncu). Na temperaturi od +60 do +80°C preživljavaju 5 minuta, dok ih kuvanje na 100°C uništava trenutno. Na temperaturi od -70°C jaja gube infektivnost posle 96 sati. Na preživljavanje jaja *E. granulosus* značajno utiče nivo vlažnosti u sredini. Pri relativnoj vlažnosti od 25% mogu da prežive četiri dana, odnosno jedan dan pri vlažnosti od 0%. Direktna sunčeva svetlost i isušivanje ih brzo uništavaju, a temperatura od +50 °C za 1 čas.

U organima zaklanih ili uginulih životinja skoleksi fertilnih cista zadržavaju sposobnost za infekciju stalnih domaćina preko 30 dana, kada se čuvaju na temperaturi od +2°C. Psi se mogu inficirati skoleksima iz potpuno zaleđenih cista čuvanih na -8°C u toku 24 časa ili na -3°C u toku tri dana. Infekcija je moguća i skoleksima iz cista čuvanih 6–7 dana na 24–26°C i 5 dana na 30°C, iako je organ (jetra, pluća) sa cistama u tom periodu u stanju raspadanja (Šibalić i Cvetković, 1996; Čolović, 2009; Dimitrijević i Ilić, 2011).

### 2.3. Patogeneza *Echinococcus granulosus* infekcije

Posle prodiranja kroz zid creva onkosfere se krvotokom mogu razneti po raznim delovima organizma, ali se najčešće zadržavaju u jetri, plućima, bubrezima, srcu i drugim organima, gde se razvijaju hidatidne ciste. Ciste dostižu različitu veličinu u zavisnosti od dužine trajanja procesa.

U slučaju lokalizacije ciste u jetri, pritisak na žučne puteve može dovesti do zastoja žuči i žutice. Hidatidna cista u plućima, u zavisnosti od veličine i lokalizacije, može prouzrokovati respiratorne smetnje.

Pored pritiska na okolno tkivo u kome se nalaze, pojedinačne ciste ili povećani organ mogu vršiti pritisak na okolne organe (dijafragmu, pluća, jetru, jednjak, dušnik, krvne sudove), što može imati za posledicu poremećaj funkcije tih organa.

Ponekad se može desiti da u ranim fazama razvoja hidatidne ciste eozinofili prodru u vezivnotkivnu kapsulu, kao i između nje i membrane ciste (*membrana*

*prolygera*). Oni je mogu i razoriti, pri čemu hijalinu supstanciju zahvata proces fagocitoze. Hidatidna tečnost se apsorbuje, membrana ciste postaje naborana, a vezivno-tkivna kapsula zadebljava. Ponekad se cela cista apsorbuje i zamenjuje fibrozim čvorićem.

Hidatidna cista može da prsne, uglavnom kao posledica mehaničke traume i kod ljudi predstavlja najčešću komplikaciju. Ako se nalazi na površini organa može nastati generalizacija hidatidoze u grudnoj, odnosno trbušnoj duplji, uz posledičnu pojavu pleuritisa, odnosno peritonitisa. Prsnuće ciste može izazvati i anafilaktički šok kao posledica prethodne senzibilizacije organizma. Ciste se mogu i inficirati, što može izazvati posledični razvoj gnojnog procesa (Šibalić i Cvetković, 1996; Dimitrijević i Ilić, 2011).

## **2.4. Epizootiologija hidatidoze kod životinja**

### **2.4.1. Izvori infekcije životinja**

Stalni domaćini se inficiraju konzumirajući organe uginulih ili zaklanih životinja u kojima se nalaze fertile hidatidne ciste. Infekcija pasa je moguća tokom cele godine. Zimski period godine, kada se u individualnim gazdinstvima obavljaju tradicionalni svinjokolji, predstavlja sezonu većeg rizika za pse, jer tada mogu lakše i češće doći do hidatidnih cista. Činjenica da u njihovom tankom crevu odrasla pantljičara opstaje do dve godine ovu sezonu inficiranja čini manje bitnom (Kulišić, 2001).

### **2.4.2. Putevi prenošenja i inficiranja životinja**

Infekcija prelaznih domaćina jajima *E. granulosus* je moguća tokom cele godine, bez izraženog sezonskog karaktera. Feces pasa u kome se nalaze jaja parazita kontaminira zemljište i biljke dvorišta, bašta, pašnjaka i livada. Sa ovih površina jaja spiranjem dospevaju u bunare, stajaće i tekuće vode. Jaja parazita koja se nalaze u prašini nošena vetrom se mogu razneti na velike razdaljine (Kulišić, 2001).

Životinje prelazni domaćini se inficiraju na pašnjacima, pojilima, barama, uopšte na svim mestima gde mogu doći u kontakt sa jajima *E. granulosus*. Inficiranje na kontaminiranim pašnjacima od davnina do današnjih dana je dominantni način infekcije ovaca i koza.





U Srbiji se goveda danas gaje pretežno u štalskim uslovima. Ipak, postoje regije u kojima je pašni način gajenja goveda značajan i dominantan u odnosu na štalski. U odnosu na ove činjenice uslovi inficiranja ove vrste su se izmenili. S obzirom na sve ređi boravak goveda na pašnjacima, smanjio se značaj ovog načina inficiranja. Međutim, i dalje je ostala značajna kontaminacija livada fecesom inficiranih stalnih domaćina. Pošto su jaja *E. granulosus* otporna u spoljašnjoj sredini, pripremom i čuvanjem sena sa kontaminiranih pašnjaka, čuvaju se i jaja parazita sve do hranjenja životinja. Sa druge strane, relativno loši biosigurnosni uslovi u objektima za gajenje goveda, pogotovo u ekstenzivnim uslovima gajenja, omogućavaju nesmetani pristup vlasničkih, kao i nevlasničkih pasa (pasa lotalica) objektima i njihovu direktnu kontaminaciju. Za životinje koje se u Srbiji gaje pretežno na paši inficiranje se dešava na pašnjacima. U zemljama zapadne Evrope sa intenzivnom govedarskom proizvodnjom dominantan je pašni način gajenja. Međutim, u njima ne postoji problem nevlasničkih pasa, koji bi predstavljali izvor infekcije, ali nije isključena mogućnost da infekciju šire druge vrste životinja.

Svinje kao prelazni domaćini se relativno lako inficiraju, imajući u vidu činjenicu da su svaštojedi, kao i nizak biosigurnosni nivo njihovog gajenja sa slobodnim pristupom pasa ovim objektima.

Bez obzira na to koji su bili putevi širenja uzročnika u životnoj okolini, u organizam prijemčivog prelaznog domaćina jaja uvek dospevaju peroralnim putem. Prelazni domaćin unosi u svoj organizam jaja pantljičare ishranom kontaminiranom hranom ili vodom.

#### **2.4.3. Raširenost hidatidoze kod životinja u Srbiji**

Prema rezultatima istraživanja u Republici Srbiji pantljičara *E. granulosus* prisutna je u značajnoj meri. Dominantni stalni domaćin ove vrste je pas, a prevalencija infekcije je različita u različitim krajevima (Dimitrijević, 1996). Procenat inficiranih vlasničkih pasa kreće se od 15% u Valjevu, Nišu i Zrenjaninu (Marković, 1978; Antanasijević, 1993; Paunović i sar., 1994) do 48% kod pasa u Požarevcu (Tešić, 1997) i Zaječaru (Simonović, 1974). U Valjevu je ovom pantljičarom inficirano oko 70% nevlasničkih pasa (Vesić, 1996).



U Republici Srbiji procenat domaćih životinja kod kojih je ustanovljeno prisustvo *E. polymorphus* značajno varira u odnosu na vrstu životinja, način gajenja, geografsku lokaciju i socio-ekonomske uslove. Hidatidoza je najčešće dijagnostikovana kod ovaca, goveda i svinja (Dimitrijević, 1996; Antanasijević i sar., 1997; Kulišić i sar., 1999). Na osnovu izveštaja veterinarske inspekcije na klanicama na području Srbije, hidatidoza je registrovana kod 4,0–5,5% ovaca, 0,6–4,5% goveda i 4,0–4,3% svinja. U pojedinim krajevima Srbije istraživanja su pokazala da je hidatidoza prisutna kod starijih kategorija ovaca (70,64–95,0%), kod junadi (5,76–7,27%), kod goveda (56,95–94,61%) i svinja (2,41–34,8%) (Simonović, 1974; Marković, 1978; Lepojević i sar., 1989; Stevanović, 1992; Damjanović i sar., 1995; Dimitrijević, 1996).

Razlozi ovako nepovoljne epizootičke situacije su višestruki. Najveća prevalencija je kod ovaca i svinja, kod kojih je najveći procenat hidatidnih cista fertilan (kod ovaca 93%, kod svinja 88%), dok kod goveda iznosi 13% (Kulišić i sar., 1999).

Poseban problem je izostanak sistematskog praćenja prevalencije ehinokokoze/hidatidoze u Republici Srbiji u toku poslednjih 20 godina (Pavlović i sar., 2011).

## 2.5. Patomorfološke promene kod životinja

Izgled pojedinih organa u kojima se nalaze hidatidne ciste zavisi od broja i veličine pojedinih cista. Ponekad se mogu naći samo pojedinačne ciste koje se često i ne primećuju spoljašnjim pregledom organa, ako su manje veličine i ako su lokalizovane u unutrašnjosti organa. Međutim, često ih može biti toliko da je zahvaćeni organ višestruko uvećan. Kod ovaca i svinja veličina cista je najčešće u rasponu od 4 do 5 cm u prečniku, retko kada veća, s obzirom na činjenicu da se ove kategorije životinja iz ekonomskih razloga gaje do 2–3 godine starosti. Izuzetak predstavljaju priplodne životinje kod kojih se u starosti od 5–6 godina mogu naći ciste većeg promera. Kod goveda, posebno starijih, mogu se naći znatno veće hidatidne ciste veličine do 10 cm u prečniku, pa i veće (Šibalić i Cvetković, 1996; Dimitrijević i Ilić, 2011). Znatno veće dimenzije ciste dostižu kod ljudi (Stanley, 1985; Mc Gavin i Zachary, 2007).

*Echinococcus polymorphus* je cističnog ili mehurastog tipa. Ispunjena je bistrom vodenastom, ponekad zamućenom, žutom providnom tečnošću, bez mirisa (hidatidna



tečnost). Hidatidna cista je gotovo uvek pod pritiskom, tvrda i ne fluktuirá (Jovanović i sar., 2012).

Kod domaćih životinja kao prelaznih domaćina, obično se radi o primarnoj unilokularnoj cisti. U organima se javljaju poput pojedinačnih (solitarnih) cista ili multipno što je mnogo češće pri infekciji visokog intenziteta, a karakteriše se razvojem brojnih cista. Oblik ciste, u uslovima nesmetanog razvoja najčešće je okruglast. Međutim, na istom organu mogu da se nađu ciste različite veličine, što se objašnjava neujednačenim rastom, superinfekcijama ili imunskim statusom domaćina.

U starijim cistama većih dimenzija ponekad se mogu naći ciste ćerke, koje su češće kod ljudi.

Znatno ređe može se razviti i multilokularna cista. Najčešća je kod goveda, ponekad kod ovaca, veoma retko kod svinja. Multilokularna cista je konglomerat sastavljen iz mnogobrojnih cista, a svaka pojedinačna cista obavijena je svojom posebnom vezivno-tkivnom membranom (*membrana adventitia*), s tim što su membrane konglomerata povezane međusobno u vidu mreže fibroznog tkiva. Po lokalizaciji, ovaj tip cista se razvija najčešće u jetri (Jakšić i Sofrenović, 1979).

Već 12 časova posle infekcije onkosfere se mogu naći u jetri okružene mononuklearnim ćelijama. Trećeg dana, zbog prisustva većeg broja eozinofila formacija se povećava. U tom stadijumu zapažaju se citološke i kariolitične promene u susednim hepatocitima, što se pripisuje delovanju parazitskih toksina. Posle 14 dana od lokalizacije onkosfere, parazitska forma postaje cistična i mogu se zapaziti tri zone. Oko parazita koji se nalazi u centru koncentriše se sloj radijalno raspoređenih ćelija. Oko ove zone nalazi se sloj mononuklearnih ćelija, eozinofila, džinovskih ćelija, fibroblasta i leukocita. Na periferiji se nalazi zona degenerisanih hepatocita sa reakcijom krvnih sudova. Oko ove zone nalazi se normalno jetrino tkivo (Jones i sar., 1996; Šibalić i Cvetković, 1996).

Pri infekciji visokog intenziteta između pojedinih cista mogu ostati manja ili veća ostrvca jetrinog tkiva, gde se može razviti kompenzatorna hipertrofija. Dalji rast cista i kompenzatorna hipertrofija imaju za posledicu povećanje čitavog organa i do 10 puta. Kompresiona atrofija, kompenzatorna hipertrofija i stagnacioni ikterus usled kompresije žučnih kanala najčešće su patološke posledice razvoja hidatidne ciste na jetri (Jakšić i Sofrenović, 1979; Šibalić i Cvetković, 1996).



Lokalizacija hidatidne ciste u plućima najčešća je kod goveda i ovaca, ređa kod svinja, a može da se nađe i kod koza i konja. Patološke promene koje hidatidne ciste mogu izazvati u ovom organu zavisi od njihove lokalizacije i veličine.

Slične promene, ali znatno ređe, mogu se naći na drugim organima (bubreg, srce, slezina), pri čemu vrsta i stepen patološkog delovanja zavisi od organa, lokalizacije i veličine ciste.

Velike ciste koje se nalaze na površini organa mogu vršiti pritisak na ogranke *v. porte*, što ponekad dovodi do portne hipertenzije i ascitesa (Jovanović i sar., 2012).

Retka je pojava prodiranja sadržaja hidatidne ciste sa skoleksima u krvne sudove sa posledičnom embolijom, odnosno hematogenim rasejavanjem skoleksa, koje rezultira sekundarnom ehinokozom (Jakšić i Sofrenović, 1979).

Parazit može da ugine u bilo kojoj fazi razvoja. Tada se tečnost zamuti, a cista se vremenom smežurava. Sadržaj ciste postaje gust, a kasnije kalcifikuje. Sekundarne promene hidatidne ciste su najčešće kod konja, ali ima ih i kod drugih vrsta, i najčešće se javljaju kao posledica otežane ili sprečene ishrane. To se najčešće dešava kada je vezivno-tkivnu kapsulu, odnosno pericistični prostor, zahvatio inflamatorni proces, hemoragija ili drugi patološki proces. Zbog makroskopskog izgleda ovih cista diferencijalno-dijagnostički treba isključiti druge bolesti (tuberkuloza), kod kojih se javljaju slične promene.

## **2.6. Epidemiologija hidatidoze kod ljudi**

### **2.6.1. Izvori infekcije ljudi**

Ljudi se najčešće inficiraju indirektno preko povrća koje nije dobro oprano, a kontaminirano je fecesom pasa. Kod dece je najčešća direktna infekcija usled unosa jaja parazita sa dlake inficiranih pasa. Za razliku od domaćih i divljih životinja prelaznih domaćina, čovek predstavlja sporednu, slučajnu žrtvu infekcije bez značaja u epizootologiji oboljenja i njenom daljem širenju (Šibalić i Cvetković, 1996; Kulišić, 2001; Dimitrijević i Ilić, 2011).

### **2.6.2. Raširenost hidatidoze kod ljudi u Srbiji**

Region bivše SFRJ je svrstan u endemsko područje hidatidoze, sa incidencijom od 3,7 (1969) do 4,75 (1985) na 100.000 stanovnika. Kao hiperendemske oblasti sa

incidencijom oboljenja preko 12 na 100.000 stanovnika definisane su: Dalmacija, Hercegovina, severna Crna Gora, istočna Srbija, Raška regija, Kosovo i Metohija, Makedonija (Mantovani i Lasagha, 2004; Čolović, 2009).

Epidemiološka situacija hidatidoze kod ljudi poznata je samo u izvesnoj meri, kod dela populacije sa određenim zdravstvenim problemima i sprovedenim dijagnostičkim postupcima. Podaci se odnose na zvaničnu prijavu oboljenja, pri čemu se pretpostavlja da značajan broj bolesnika koji su čak tretirani bolnički, nisu zvanično prijavljeni.

Prema podacima Instituta za bolesti digestivnog sistema KC Srbije, evidentiran je stalni porast bolesnika operisanih od hidatidoze. U periodu 1990–2005. godine na ovom Institutu, od hidatidoze sa lokalizacijom na jetri, operisan je 651 bolesnik. U Univerzitetskoj dečijoj klinici u Tiršovoj, u periodu januar 2004–avgust 2009. godine od hidatidoze je operisano preko 80 dece (Čolović, 2009).

Na teritoriji Republike Srbije u 2012. godini od hidatidoze je obolelo 39 ljudi (incidencija 0,54/100.000), sa dominantnom lokalizacijom na jetri (34 osobe). Od toga, 29 osoba obolelo je u centralnoj Srbiji, a u Vojvodini 10 osoba. U uzrastu iznad 15 godina obolelo je 38 osoba, a među obolelima su dominirale osobe ženskog pola (61%) (Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, 2013). U 2014. godini od hidatidoze je obolelo 45 osoba (incidencija 0,63/100.000), sa dominantnom lokalizacijom na jetri (39 osoba). Sve obolele osobe su u uzrastu iznad sedam godina, pri čemu je ženski pol dominantan (68,9%) (Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, 2015).

U periodu 1998–2010. godine incidencija hidatidoze u Republici Srbiji iznosila je 0,28–0,63/100.000 stanovnika. Geografska distribucija bolesti pokazuje značajne varijacije. Kumulativna incidencija zvanično prijavljenih slučajeva u desetogodišnjem periodu (2001–2010.) kreće se od 0,46/100.000 u centralnom delu, do 39,0/100.000 u južnom delu zemlje. U toku perioda bolest je pokazivala tendenciju smanjenja broja obolele dece, a češće se pojavljivala kod osoba ženskog pola. Podaci se odnose na zvaničnu prijavu oboljenja, pri čemu se pretpostavlja da značajan broj bolesnika koji su i bolnički tretirani nisu zvanično prijavljeni (Bobić i sar., 2012; Bobić i sar., 2014). U periodu 2005–2008. godine u Srbiji hidatidoza je imala tendenciju smanjenja kod ljudi. Na osnovu zvaničnih prijave incidencija se kretala od 0,63 (0,93 u Vojvodini) do 0,34 (Stefan-Mikić i sar., 2011).

## 2.7. Molekularna epizootiologija i epidemiologija

Savremene dijagnostičke tehnike, među kojima poseban značaj imaju molekularne tehnike, u poslednjim decenijama su dale značajan doprinos proučavanju brojnih zaraznih i parazitskih bolesti i dovele do značajnog napretka u kliničkoj praksi infektivnih bolesti. Među njima poseban značaj imaju reakcija lančane polimeraze (PCR) i sekvenciranje genoma. Pored parazitoloških metoda, ovo su jedine direktne metode kojima je moguće dokazati prisustvo genoma određenog agensa u ispitujućem materijalu. PCR je visoko specifična metoda, jer je par prajmera po ciljnoj sekvenci specifičan samo za odgovarajući fragment DNK. Iz jedne ciljne sekvence može se dobiti preko milijardu kopija koje omogućavaju njenu identifikaciju i merenje. Za ispitivanje ciljne sekvence nije neophodna velika količina DNK, niti visoki kvalitet DNK uzorka. Sekvenciranje omogućava suptilna proučavanja genetske varijabilnosti dela genoma uzročnika (Gottsein, 1992; Cikota i sar., 2002; Eckert i sar., 2002; Craig i sar., 2007; Živković, 2007; Savić Pavićević i sar., 2011; Stanimirović i Stevanović, 2012).

Molekularna epizootiologija i epidemiologija obuhvata različite laboratorijske i analitičke metode kojima se lakše može objasniti priroda uzročnika bolesti u funkciji vremena i njegovih međusobnih odnosa sa domaćinom. Podaci dobijeni molekularnom tipizacijom uzročnika oboljenja mogu se upotrebiti za molekularna epizootiološka istraživanja, koja treba da daju odgovor na pitanja mogućih izvora infekcije i geografske distribucije uzročnika na širem prostoru. Takođe, mogu biti od koristi u analizi i predviđanju patogenosti pojedinih genetskih varijanti (sojeva). Poznavanje genetskih karakteristika i varijabilnosti uzročnika oboljenja omogućava njegovu kvalitetniju dijagnostiku i taksonomiju. Iz navedenih razloga danas svaka ozbiljnija epizootiološka i epidemiološka studija u svom sastavu mora da ima i deo koji rezultate molekularnih ispitivanja stavlja u kontekst kompleksne discipline – molekularne epizootiologije i epidemiologije (Petrović i sar., 2010).

U okviru daljeg unapređenja znanja u oblasti genetske raznolikosti uzročnika ehinokokoze/hidatidoze, od posebnog značaja su sledeće aktivnosti: uspostavljanje banke gena različitih razvojnih oblika pantljičara iz roda *Echinococcus*, uspostavljanje banke seruma ljudi inficiranih ovim parazitima, uvođenje akreditovanih dijagnostičkih postupaka za različite razvojne oblike parazita i različite metode, studije genetskog polimorfizma *E.*

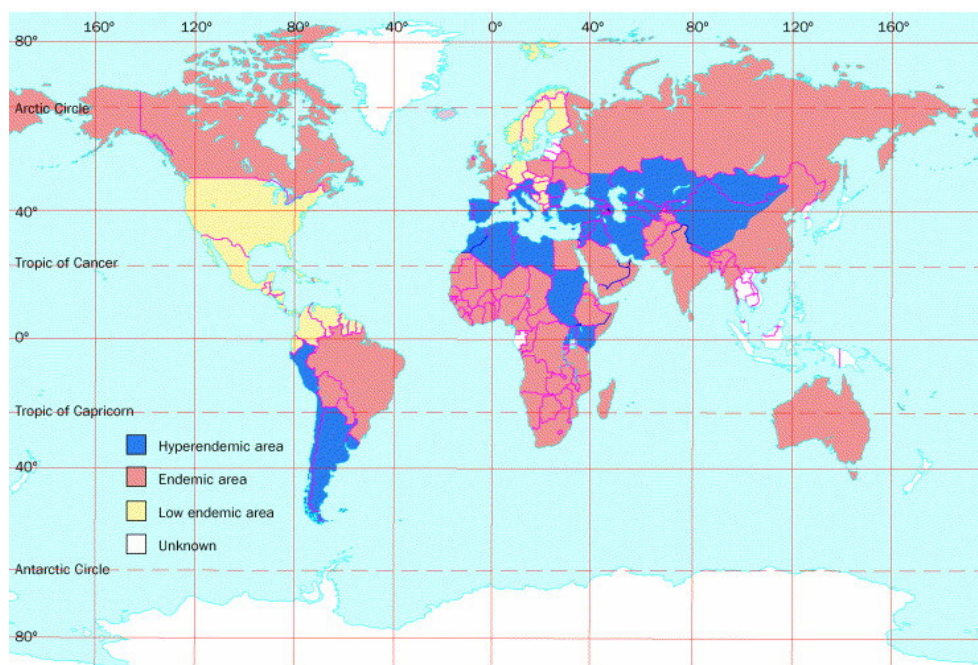


*granulosus* s.s., uspostavljanje mreže nacionalnih referentnih laboratorija i njihovo uključivanje u međulaboratorijska testiranja u koordinaciji sa EU referentnom laboratorijom (Pozio i sar., 2010; Pozio i sar., 2011).

### 2.7.1. Geografska distribucija *Echinococcus granulosus sensu lato*

*Echinococcus granulosus* beleži svetsku rasprostranjenost, sa dominacijom u zemljama Evroazije, Južne i Centralne Amerike, Australije, evropskom i afričkom delu Mediteranske regije, Bliskog Istoka, subsaharskih zemalja, Rusije i Kine (Gottstein i sar., 2010).

**Kartogram 1.** Distribucija hidatidoze u svetu (Gottstein, 1986)



Među 10 poznatih genotipova *E. granulosus s.l.* kompleksa, genotip G1 je kosmopolitski rasprostranjen genotip kod: ovaca, goveda, svinja, koza, bivola i ljudi (Andresiuk i sar., 2009).

Podaci Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA) za 2002. godinu govore u prilog tvrdnji da je u Mediteranskom regionu Evropskog kontinenta *E. granulosus* prisutna sa značajnom prevalencijom. Izveštaji iz Grčke, Italije, Portugalije i Španije kod ovaca, koza, goveda, svinja i divljači to potvrđuju. Najviša prevalencija je ustanovljena kod ovaca i goveda. U toku 2002. godine ustanovljena prevalencija kod ovaca zaklanih na klanicama

iznosila je 3,2% (Grčka), 2,0% (Italija), 1,0% (Španija). Kod goveda ustanovljena prevalencija hidatidoze iznosila je: 1,4% (Grčka), 0,9% (Italija) i 0,7% (Španija). Kod domaćih svinja utvrđena prevalencija je niža: 1% (Grčka), 0,02% (Italija), 0,03% i 0,6% (Španija na klanicama i u domaćinstvima), za razliku od one kod divljih svinja koja je iznosila 1,7% (Italija) i 13,5% (Španija). U zemljama Evropske unije, u 2002. godini, hidatidoza je ustanovljena kod 266 osoba, i to: u najvećem broju slučajeva u Španiji - 175 slučajeva, Holandiji - 32 (od kojih je najveći broj importovan), Grčkoj - 24 slučajeva, Švedskoj - 14, Portugaliji - 11, Engleskoj i Velsu - 10 slučajeva (EFSA Journal, 2002).

Izveštaji iste agencije za 2013. godinu su potpuniji i sveobuhvatniji. Bolest kod ljudi je obavezna za prijavu u 11 zemalja članica (Austrija, Belgija, Estonija, Finska, Mađarska, Italija, Letonija, Slovenija, Holandija, Španija i Švedska) i Norveškoj. Nije obavezna za prijavu u Irskoj, Slovačkoj i Ujedinjenom Kraljevstvu. Zvanične informacije, u obliku redovne prijave oboljenja, nisu dostupne iz: Bugarske, Kipra, Češke, Danske, Francuske, Grčke, Nemačke, Litvanije, Luksemburga, Malte, Poljske, Portugalije, Rumunije i Švajcarske. Ehinokokoza kod životinja je obavezna za prijavu u 18 zemalja članica EU (Austrija, Belgija, Danska, Estonija, Finska, Nemačka, Grčka, Italija, Letonija, Litvanija, Holandija, Portugalija, Rumunija, Slovačka, Slovenija, Španija, Švedska i Ujedinjeno Kraljevstvo) (EFSA Journal, 2013).

U toku 2013. godine u zemljama EU prijavljeno je ukupno 811 slučajeva infekcije parazitima iz roda *Echinococcus* kod ljudi, od kojih je 794 laboratorijski potvrđeno. Međutim, definicija slučaja u EU ne razdvaja cističnu od alveolarne forme bolesti kod ljudi. Sa indeksom prijave od 0,18 slučajeva na 100.000 stanovnika to je, zbirno posmatrano, smanjenje za 5,7% u poređenju sa 2012. godinom. Za razliku od stalnog pada indeksa prijavljenih obolelih od *E. granulosus*, u istom petogodišnjem periodu (2009–2013) beleži se porast broja inficiranih sa *E. multilocularis*, od koje su u 2013. godini zabeležena i 2 smrtna slučaja. Poseban problem u definisanju epidemiološke situacije bolesti je uslovljen činjenicom da 31,8% humanih slučajeva infekcije nije determinisan (evidentan) o kojoj vrsti parazita se radi (EFSA Journal, 2013).

Vodič za kontrolu hidatidoze kod domaćih životinja na liniji klanja u toku pregleda mesa namenjenog ishrani ljudi, u zemljama Evropske Unije, propisan je Direktivom 64/433/EC. U toku 2013. godine pregledano je 113.635.194 domaćih životinja (goveda, ovaca, koza, svinja i konja), u 16 zemalja članica i dve zemlje koje nisu članice EU. U osam



zemalja članica i jednoj koja nije članica EU ukupno je prijavljeno 141.505 pozitivnih životinja, uglavnom ovaca (76,9%) i goveda (17,2%). Od ukupno prijavljenih pozitivnih životinja najviše pozitivnih ustanovljeno je u Španiji (58,8%) i Ujedinjenom Kraljevstvu (25,4%), a znatno manje u Italiji (10,9%) i Grčkoj (4,7%) (EFSA Journal, 2013).

U okviru molekularnih proučavanja genotipova parazita u brojnim evropskim zemljama, ustanovljeno je prisustvo sledećih sojeva *E.granulosus s.s.*: G1 – Francuska, Portugalija, Italija, UK, Bugarska, Rumunija i Španija; G2 – Bugarska, Francuska, Italija, Portugalija, Rumunija i Španija; G3 – Bugarska, Francuska, Italija, Portugalija, Rumunija, i Španija; G4 – UK, Irska, Italija, Španija i Švajcarska; G5 – Italija i Švajcarska; G7 – Italija, Rumunija, Španija, Slovačka, Poljska, Letonija, Litvanija i Estonija; G9 – Poljska; G10 – Finska i Švedska (EFSA Scientific report, 2010).

Opsežna molekularna istraživanja uzročnika hidatidoze rađena su u zemljama gde ova bolest predstavlja veliki epizootiološko-epidemiološki problem. Među njima svakako prednjači regija Bliskog Istoka, a posebno Turska, Pakistan i Iran.

Molekularnim proučavanjem materijala iz hidatidnih cista u Turskoj ustanovljeno je dominantno prisustvo *E. granulosus s.s.* (G1, G2 i G3) (Vural i sar., 2010; Snabel i sar., 2009). Prevalencija bolesti izazvana ovim sojevima kod ovaca, goveda, bizona i kamila kreće se u rasponima: 1,3–74%, 1,3–38,3%, 9–25,7% i 11–35,2% (Youssefi i sar., 2013). Takođe, u ovoj zemlji je u poslednjih deset godina sve češći nalaz svinjskog soja G7, kao uzročnika bolesti kod ljudi. Pretpostavlja se da su rezervoari genotipa G7 divlje svinje i koze (Snabel i sar., 2009; Ergin i sar., 2010).

U Iranu je ovo je jedna od najzastupljenijih zoonoza, gde se ovce, goveda i koze kolju na tradicionalan način uz neadekvatno postupanje sa konfiskatima (Samavotian i sar., 2009). U ovoj zemlji je najzastupljeniji ovčiji soj (G1) (Ahmadi i sar., 2002; Nejad i sar., 2010; Parsa i sar., 2010; Hajjalilo i sar., 2011; Pezeshki i sar., 2012). U različitim regijama Irana često se dokazuje genotip G6 (Ahmadi i sar., 2002; Nejad i sar., 2010; Hajjalilo i sar., 2011), kao i genotip G3 (Harandi i sar., 2002; Pezeshki i sar., 2012).

Po rezultatima jednog istraživanja, u Pakistanu je 45% goveda, 60% bizona, 20% ovaca i 20% koza inficirano ovčijim sojem (G1) (Shahzad i sar., 2014). Po drugom istraživanju u Pakistanu, molekularnim ispitivanjima prisutnih parazita roda *Echinococcus* kod ljudi i životinja ustanovljeno je da je infekcija sa *E. granulosus* zastupljena sa 25% , a

*E. multilocularis* sa 16%. Ovčiji soj (G1) *E. granulosus s.s.* sa 23%, znatno je zastupljeniji u poređenju sa G6 genotipom *E. canadensis* (2,9%).

Pored ranije poznata dva genotipa (G1 i G6) kod ovaca, goveda i ljudi, u Tunisu je po prvi put ustanovljeno prisustvo i genotipa G3 kod ljudi i goveda (M'rad i sar., 2010).

Ispitivanjima koja su rađena u Severnoj Africi (Kenija i Sudan), ustanovljena je dominacija ovčijeg soja (genotip G1), a u manjem obimu *E. ortleppi* (genotip G5), kao i *E. canadensis* (G6 i G7 genotipovi) (Dinkel i sar., 2004).

Molekularna istraživanja materijala iz hidatidnih cista, koji su poticali od kamila i ljudi obolelih od hidatidoze u Egiptu, govore u prilog dominantnom prisustvu kamiljeg soja (G6) (Khalifa i sar., 2014).

U Kanadi je bolest bila veoma zastupljena u indijanskim plemenima i populaciji Eskima na severozapadu zemlje (40%). Pored endemskog karaktera bolesti u ovim regijama prevalencija bolesti se povećala masovnim prilivom imigranata iz Mediteranske regije (Gloria i sar., 1967).

Ispitivanjima sprovedenim u Argentini definisano je dominantno prisustvo genotipa G1 sa više haplotipova (Andresiuk i sar., 2009).

U Meksiku je u okviru *E. granulosus* ustanovljen kao dominantan ovčiji soj (genotip G1), kao i *E. canadensis*, svinjski soj, (genotip G7) (Villatobas i sar., 2007).

Molekularnom analizom četiri umnožena EmsB mikrosatelitna markera poreklom od adultnih oblika parazita kod pasa iz Srbije, dva uzorka su pripadala genotipu G7, a dva genotipu G1 (Čolović, 2009).

Dominantni haplotip svetske i evropske rasprostranjenosti *E. granulosus s.s.* je EG1, koji je prisutan i na Bliskom Istoku. Genetska varijabilnost *E. granulosus s.s.* se značajno razlikuje u odnosu na *E. multilocularis*. Ova razlika je uslovljena verovatno razlikama u životnom ciklusu ove dve vrste. *Echinococcus granulosus s.s.* dominantno je vezan za životni ciklus u kome su domaće životinje stalni i prelazni domaćini, što omogućava njihov intenzivan kontakt i mogućnost razvoja genetske varijabilnosti. *Echinococcus multilocularis* je u ciklusu razvoja vezana za divlje životinje kao domaćine (lisice i glodari), sa slabijim uslovima za ispoljavanje genetske varijabilnosti (Yanagida i sar., 2012).

Molekularnim ispitivanjima hidatidoze u Indiji ustanovljeno je značajno prisustvo ovčijeg soja (G1) i soja bivola (G3) kao dominantnih genotipova, koji izazivaju bolest

kod ljudi. Takođe, ustanovljeni su i prvi slučajevi infekcije ljudi sa goveđim sojem (G5), kao i prisustvo kamiljeg soja (G6) (Sharma i sar., 2013).

Ispitivanjima u Zapadnoj Kini ustanovljeno je da je dominantni genotip G1, a u okviru 10 identifikovanih haplotipova preovladava H1 (Zhong i sar., 2014).

Najveći broj ispitanih uzoraka na teritoriji Rumunije pripada kompleksu *E. granulosus s.s.* (genotipovi G1–G3). Takođe, u ovoj zemlji je po prvi put u materijalu poreklom iz ciste operisanog pacijenta ustanovljen *E. canadensis*, genotip G7, koji je često dokazivan kod svinja i pasa u mnogim zemljama Istočne i Jugoistočne Evrope (Dumitru i sar., 2011; Piccoli i sar., 2012).

Proučavanjem materijala iz hidatidnih cista domaćih životinja u Italiji ustanovljeno je prisustvo 7 haplotipova, u Istočnoj Evropi 23, na Tibetanskoj visoravni 43 haplotipa. Proučavanjem haplotipova u Italiji i zemljama Istočne Evrope (Bugarske, Rumunije i Mađarske), ustanovljeno je da haplotipovi EG1–EG3 odgovaraju G1–G3 genotipovima (Casuli i sar., 2012).

Dosadašnja ispitivanja ljudi obolelih od hidatidoze u Srbiji (22 ciste), pokazala su postojanje *E. granulosus s.s.*, genotipova: G1 (9 uzoraka) i G7 (13 uzoraka). Početna istraživanja kod životinja realizovana su kod: 8 ovaca (po 4 ovce sa cistama na jetri i plućima, poreklom iz Istočne Srbije), 6 goveda (sa klanice Knjaževac) i 4 svinje (sa klanice Bačka Topola). Kod svih 8 ovaca dokazano je prisustvo G1 genotipa, koji je ustanovljen i kod 2 govečeta i 2 svinje. *E. canadensis*, genotip G7, ustanovljen je kod 2 govečeta i 2 svinje (Maillard i sar., 2008; Čolović, 2009; Čolović i sar., 2009).

Poznavanje prisustva pojedinih sojeva na određenom terenu ima epizootiološko-epidemiološki značaj i veoma je bitno u razumevanju situacije bolesti na terenu, kao i u programima suzbijanja infekcije (Debeljak i sar., 2013).



### 3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

1. Da se u organima poreklom od različitih vrsta životinja različite starosti, ustanovi distribucija hidatidnih cista, njihov broj, tip, veličina, količina hidatidne tečnosti, fertilnost i vijabilnost;
2. Da se identifikuju prisutni genotipovi i haplotipovi *E. granulosus s.l.* kod ispitivanih vrsta životinja;
3. Da se definišu dominantni genotipovi po vrstama ispitivanih životinja;
4. Da se ustanove epizootiološke karakteristike hidatidoze kod ispitivanih vrsta životinja u Republici Srbiji.

Zadaci istraživanja ove doktorske disertacije su:

1. Makroskopski pregled organa životinja zaklanih u klanici, odnosno u toku obdukcije uginulih domaćih ili odstreljenih divljih životinja;
2. Prikupljanje opštih i epizootioloških podataka koji se odnose na životinje kod kojih su ustanovljene hidatidne ciste, u cilju proučavanja epizootioloških karakteristika po vrstama životinja;
3. Uzorkovanje organa sa hidatidnim cistama i dostava u laboratoriju;
4. Ispitivanje hidatidnih cista u cilju utvrđivanja njihove distribucije u organima, broja, tipa i veličine, patomorfološkim i morfometrijskim pregledom;
5. Uzorkovanje sadržaja cista za dalja laboratorijska ispitivanja;
6. Ispitivanje fertilnosti i vijabilnosti cista;
7. Molekularna ispitivanja sadržaja hidatidnih cista u cilju determinacije genotipova i haplotipova u okviru *E. granulosus s.l.* korišćenjem PCR metodologije i sekvenciranja po protokolu MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite u Rimu (EURLP). Takođe, izvršiće se poređenje

dobijenih proizvoda sekvenciranja sa referentnim nukleotidnim sekvencama za pojedine genotipove koji su registrovani u banci gena (GenBank). Potvrđivanje genotipova i haplotipizacija radiće se u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite u Rimu (EURLP).

8. Statistička obrada dobijenih podataka;
9. Epizootiološka analitika dobijenih rezultata.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. Materijal

#### 4.1.1. Materijal poreklom od životinja - organi sa hidatidnim cistama

Kao materijal poreklom od životinja za morfometrijska, parazitološka i molekularna ispitivanja korišćeni su organi sa hidatidnim cistama koje su ustanovljene u okviru redovne kontrole klanja domaćih životinja u registrovanim klanicama.

Manji broj organa uzorkovan je u toku obdukcija leševa uginulih životinja (svinja), koje su rađene na terenu i u obdukcionoj sali Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ u Kraljevu. Organi divljih svinja uzorkovani su u toku realizacije nacionalnog aktivnog nadzora bolesti klasične kuge svinja kod ove životinjske vrste.

Organi sa hidatidnim cistama uzorkovani su u periodu od marta 2012. do marta 2014. godine.

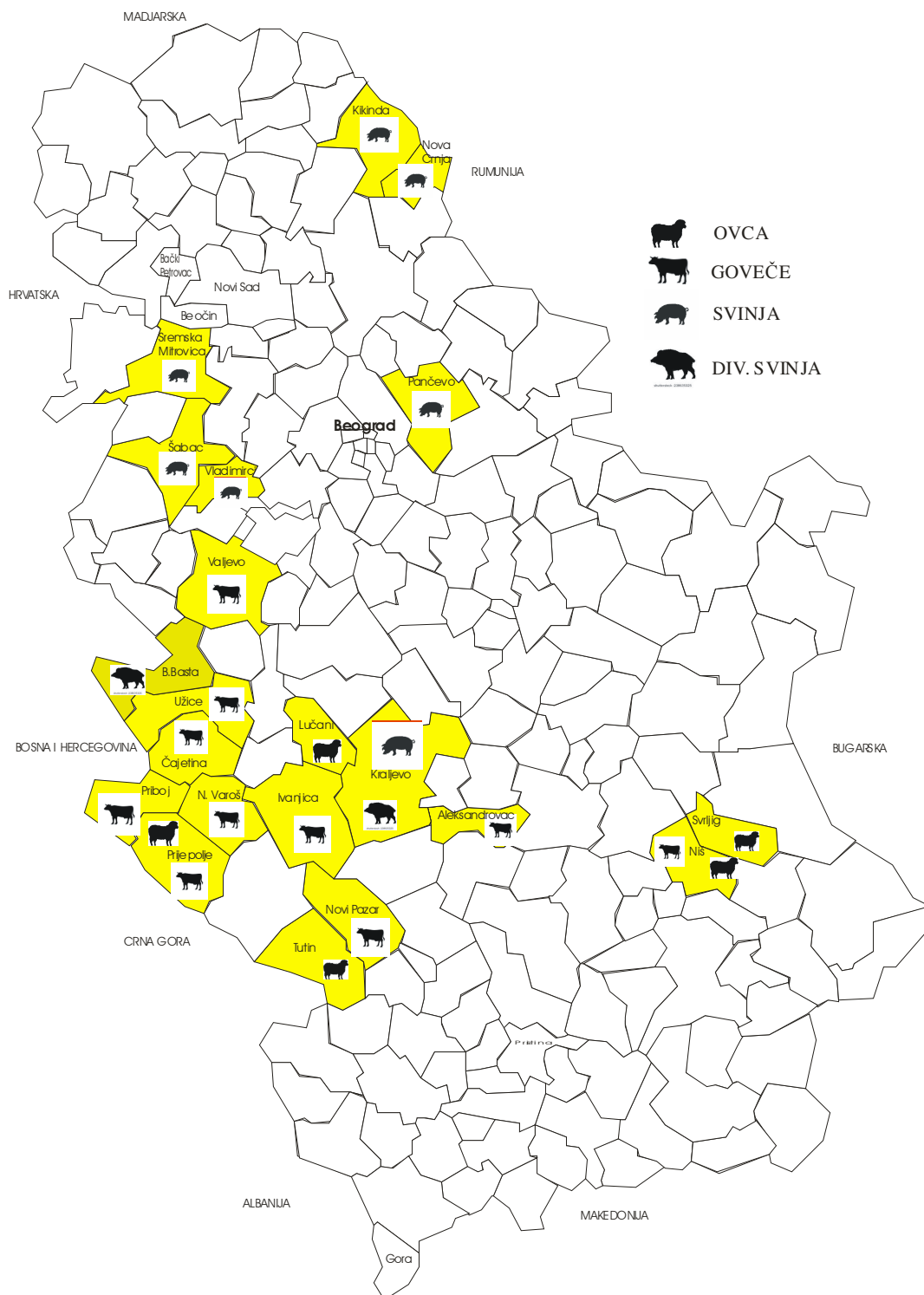
Ukupno je uzorkovan materijal od 97 životinja, i to od: 25 goveda, 21 ovce, 49 domaćih svinja i 2 divlje svinje.

Životinje na čijim organima su ustanovljene hidatidne ciste i koji su uzorkovani za ispitivanja, poreklom su iz različitih regija u Republici Srbiji, sa teritorije 21 opštine: Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac, Niš, Užice, Novi Pazar, Valjevo (goveda), Niš, Svrljig, Prijepolje, Lučani, Tutin (ovce), Kikinda, Nova Crnja, Vladimirci, Šabac, Kraljevo, Sremska Mitrovica, Pančevo (domaće svinje), Kraljevo i Bajina Bašta (divlje svinje). Poreklo životinja od kojih potiču uzorci, prikazano po životinjskim vrstama, regijama i opštinama, dato je u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Materijal za ispitivanja hidatidoze prikazan po regijama i opštinama porekla životinjskih vrsta

REGIJA	OPŠTINA	Goveče	Ovca	Domaća svinja	Divlja svinja
Istočna regija Srbije	1. Niš	2	2		
	2. Svrlijig		10		
Jugozapadna i Centralna regija Srbije	3. Bajina Bašta				1
	4. Užice	2			
	5. Prijepolje	5	7		
	6. Priboj	3			
	7. Nova Varoš	1			
	8. Čajetina	6			
	9. Tutin		1		
	10. Novi Pazar	2			
	11. Ivanjica	2			
	12. Lučani		1		
	13. Kraljevo			4	1
	14. Aleksandrovac	1			
	15. Šabac			7	
	16. Vladimirci			6	
	17. Valjevo	1			
Severoistočna regija Srbije	18. Nova Crnja			15	
	19. Kikinda			2	
	20. Sr. Mitrovica			9	
	21. Pančevo			6	
<b>Ukupno</b>		<b>25</b>	<b>21</b>	<b>49</b>	<b>2</b>
		<b>97</b>			

Geografska distribucija porekla životinja od kojih su uzorkovani organi za morfometrijski i parazitološki pregled prikazana je na Kartogramu 2.



**Kartogram 2.** Geografska distribucija porekla životinja od kojih su uzorkovani organi za ispitivanje hidatidoze



Za svaku životinju kod koje je ustanovljeno prisustvo hidatidnih cista na nekom od organa prikupljeni su epizootiološki podaci od značaja u analizi epizootioloških karakteristika oboljenja.

Pored opštih podataka koji se odnose na lokaciju i datum klanja životinje kod koje je postavljena sumnja na hidatidozu, za svaku jedinku su prikupljeni podaci koji se odnose na njeno poreklo: mesto, opština i okrug. Uz podatke o vrsti i polu definisan je i način gajenja kao: intenzivan i ekstenzivan, a stanje uhranjenosti kao: loše, srednje i dobro. Starost životinja je razvrstavana u tri kategorije: do 3 godine, od 3 do 5 godina i starije od 5 godina. Takođe, u delu ankete evidentirani su podaci koji se odnose na organ u kome je ustanovljeno prisustvo hidatidnih cista, kao i identifikacija i način obeležavanja uzorkovanog organa.

Ovi podaci prikupljeni su na jedinstven način, popunjavanjem anketnog lista koji je namenski pripremljen za ove potrebe pre početka prikupljanja uzoraka. Forma i sadržaj anketnog lista prikazani su u Tabeli 4.

**Tabela 4.** Anketni list za prikupljanje podataka koji se odnose na životinju kod koje je ustanovljeno prisustvo hidatidne ciste

1. PODACI KOJI SE ODNOSI NA MESTO KLANJA  
I ŽIVOTINJE KOJE SE PREGLEDAJU NA HIDATIDOZU

KLANICA U KOJOJ SE VRŠI PREGLED	Okrug:		Opština:	
Mesto klanice				
Datum	Klanja:		Pregleda:	
PODACI KOJI SE ODNOSI NA ŽIVOTINJU KOJA SE PREGLEDA( iz Uverenja)	Okrug:		Opština:	
	Naselje:			
ID gazdinstva			Ekstenzivno	Intenzivno
Životinjska vrsta	1. ovca	2. goveče	3. svinja	4. koza
Pol životinje	muški		ženski	
Starost životinje	< 3 godine		3-5 godina	> 5 godina
Identifikacija životinje				
Stanje uhranjenosti	loše		srednje	dobro

Organi u kojima su ustanovljene hidatidne ciste uzorkovani su u plastične kese (vreće) i čuvani na temperaturi +4°C. U toku 24–48 časova od uzorkovanja transportovani su u laboratoriju Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ u Kraljevu. U slučaju da nije bilo moguće uzorke sačuvati i dostaviti u navedenom periodu u laboratoriju, materijal je zamrzavan na -18 °C, na ovoj temperaturi je čuvan i naknadno dostavljen za dalje ispitivanje. Uz svaki uzorak poslati su i popunjeni anketni listovi.

#### **4.1.2. Oprema za uzorkovanje i pripremu materijala za parazitološka ispitivanja**

U toku uzorkovanja materijala korišćena je sledeća oprema:

- *PVC kese različite veličine;*
- *noževi;*
- *ručni frižideri sa hladnim ulošcima;*
- *prskalica sa 75% etil alkoholom;*
- *papirna vata;*
- *PVC sterilne brizgalice zapremine 10 ml;*
- *sterilne igle promera 1,2 mm;*
- *skalpeli, makaze i pincete;*
- *petrijeve ploče;*
- *epruvete zapremine 9 ml sa zatvaračem;*

U toku pripreme materijala za parazitološka i molekularna ispitivanja, kao i realizaciju parazitoloških ispitivanja korišćena je sledeća oprema:

- *epruvete od 9 ml sa konusnom dnom;*
- *predmetnice;*
- *mikroskop Olympus BX 41 sa objektivima 10X i 40X uvećanja;*
- *kamera Olympus E-620 za mikroskop;*
- *rastvor 0,1% eozina;*
- *mikropipete (Eppendorf Research plus);*
- *centrifuga za velike epruvete od 9 ml (Hetich Zentrifugen EBA 20);*
- *ependorf epruvete od 2 ml sa konusnim dnom;*
- *vortex aparat (Heidolph instruments, Reax top 100/2.500/ min);*



- centrifuga za eppendorf epruvete od 2 ml (Eppendorf Centrifuge 5424);
- zamzivač sa temperaturom  $-18^{\circ}\text{C}$ ;
- frižider sa temperaturom  $+4^{\circ}\text{C}$ ;

#### 4.1.3. Uzorkovanje materijala za patomorfološka i morfometrijska ispitivanja

Za morfometrijska ispitivanja uzorkovani su organi od 97 životinja (25 goveda, 21 ovce, 49 domaćih svinja i 2 divlje svinje) u kojima je ustanovljena sumnja na prisustvo hidatidnih cista (Tabela 5).

**Tabela 5.** Materijal za morfometrijska ispitivanja prikazan po vrstama životinja i organima sa hidatidnim cistama

Organi sa hidatidnim cistama	Broj životinja od kojih potiču organi			
	Goveče	Ovca	Dom. svinja	Div. svinja
Jetra	12	8	48	2
Pluća	6	11	0	0
Jetra i pluća	7	2	0	0
Jetra i srce	0	0	1	0
<b>Ukupno životinja</b>	<b>25</b>	<b>21</b>	<b>49</b>	<b>2</b>
	<b>97</b>			

Za morfometrijsko ispitivanje uzorkovani su sledeći organi: samo jetra od 70 životinja (12 goveda, 8 ovaca, 48 svinja i 2 divlje svinje), samo pluća od 17 životinja (6 goveda i 11 ovaca), jetra i pluća od 9 životinja (7 goveda i 2 ovce) i jetra i srce od 1 životinje (1 domaća svinja).

Ovim ispitivanjem pregledano je ukupno 80 uzoraka jetre (od 19 goveda, 10 ovaca, 49 domaće i 2 divlje svinje), 26 uzoraka pluća (od 13 goveda i 13 ovaca) i 1 uzorak srca poreklom od 1 domaće svinje. Broj i struktura uzoraka koji su pregledani makroskopski i morfometrijski prikazani su životinjskim vrstama i organima (Tabela 6).

**Tabela 6.** Uzorci za morfometrijska ispitivanja prikazan po vrstama životinja i organima sa hidatidnim cistama

	Životinjska vrsta				Svega	%
	Goveče	Ovca	Dom. svinja	Div. svinja		
<b>Jetra</b>	19	10	49	2	80	<b>74,8</b>
<b>Pluća</b>	13	13	0	0	26	<b>24,3</b>
<b>Srce</b>	0	0	1	0	1	<b>0,9</b>
<b>Svega</b>	<b>32</b>	<b>23</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>107</b>	<b>100,0</b>

#### 4.1.4. Uzorkovanje materijala za parazitološka ispitivanja

Iz materijala (organi sa hidatidnim cistama) koji su uzorkovani za morfometrijsko ispitivanje od 97 životinja (25 goveda, 21 ovce, 49 domaćih svinja i 2 divlje svinje) uzeti su uzorci za parazitološko ispitivanje. Iz svakog organa koji je dostavljen za morfometrijsko ispitivanje uzorkovano je 3–5 hidatidnih cista za parazitološko ispitivanje.

S obzirom na to da je isti materijal korišćen za parazitološka i molekularna ispitivanja, uzorkovanje je rađeno uz poštovanje principa sterilnog uzorkovanja, koliko je to dostavljeni materijal dozvoljavao.

Spoljašnji deo organa u kome se nalazila cista/e tretiran je prskanjem 75% etil alkoholom. Iz hidatidne ciste uz pomoć brizgalice i igle aspiriran je celokupni tečni sadržaj ciste u aseptičnim uslovima, tako da ne dođe do probijanja zida. Uz pomoć makaza i pincete rasecan je spoljašnji zid ciste i uzorkovana čitava ili deo germinativne membrane u petrijevu ploču.

Tečni sadržaj hidatidnih cista korišćen je kao uzorak za parazitološko ispitivanje fertilitnosti i vijabilnosti (Radojčević i Šebetić, 1984).

#### 4.1.5. Uzorkovanje i priprema materijala za molekularna ispitivanja

Materijal za molekularna ispitivanja uzorkovan je od 54 životinje, i to od: 16 goveda (21 uzorak), 19 ovaca (22 uzorka), 17 domaćih svinja (19 uzoraka) i 2 divlje svinje (2 uzorka). Za molekularna ispitivanja uzorkovan je sadržaj ciste i germinativna membrana, pri čemu je deo sadržaja ciste korišćen za prethodna parazitološka

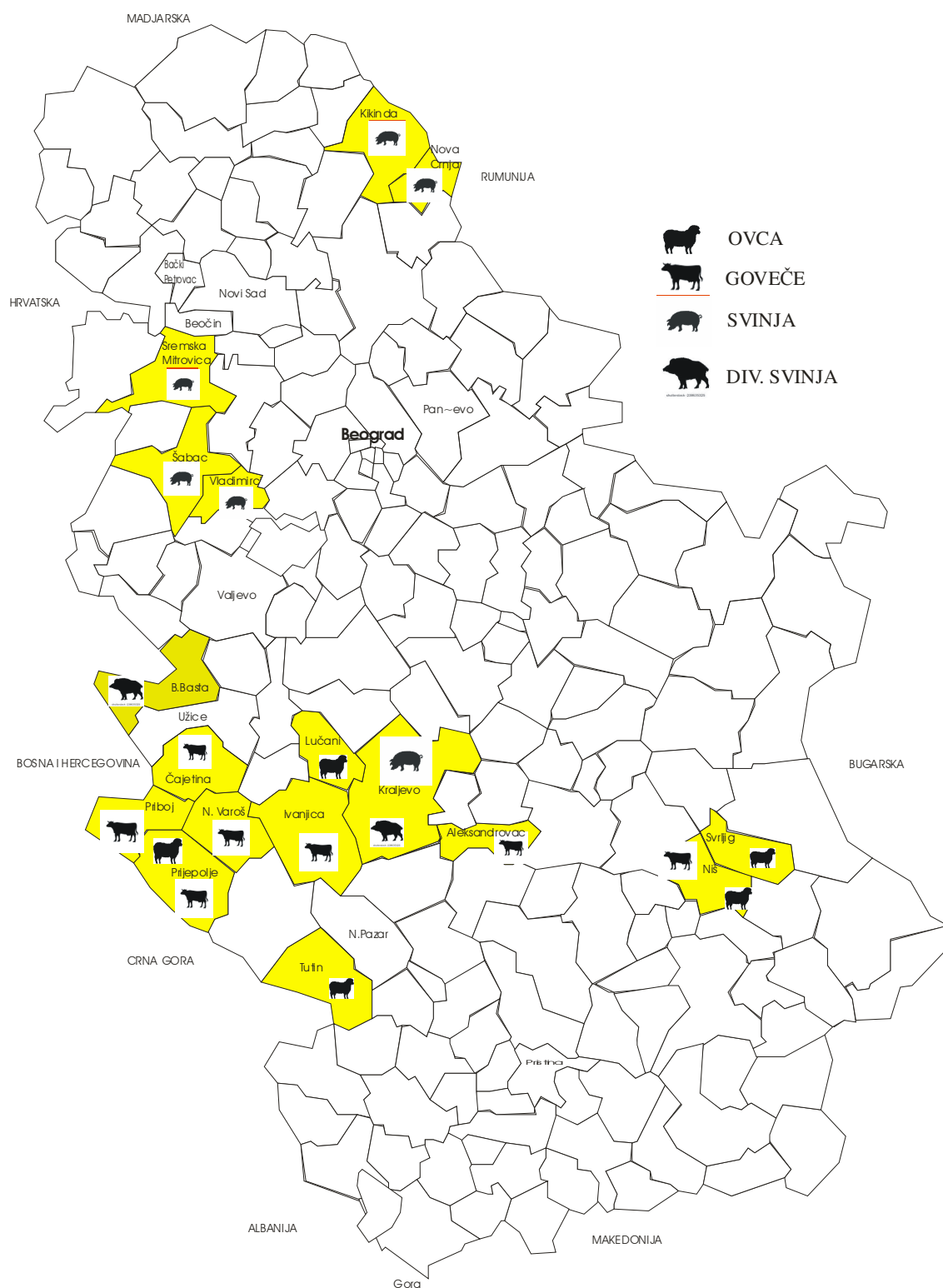
ispitivanja. Od pojedinih životinja uzorkovane su ciste iz različitih organa, kao i više cista iz istog organa (Crandall, 2000).

Uzorci za molekularna ipitivanja poreklom su sa teritorije 17 opština u Republici Srbiji, a njihova pripadnost pojedinim regijama i opštinama, kao i vrsta i broj životinja od kojih potiče uzorkovani materijal, prikazani su u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Materijal za molekularna ispitivanja prikazan po regijama i opštinama porekla ispitivanih životinja

REGIJA	OPŠTINA	Goveče	Ovca	Domaća svinja	Divlja svinja
Istočna regija Srbije	1. Niš	2	2		
	2. Svrlijig		8		
Jugozapadna i Centralna regija Srbije	3. Bajina Bašta				1
	4. Prijepolje	4	7		
	5. Priboj	2			
	6. Nova Varoš	1			
	7. Čajetina	4			
	8. Tutin		1		
	9. Ivanjica	2			
	10. Lučani		1		
	11. Kraljevo			4	1
	12. Aleksandrovac	1			
	13. Šabac			3	
Severoistočna regija Srbije	15. Nova Crnja			1	
	16. Kikinda			1	
	17. Sr. Mitrovica			6	
<b>Ukupno</b>		<b>16</b>	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>2</b>
		<b>54</b>			

Geografska distribucija porekla životinja od kojih su uzorkovani organi za molekularna ispitivanja prikazana je na Kartogramu 3.



**Kartogram 3.** Geografska distribucija porekla životinja od kojih su uzorkovani organi za molekularna ispitivanja

Kao ispitujući materijal za molekularna ispitivanja, korišćena je suspenzija dobijena mešanjem tečnog sadržaja ciste sa germinativnom membranom koja je prethodno usitnjena sterilnim priborom (makaze i pinceta). Ova suspenzija je, po potrebi, dodatno macerirana u avanu uz korišćenje tučka.

Ovako pripremljena suspenzija preneti je u epruvete zapremine 9 ml. Sadržaj je centrifugiran u toku 3 minuta na 1.500 rpm, nakon čega je odlivena tečna faza – supernatant. U epruvetu sa uzorkom (centrifugiranim talogom) dodato je 2–3 ml sterilne dejonizovane vode, sadržaj je resuspendovan korišćenjem Vortex aparata (*Heidolph instruments, Reax top 100/2.500/ min*) i ponovljeno centrifugiranje pod istim uslovima. Za prvo i drugo centrifugiranje korišćena je centrifuga *Hetich Zentrifugen EBA 20*.

Posle navedena dva ciklusa centrifugiranja i odlivanja supernatanta dodata je sterilna dejonizovana voda do ukupne količine od 1,5 ml. Sadržaj je prebačen u ependorf epruvete sa konusnim dnom od 2 ml i resuspendovan korišćenjem istog Vortex aparata. Centrifugiranje je rađeno u centrifugi za male ependorf epruvete (*Eppendorf Centrifuge 5424*) u toku 3 minuta na 3.000 rpm. Posle trećeg centrifugiranja odliven je supernatant i ponovljen postupak resuspendovanja, kao i četvrto centrifugiranje.

Priprema je završavana izdvajanjem najmanje 500 µl uzorka mikropipetom (*Eppendorf Research plus*) u ependorf epruvetu, a zatim je smrzan na -18 °C do molekularnog ispitivanja (EU RFL for Parasites, 2010).

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Patomorfološko i morfometrijsko ispitivanje

Po prijemu u laboratoriju organi sa hidatidnim promenama su ocenjeni pre svega sa aspekta stanja i očuvanosti materijala, kao i temperature čuvanja. Morfometrijsko ispitivanje je rađeno sa ciljem ustanovljavanja morfoloških karakteristika hidatidnih cista u različitim organima, a prema ustanovljenom protokolu definisanom za ovu potrebu u radnom listu „Morfološke karakteristike hidatidnih cista“. Za svaki dostavljeni i pregledani materijal vođen je ovaj radni list (Tabela 8).

Takođe, u toku ovog dela ispitivanja formirana je foto-dokumentacija morfoloških karakteristika pregledanih organa.

**Tabela 8.** Radni list za evidentiranje rezultata morfoloških karakteristika i parazitoloških ispitivanja hidatidnih cista

### 1. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE HIDATIDNIH CISTA

Identifikacija uzorka: \_\_\_\_\_ Datum pregleda: \_\_\_\_\_

Stanje materijala: dobro / loše

Način čuvanja materijala do dostave na pregled: svež (+4°C) / smrznut (-20°C)

ŽIVOTINJSKA VRSTA				ORGAN (upisati organ u kome su ustanovljene ciste)											
1. Ovca	2. Goveče	3. Svinja	4. Koza	Jetra			Pluća			Organ (_____)					
Broj ustanovljenih cista				1-10		>10		1-10		>10		1-10	>10		
Veličina cista (cm)				<5	5-10	>10	<5	5-10	>10	<5	5-10	>10			
Količina hid. tečnosti (ml)				<6	6-20	>20	<6	6-20	>20	<6	6-20	>20			
Vrsta cista po nastanku				prim.		sekund.		prim.		sekund.		prim.		sekund.	
Vrsta cista po zastupljenosti				unilok.		multilok.		unilok.		multilok.		unilok.		multilok.	
Fertilnost cista				+		-		+		-		+		-	
Afertilne – sterilne				+		-		+		-		+		-	
Afertilne – (degenerativne / kalcifikovane)				+		-		+		-		+		-	
Vijabilnost				+		-		+		-		+		-	
Uzet uzorak za molekularna ispit.				da		ne		da		ne		da		ne	

U okviru morfometrijskih ispitivanja veličina hidatidne ciste je klasifikovana kao: velika (prečnik >10 cm), srednja (5–10 cm) i mala (prečnik <5 cm). Količina hidatidne tečnosti je merena i klasifikovana kao: visoka (zapremina >20 ml), srednja (zapremina 6–20 ml) i niska (zapremina <6 ml) (Anwar i sar., 2000; Melaku i sar., 2012).

U odnosu na način formiranja, ciste su klasifikovane kao primarne ili sekundarne, a po zastupljenosti kao unilokularne i multilokularne (Šibalić i sar., 1996; Kulišić, 2001).

#### 4.2.2. Parazitološko ispitivanje

Fertilnost hidatidnih cista je ispitivana nativnom mikroskopijom sadržaja ciste na prisustvo parazitskih elemenata (protoskoleksa i kukica).





Pre centrifugiranja i pripreme uzorka za molekularna ispitivanja sadržaj hidatidne ciste je naliven u epruvetu sa konusnim dnom zapremine 9 i ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi da precipitira. Mikropipetom je preneto 30 µl precipitata na mikroskopsku predmetnicu za parazitološko ispitivanje. Drugom predmetnicom razliven je sadržaj u tankom sloju radi mikroskopskog pregleda.

Ciste u čijem sadržaju je ustanovljeno prisustvo protoskoleksa i/ili kukica determinisane su kao fertile. Ciste su determinisane kao sterilne u slučaju odsustva protoskoleksa i/ili kukica, a one su mogle biti i kalcifikovane, odnosno degenerisane, što je ustanovljeno u toku morfometrijskog ispitivanja. Mikroskopiranje je rađeno na svetlosnom mikroskopu *Olympus BX 41* uz korišćenje objektivna sa uvećanjem 10X i 40X, na kome je vršeno i fotografisanje preparata kamerom *Olympus E-620*.

Fertilne ciste su ispitivane na vijabilnost bojenjem 0,1% eozinom, pri čemu živi protoskoleksi isključuju eozin (Latif i sar., 2009). Eozin je vitalna boja i boji crveno mrtve protoskolekse, dok živi protoskoleksi ne primaju boju. Kod protoskoleksa koji nisu primili boju posmatra se aktivnost ekskretornih ćelija „*flame cells*“ protoskoleksa. U svakom protoskoleksu postoji 30 ovakvih ćelija i moguće ih je uočiti na periferiji. Protoskoleksi sa neaktivnim ekskretornim ćelijama, oštećene membrane ili obojene eozinom smatrane su mrtvim (Esfandiari i sar., 2010). Ukoliko se ne uočavaju protoskoleksi i kukice, i pored determinacije da se radi o sterilnim cistama, ne isključuje se mogućnost da se radi o hidatidnoj cisti (Daryani i sar., 2006).

Na vijabilnost su pregledani sadržaji svih uzorkovanih sadržaja cista poreklom iz organa sa hidatidnim promenama. Sadržaj cista iz organa koji su smržavani i čuvani na -18°C, takođe su pregledani na vijabilnost, ali s obzirom na to da na ovoj temperaturi protoskoleksi propadaju, temperaturni uslovi čuvanja su evidentirani uz rezultat.

#### **4.2.3. Molekularno ispitivanje**

Molekularno ispitivanje: identifikacija vrste, genotipa i haplotipa metacestoda *E. granulosus s.l.* u uzorcima hidatidnih cista rađeno je analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksidge 1 (*cox1*) gena. U radu je korišćen protokol MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite u Rimu (EU RFLP, 2010).



**Tabela 9.** Vrste i genotipovi koji pripadaju *E. granulosus s.l.* koje se identifikuju metodologijom MI-05 EURLP

Genotip	Domaćin	Vrsta
<b>G1 – ovčiji</b> - ovca, svinja, goveče, koza, čovek <b>G1BC</b> – varijanta G1 genotipa	pas, lisica, šakal	<i>E. granulosus sensu stricto</i>
<b>G2 – tasmanijske ovce</b> - ovca, goveče? čovek?	pas, lisica?	
<b>G3 – bufalo</b> – bufalo, goveče? čovek?	pas, lisica?	
<b>G4 – konjski</b> – konj i ekvidi	pas	<i>E. equinus</i>
<b>G5 – goveđi</b> – goveče, čovek	pas	<i>E. ortollepi</i>
<b>G6 – kamilji</b> – kamila, koza, goveče? čovek?	pas	<i>E. canadensis</i>
<b>G7 – svinjski</b> – svinja i čovek	pas	
<b>G8</b> – severnoamerički jelen	vuk, pas	
<b>G10</b> – skandinavski jelen		

Navedenom metodom ne može se identifikovati genotip G9 – humani poljski soj, koji se smatra varijantom svinjskog soja (G7).

U okviru molekularnih ispitivanja rađena je: lančana reakcija polimeraze, sekvenciranje i haplotipizacija.

#### 4.2.3.1. Oprema za izvođenje molekularnih ispitivanja

- uređaj za ekstrakciju DNK (*Kingfisher ml, Thermo Scientific, Finska*);
- mikropipete (*Eppendorf Research plus*) i nastavci za mikropipete;
- epruvete;
- PCR tubice;
- centrifuga, (*MiniSpin Plus, Eppendorg, Nemačka*);
- vortex uređaj (*Tehnica, Slovenija*);
- termošejker, (*TS – 100, Bio San, Letonija*);
- PCR kabinet;
- PCR uređaj (*2720 Applied Biosystems, SAD*);
- uređaj za elektroforezu, (*Sub Cell GT, Bio-Rad, SAD*);
- transiluminator (*GelDoc XR, Bio Rad, SAD*);
- sekvencer (*3130 Genetic Analyzer, 4 chanel, Applied Biosystems AD*);

#### 4.2.3.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

##### 4.2.3.2.1. Ekstrakcija DNK i priprema smeše

Ekstrakcija DNK iz sadržaja hidatidne ciste rađena je na uređaju *Kingfisher ml*, *Thermo Scientific*, uz korišćenje komercijano dostupnog kita, *MagVet (LSI, Francuska)*, po uputstvu proizvođača.

##### - Liziranje – oslobađanje DNK

Posle odmrzavanja na sobnoj temperaturi izdvojeno je 100 µl uzorka u koji je dodato 100 µl PBS, 180 µl pufera za liziranje (NM1) i 20 µl proteinaze K, koja treba da lizira ćelijsku membranu i oslobodi DNK. Pripremljena smeša je suspendovana u Vortex uređaju, a zatim je prenetu u termošejker, i to: u prvoj fazi 30 minuta na temperaturi 70°C, pri 910 obrtaja i u drugoj fazi 10 minuta na temperaturi 90 °C, pri 910 obrtaja.

##### - Priprema za automatizovanu magnetnu ekstrakciju

U uređaju za ekstrakciju svaka kolona sa po 5 bazenčića predviđena je za jedan uzorak. U svaki od 5 bazenčića jedne kolone (za jedan uzorak), dodaju se reagensi po proceduri proizvođača kita. Iz termošejkera se, nakon kratkog centrifugovanja, mikropipetom prenosi bistri deo supernatanta ispitujućeg uzorka koji je liziran u prvi bazenčić, gde su dodate magnetne čestice.

##### - Automatizovana magnetna ekstrakcija

Na metalne štapiće u uređaju za ekstrakciju navuku se plastične jednokratne navlake. Metalni štapić meša sadržaj u svakom bazenčiću preko plastične navlake 10 minuta. Iz jednog u drugi bazenčić prenosi DNK tako što za sebe veže magnetne čestice koje su za sebe vezale DNK. Proces se ponavlja pet puta u svakoj koloni (za svaki uzorak). U zadnjem bazenčiću magnetne čestice oslobađaju DNK koja se prenosi u PCR tubicu i čuva na -20 °C.

##### - Priprema MasterMiks-a

U PCR MasterMiks (*proizvođač Fermentas Litvanija*), dodaje se voda PCR čistoće (Ambion, USA) i specifični prajmeri – oligonukleotidne sekvence mitohondrijalnog markera CO1 (citohrom C-oksidaza 1 (cox1) gena):



CO1.F = 5'-TTT.TTT.GGC.CAT.CCT.GAG.GTT.TAT-3' i

CO1.R = 5'-TAA.CGA.CAT.AAC.ATA.ATG.AAA.ATG-3', (*Invitrogen, (SAD)*).

U ovako pripremljenu smešu dodaje se ekstrahovan DNK ispitujućeg uzorka i kratko centrifugira.

#### 4.2.3.2.2. Reakcija lančane polimeraze (PCR)

Umnožavanje specifičnih fragmenata DNK vršeno je u PCR uređaju (2720 *Applied Biosystems, SAD*) po protokolu sa parametrima prikazanim u Tabeli 10.

**Tabela 10.** Parametri izvođenja reakcije lančane reakcije polimeraze (PCR)

Početna denaturacija	3 minuta / 94 °C
Amplifikacija	30 sek./94 °C; 30 sek./55 °C; 30 sek./72 °C;
Broj ciklusa	38 (40)
Završna denaturacija	7 minuta / 72 °C

Posle 40 ciklusa epruvice se vade iz PCR uređaja, a dobijeni proizvodi amplifikacije se podvrgavaju elektroforezi.

#### 4.2.3.2.3. Identifikacija PCR proizvoda

##### - Priprema gela

Gel za elektroforezu se priprema od 2% Ultrapure agaroze (*Invitrogen, USA*) u 1% TAE puferu. Posle disperzije agaroze u puferu vrši se zagrevanje gela u mikrotalasnoj rerni do potpunog rastvaranja, a hladi se na 50–60°C. Gustina gela se može podesiti u zavisnosti od potrebe, pri čemu u gušćem gelu proizvodi sporije napreduju, ali se bolje razdvajaju. Posle hlađenja gel se razliva u kalup i ostavlja 30 minuta na sobnoj temperaturi. Posle 60 minuta gel se stegne kada se sa plastičnim nosačem prebacuje u kadu za elektroforezu u koju je već sipan pufer koji treba da spreči sušenje i pucanje gela.

##### - Ubacivanje uzorka i elektroforeza

Ispitujući uzorci se mikropipetom prebacuju pažljivo u udubljenja od češljeva (mogu da se prate pošto je ispitujući uzorak zbog MasterMiks-a zelene boje). Molekularni

marker, „Ruler“, služi kao standard dužine, jer se u njemu nalazi smeša „traka“ dužine 100–1000 bp, sa razlikom od po 100 bp. Elektrode sistema se spoje sa jedinicom za napajanje i elektroforeza se vrši u trajanju od 40 minuta pri naponu od 100 V.

- Bojenje etidijum-bromidom i ispiranje

Posle 40 minuta trajanja elektroforeze gel se prebacuje u kadicu sa rastvorenim etidijum-bromidom (10 mg/500 ml) radi bojenja proizvoda u toku 30 minuta. Posle bojenja gel se prebacuje u kadicu sa dejonizovanom vodom, gde se vrši ispiranje boje u trajanju od 10 minuta.

- Vizuelizacija proizvoda – prva elektroforeza

Nakon izvođenja elektroforeze i bojenja, u transiluminatoru (*GelDoc XR, Bio Rad, SAD*), umnožene sekvence su pod UV svetlošću vizuelno identifikovane na gelu kao trake definisane dužine (460 bp), gde se mogu i slikati.

Nakon PCR reakcije i vizuelizacije dobijenih PCR proizvoda vrši se njihovo isecanje iz gela skalpelom, a zatim njihova ekstrakcija i prečišćavanje.

#### **4.2.3.2.4. Prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda**

U toku ovog procesa dobijeni PCR proizvod treba da se oslobodi od gela. Za prečišćavanje proizvoda korišćen je *QIAquick gel extraction kit (Quagen)*, po uputstvu proizvođača.

U epruvetice sa isečenim komadićima gela dodaje se Binding pufer i epruvetice se stavljaju u termošejker u trajanju od 10 minuta na 50 °C, kako bi se ostatak gela istopio i rastvorio u puferu. Epruvetice sa PCR proizvodom se nikada ne otvaraju bez prethodnog centrifugiranja, zbog mogućnosti zadržavanja proizvoda na poklopcu i kontaminacije prilikom otvaranja poklopcu. Iz termošejkera uzorak se prebacuje u posebnu kolonicu sa filterom koji treba da propusti otopljeni gel i sve ostalo, izuzev PCR proizvoda koji treba da ostane na filteru. Po uputstvu proizvođača, dva puta se dodaje pufer za ispiranje i dva puta se centrifugira. Zatim se dodaje novi pufer za ispiranje PCR proizvoda sa filtera. Nakon centrifugiranja u epruvetici se dobije suspenzija PCR proizvoda u puferu za dalji postupak, za novu elektroforezu koja treba da pokaže da li je urađen zadovoljavajući nivo prečišćavanja.



#### - Vizuelizacija proizvoda – druga elektroforeza

Prečišćeni PCR proizvod ispitujućeg uzorka (5  $\mu$ l) pomeša se sa puferom za punjenje („loading dye“), koji treba da olakša vizuelizaciju ubacivanja uzorka u bazenčić. Uzorci se ubacuju u udubljenja u gelu i ponavlja se postupak kao u pripremi za prvu elektroforezu.

Elektroforeza se radi na 120 V, u trajanju od 15 minuta. Posle 15 minuta vrši se bojenje etidijum-bromidom u toku 30 minuta, a zatim ispiranje u kadici sa dejonizovanom vodom.

Vizuelizacija se radi u transiluminatoru *GelDoc XR (Bio Rad, SAD)*. U ovoj elektroforezi bendovi su slabije izraženi zbog manje količine ubačenog proizvoda. Ova vizuelizacija se koristi kao pokazatelj toga da li je prečišćavanje koje je rađeno bilo dovoljno i uspešno. Za dalji postupak sekvenciranja koristi se ostatak prečišćenog PCR proizvoda.

#### **4.2.3.3. Sekvenciranje**

Cilj DNK sekvenciranja je određivanje redosleda nukleotida u dobijenom i prečišćenom DNK proizvodu.

#### - Priprema MasterMiks-a za sekvenciranje

Sekvenciranje genoma rađeno je po Sanger metodi. Za sekvenciranje je korišćen *BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems)*, po proceduri i uputstvu proizvođača kita.

U okviru priprema MasterMiks-a za sekvenciranje, za svaki uzorak se koriste dve reakcije, jedna za „levi“ i jedna za „desni“ prajmer („F“ i „R“ prajmer). Za razliku od MasterMiks-a za PCR, u ovom se nalaze „degenerisani“ nukleotidi (dideoksidezoksiribonukleotidi), koji nisu kompletni, jer im nedostaje -OH grupa, zbog čega za njih ne mogu da se vežu sledeći nukleotidi kada se oni ugrade u lanac DNK. Pripremaju se dva MasterMiks-a i u svaki od njih se dodaje po jedan „F“ i „R“ prajmer. Isti uzorak se dodaje u MasterMiks sa „F“ i „R“ prajmerom. Ovo su uzorci pripremljeni za sekvenciranje.



- Reakcija lančane polimeraze (PCR)

Umnožavanje specifičnih fragmenata DNK sa „F“ i „R“ prajmerima vrši se u istom PCR uređaju 2720 *Applied Biosystems (SAD)*, u toku 25 ciklusa. Parametri ove reakcije ne zavise od uzročnika koji se ispituje, već su standardizovani prema MasterMiks-u.

- Prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda

Posle umnožavanja specifičnih fragmenata DNK sa „F“ i „R“ prajmerima vrši se prečišćavanje dobijenog proizvoda. Prajmeri i degenerisani nukleotidi koji se nisu inkorporirali u proizvod za sekvenciranje, a koji mogu izazvati određene probleme tokom izvođenja elektroforeze u genetskom analizatoru, uklanjaju se prečišćavanjem primenom komercijalnih kolona *CentriSept (Princeton, SAD)*, po uputstvu proizvođača.

- Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza izvedena je u uređaju 3130 *Genetic Analyzer, 4 chanel (Applied Biosystems, SAD)*, uz korišćenje optičke mikrotitracione ploče sa uzorcima za elektroforezu, istog proizvođača. U toku rada korišćene su četiri kapilare, kao i polimer POP-7 (*Applied Biosystems, SAD*). Za izvođenje elektroforeze, u trajanju od 1 časa, uređaj je bio podešen na protokol: „*RapidSeq za POP-7 polimer i kapilare dužine od 36 cm*“. Dobijeni rezultati obrađeni su korišćenjem „SeqScape“ programa (*Applied Biosystems, SAD*).

#### 4.2.3.3.1. Tumačenje rezultata sekvenciranja

Dve dobijene nukleotidne sekvence svakog uzorka (u oba pravca) najpre se međusobno poravnavaju čime se dobija konsenzus sekvenca, koja je predmet dalje analitike.

Određivanje genotipa vršeno je korišćenjem analitičkog dela metode EURLP MI-05. Za generisanje ovog dela metode korišćene su referentne sekvence pojedinih genotipova: (G1)AB033407; (G1BC)AY686565; (G2)M84662; (G3)M84663; (G4)M84664; (G5)AB235846; (G6)AB208063; (G7)AB235847; (G8)AB235848; (G10)AF525457. U produktu sekvenciranja ispitivanog uzorka analizirani su: kodon 16 – (pozicija: 46-47-48), kodon 18 – (pozicija: 52-53-54), kodon 20 – (pozicija: 58-59-60),



kodon 84 – (pozicija: 250-251-252) i kodon 87 – (pozicija: 259-260-261), a zatim identifikovane aminokiseline koje su kodirane navedenim tripletima (Tabela 11).

**Tabela 11.** Interpretacija aminokiselinske kodifikacije tripleta

	Drugo slovo tripleta					
	T	C	A	G		
Prvo slovo trip.	T	TTT Phe(F)	TCT Ser(S)	TAT Tyr(T)	TGT Cys(C)	T
		TTC Phe(F)	TCC Ser(S)	TAC Tyr(T)	TGC Cys(C)	C
		TTA Leu(L)	TCA Ser(S)	TAA Ter(end)	TGA Trp(W)	A
		TTG Leu(L)	TCG Ser(S)	TAG Ter(end)	TGG Trp(W)	G
	C	CTT Leu(L)	CCT Pro(P)	CAT His(H)	CGT Arg(R)	T
		CTC Leu(L)	CCC Pro(P)	CAC His(H)	CGC Arg(R)	C
		CTA Leu(L)	CCA Pro(P)	CAA Gln(Q)	CGA Arg(R)	A
		CTG Leu(L)	CCG Pro(P)	CAG Gln(Q)	CGG Arg(R)	G
	A	ATT Ile(I)	ACT Thr(T)	AAT Asn(N)	AGT Ser(S)	T
		ATC Ile(I)	ACC Thr(T)	AAC Asn(N)	AGC Ser(S)	C
		ATA Ile(I)	ACA Thr(T)	AAA Asn (N)	AGA Ser(S)	A
		ATG Met(M)	ACG Thr(T)	AAG Lys(K)	AGG Ser(S)	G
	G	GTT Val(V)	GCT Ala(A)	GAT Asp(D)	GGT Gly(G)	T
		GTC Val(V)	GCC Ala(A)	GAC Asp(D)	GGC Gly(G)	C
		GTA Val(V)	GCA Ala(A)	GAA Glu(E)	GGA Gly(G)	A
		GTG Val(V)	GCG Ala(A)	GAG Glu(E)	GGG Gly(G)	G

Na osnovu kombinacije definisanih aminokiselina od strane navedenih 5 kodona, uz korišćenje Tabele 12. identifikovana je vrsta i genotip kompleksa *E. granulosus s.l.* u ispitivanom uzorku.



**Tabela 12.** Aminokiseline koje se koriste za identifikaciju vrste i genotipa metacestoda *E. granulosus s.l.*

Genotip	Vrsta	Aminokiselina				
		Kodon 16	Kodon 18	Kodon 20	Kodon 84	Kodon 87
G1	<i>E. granulosus s.s.</i>	Ala (A)	Phe (F)	Ala (A)	Ser (S)	Val (V)
G1BC	<i>E. granulosus s.s.</i>	Ala (A)	Phe (F)	Val (V)	Ser (S)	Val (V)
G2	<i>E. granulosus s.s.</i>	Ala (A)	Phe (F)	Val (V)	Ser (S)	Ala (A)
G3	<i>E. granulosus s.s.</i>	Ala (A)	Phe (F)	Ala (A)	Ser (S)	Ala (A)
G4	<i>E. equinus</i>	Ala (A)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Lys (K)
G5	<i>E. ortlepi</i>	Ala (A)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Arg (R)
G6	<i>E. canadensis</i>	Ser (S)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Ala (A)
G7	<i>E. canadensis</i>	Ser (S)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Ala (A)
G8	<i>E. canadensis</i>	Ala (A)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Gly (G)
G10	<i>E. canadensis</i>	Ser (S)	Leu (L)	Val (V)	Asn (N)	Ser (S)

U slučaju da je raspored aminokiselina u ispitujućem uzorku dao rezultat kao *E. canadensis* (G6 ili G7 genotip), dalja identifikacija genotipa je rađena upotrebom kodona 2 (na poziciji 4-5-6), poštujući referentnu sekvencu „(G1)\_AB033407\_Reference“. U tom slučaju, identifikacija je rađena kao što je navedeno u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Raspored nukleotida u kodonu 2 za razdvajanje genotipa G6 / G7 u okviru vrste *E. canadensis*

Genotip	Vrsta	Kodon 2
G6	<i>E. canadensis</i>	(CCT)
G7	<i>E. canadensis</i>	(CCC)

Takođe, dobijene nukleotidne sekvence ispitivanih uzoraka upoređene su pomoću „BLAST“ pretraživača sa registrovanim sekvencama u Banci gena (GenBank).



#### 4.2.3.4. Haplotipizacija

Nukleotidne sekvence genotipova *E. granulosus* s.s. (G1, G2 i G3) analizirane su u cilju ustanovljavanja haplotipova, upotrebom namenskih softvera (Arelquin 3.1.). U okviru identifikacije haplotipova i crtanja mreže, korišćeni su namenski softveri za statističku obradu podataka sa ciljem ustanovljavanja povezanosti niskog nivoa odstupanja (Hapview, Phylip, TCS 1.21).

### 4.3. Mesta gde su istraživanja sprovedena

Ispitivanja su realizovana u sledećim institucijama i laboratorijama:

1. Klanice (područje Raškog, Rasinskog, Moravičkog, Zlatiborskog i Niškog okruga i Grada Beograda):
  - a. Uzorkovanje organa domaćih životinja sumnjivih na hidatidozu.
2. Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“:
  - a. Uzorkovanje organa domaćih i divljih životinja sumnjivih na hidatidozu;
  - b. Morfometrijska ispitivanja;
  - c. Uzorkovanje i priprema materijala za parazitološka i molekularna ispitivanja;
  - d. Parazitološka ispitivanja;
  - e. Molekularna ispitivanja (lančana reakcija polimeraze i sekvenciranje);
  - f. Statistička i epizootološka analitika.
3. Laboratorija Katedre za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu:
  - a. Morfometrijska ispitivanja;
  - b. Parazitološka ispitivanja.
4. Referentna laboratorija za parazitske bolesti Evropske Unije, u Rimu, Italija (EURLP - European Union Reference Laboratory for Parasites - Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy):
  - a. Potvrдна molekularnih ispitivanja (lančana reakcija polimeraze i sekvenciranje);
  - b. Haplotipizacija.



#### **4.4. Statistička analiza podataka**

Podaci prikupljeni u okviru ankete koji se odnose na životinje od kojih potiču ispitivani uzorci, nakon obrade korišćeni su za definisanje epizootioloških i drugih karakteristika hidatidne infekcije ispitivanih životinja.

Statistička analiza dobijenih rezultata podrazumevala je izračunavanje deskriptivnih statističkih parametara od kojih su ovom prilikom izračunavani samo relativni brojevi strukture.

Statistička značajnost između ispitivanih genotipova/haplotipova ustanovljavana je korišćenjem Hi-kvadrat testa na nivou značajnosti 0,05 i 0,01. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički, a statistička analiza rađena je korišćenjem statističkog paketa GraphPrism 6.0 i u MS Excelu.

## 5. REZULTATI

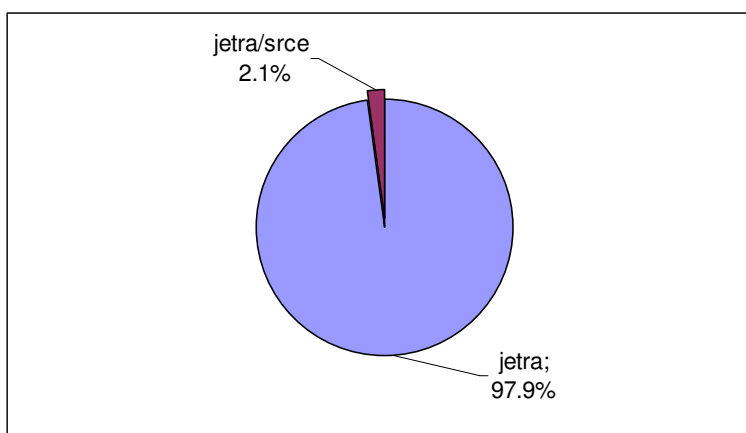
### 5.1. Rezultati patomorfoloških i morfometrijskih ispitivanja hidatidoze

#### 5.1.1. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod domaćih i divljih svinja

Od ukupno 49 domaćih svinja sa hidatidozom, kod 48 životinja hidatidne ciste su ustanovljene samo u jetri (97,9%). Samo kod 1 životinje promene su, pored jetre, ustanovljene istovremeno i u srcu (2,1%) (Tabela 14 i Slika 2).

**Tabela 14.** Distribucija hidatidnih cista u organima domaćih svinja

Lokalizacija promena	Broj	%
Ciste samo na jetri	48	97,9
Ciste na jetri i srcu (kod iste životinje)	1	2,1
<b>Ukupno životinja</b>	<b>49</b>	<b>100,0</b>



**Slika 2.** - Distribucija hidatidnih cista u organima domaćih svinja

Od svih pregledanih organa sa hidatidozom poreklom od 2 divlje svinje, ciste su kod obe životinje bile prisutne samo u jetri (100%), kao što je prikazano u Tabeli 15.

**Tabela 15.** Distribucija hidatidnih cista u organima divljih svinja

Lokalizacija promena	Broj	%
Jetra	2	100,0
<b>Ukupno životinja</b>	<b>2</b>	<b>100,0</b>

Od 50 organa domaćih svinja sa hidatidnim cistama, u 45 organa ustanovljeno je do 10 cista (90,0%), a u 5 organa više od 10 cista (10,0%). U 49 organa prečnik cista je bio manji od 5 cm (98,0%) (Slika 5 i Slika 6), u 1 organu ciste su bile prečnika od 5 do 10 cm (2,0%). Ciste veće od 10 cm nisu ustanovljene. U 49 organa ciste su bile zapremine manje od 6 ml (98,0%), a samo u 1 organu zapremine od 6 do 20 ml (2,0%). Zapremina ciste veća od 20 ml nije ustanovljena. U svim pregledanim organima ciste su po tipu pripadale primarnim i unilokularnim (Tabela 16).

**Tabela 16.** Rezultati morfometrijskih ispitivanja organa domaćih svinja sa hidatidnim cistama

Karakteristike ispitivanih cista u organima domaćih svinja		Broj pregledanih organa	%
Broj cista	Do 10 cista	45	90,0
	Više od 10 cista	5	10,0
Veličina (prečnik) cista (cm)	Manji od 5 cm	49	98,0
	Od 5 do 10 cm	1	2,0
	Veći od 10 cm	0	0
Zapremina cista (ml)	Manja od 6 ml	49	98,0
	Od 6 do 20 ml	1	2,0
	Veća od 20 ml	0	0
Tip cista po nastanku	Primarna	50	100,0
	Sekundarna	0	0
Tip cista po zastupljenosti	Unilokularne	50	100,0
	Multilokularne	0	0
<b>Ukupno organa sa hidatinim cistama</b>		<b>50</b>	

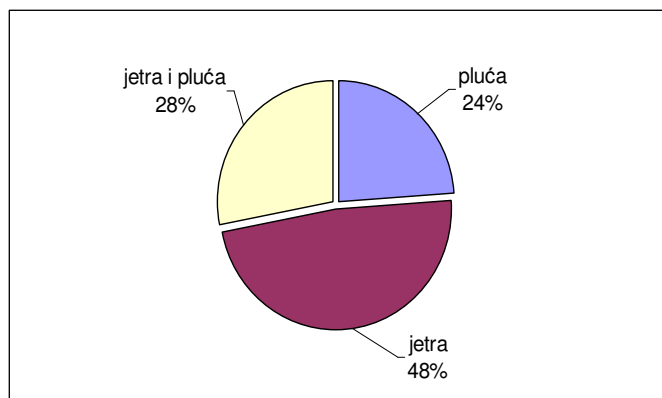
Kod obe divlje svinje ustanovljena je po 1 hidatidna cista u jetri, prečnika manjeg od 5 cm i zapremine manje od 6 ml. Obe ciste su bile primarne unilokularne.

### 5.1.2. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod goveda

Od 25 goveda sa hidatidozom, kod 12 životinja hidatidne ciste su ustanovljene samo u jetri (48,0%) (Slika 9, Slika 10). Kod 6 životinja promene su bile prisutne samo u plućima (24,0%) (Slika 7, Slika 8), a kod 7 životinja promene su ustanovljene istovremeno, u jetri i plućima (28,0%) (Tabela 17, Slika 3).

**Tabela 17.** Distribucija hidatidnih cista u organima goveda

Lokalizacija promena	Broj	%
Ciste samo na plućima	6	24,0
Ciste samo na jetri	12	48,0
Ciste na jetri i plućima (kod iste životinje)	7	28,0
<b>Ukupno životinja</b>	<b>25</b>	<b>100,0</b>



**Slika 3.** Distribucija hidatidnih cista u organima goveda

Od svih pregledanih organa sa hidatidnim cistama kod goveda, promene lokalizovane u jetri (59,4%) su dominirale u odnosu na one lokalizovane u plućima (40,6%) (Tabela 18).

**Tabela 18.** Organi goveda sa hidatidnim cistama

Uzorkovani organi	Broj	%
Pluća	13	40,6
Jetra	19	59,4
<b>Ukupno</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>

Od 32 organa goveda sa hidatidnim cistama, u 21 organu ustanovljeno je do 10 cista (65,6%), a u 11 organa više od 10 (34,4%). U 16 organa u kojima su ustanovljene, prečnik cista je bio manji od 5 cm (50,0%), u 14 organa od 5 do 10 cm (43,7%), a u 2 organa veći od 10 cm (6,2%). U 15 organa ciste su bile zapremine manje od 6 ml (46,9%), kao i u grupi od 6 do 20 ml (46,9%). Zapremina ciste veća od 20 ml ustanovljena je u samo 2 organa (6,2%). Kod svih pregledanih organa ciste su po tipu pripadale primarnim (100,0%), a kod 31 organa unilokularnim (96,9%). U jednom organu (jetra), ustanovljeno je prisustvo multilokularne ciste (3,1%) (Tabela 19).

**Tabela 19.** Rezultati morfometrijskih ispitivanja organa goveda sa hidatidnim cistama

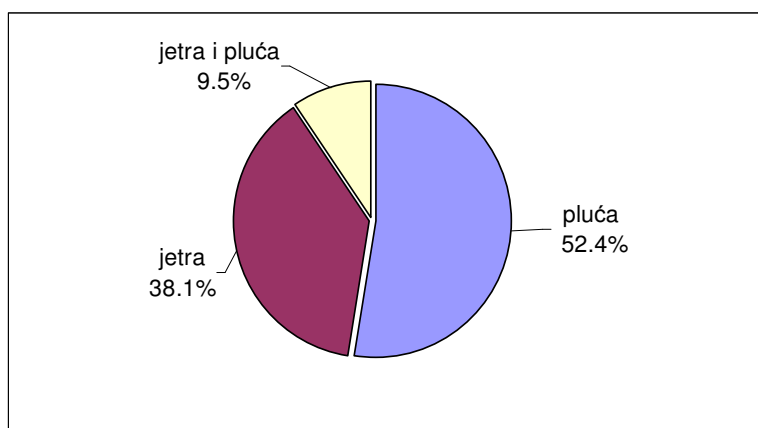
Karakteristike ispitivanih cista u organima goveda		Broj pregledanih organa	%
Broj cista	Do 10 cista	21	65,6
	Više od 10 cista	11	34,4
Veličina (prečnik) cista (cm)	Manji od 5 cm	16	50,0
	Od 5 do 10 cm	14	43,7
	Veći od 10 cm	2	6,2
Zapremina cista (ml)	Manja od 6 ml	15	46,9
	Od 6 do 20 ml	15	46,9
	Veća od 20 ml	2	6,2
Tip cista po nastanku	Primarna	32	100,0
	Sekundarna	0	0
Tip cista po zastupljenosti	Unilokularne	31	96,9
	Multilokularne	1	3,1
<b>Ukupno organa sa hidatidnim cistama</b>		<b>32</b>	

### 5.1.3. Patomorfološke i morfometrijske karakteristike hidatidoze kod ovaca

Kod 21 pregledane ovce sa hidatidozom, promene su bile lokalizovane na sledećim organima: kod 11 životinja ciste su ustanovljene samo u plućima (52,4%) (Slika 12), kod 8 životinja samo u jetri (38,1%) (Slika 11), a kod 2 životinje promene su bile prisutne, istovremeno, u jetri i plućima (9,5%) (Tabela 20, Slika 4).

**Tabela 20.** Distribucija hidatidnih cista u organima ovaca

Lokalizacija promena	Broj	%
Ciste samo na plućima	11	52,4
Ciste samo na jetri	8	38,1
Ciste na jetri i plućima (kod iste životinje)	2	9,5
<b>Ukupno životinja</b>	<b>21</b>	<b>100,0</b>



**Slika 4.** Distribucija hidatidnih cista u organima ovaca

Od svih pregledanih organa sa hidatidnim cistama kod ovaca, promene u jetri su utvrđene kod 10 ovaca (43,5%), a u plućima kod 13 ovaca (56,5%) (Tabela 21).



**Tabela 21.** Organi ovaca sa hidatidnim cistama

Uzorkovani organ	Broj	%
Pluća	13	56,5
Jetra	10	43,5
<b>Ukupno</b>	<b>23</b>	<b>100,0</b>

Od 23 organa ovaca sa hidatidnim cistama, u 18 organa ustanovljeno je do 10 cista (78,3%), a u 5 organa više od 10 cista (21,7%). U 21 organu prečnik cista je bio manji od 5 cm (91,3%), a u 2 organa od 5 do 10 cm (8,7%). Nije bilo hidatidnih cista sa prečnikom većim od 10 cm. U 21 organu ciste su bile zapremine manje od 6 ml (91,3%), a u 2 organa od 6 do 20 ml (8,7%). Zapremina ciste veća od 20 ml nije ustanovljena ni u jednom organu. U svim pregledanim organima ciste su po tipu pripadale primarnim (100,0%). U 21 organu ciste su bile unilokularne (91,3%), a u 2 organa (jetre) ustanovljeno je prisustvo multilokularnih cista (8,7%) (Tabela 22).

**Tabela 22.** Rezultati morfometrijskih ispitivanja organa ovaca sa hidatidnim cistama

Karakteristike ispitivanih cista u organima ovaca		Broj pregledanih organa	%
Broj cista	Do 10 cista	18	78,3
	Više od 10 cista	5	21,7
Veličina (prečnik) cista (cm)	Manji od 5 cm	21	91,3
	Od 5 do 10 cm	2	8,7
	Veći od 10 cm	0	0
Zapremina cista (ml)	Manja od 6 ml	21	91,3
	Od 6 do 20 ml	2	8,7
	Veća od 20 ml	0	0
Tip cista po nastanku	Primarna	23	100,0
	Sekundarna	0	0
Tip cista po zastupljenosti	Unilokularne	21	91,3
	Multilokularne	2	8,7
<b>Ukupno organa sa hidatinim cistama</b>		<b>23</b>	



**Slika 5. i 6.** *Echinococcus polymorphus* - jetra i srce svinje (Debeljak, 2014)



**Slika 7. i 8.** *Echinococcus polymorphus* - pluća govečeta (Debeljak, 2014)



**Slika 9. i 10.** *Echinococcus polymorphus* - jetra govečeta (Debeljak, 2014)



**Slika 11. i 12.** *Echinococcus polymorphus* - jetra i pluća ovce (Debeljak, 2014)

## 5.2. Rezultati parazitoloških ispitivanja hidatidoze

### 5.2.1. Opšti podaci od značaja u epizootiološkoj analitici

#### 5.2.1.1. Opšti podaci za domaće i divlje svinje

Domaće svinje kod kojih je ustanovljeno prisustvo hidatidnih cista bile su poreklom dominantno iz intenzivnog načina gajenja (91,8%). Preovladavale su životinje do tri godine starosti (93,9%). U grupi od 3 do 5 godina bile su 3 životinje (6,1%). Među ispitanim životinjama starijih od 5 godina nije bilo.

Muški pol životinja bio je zastupljen sa 79,6%, a ženski sa 20,4%.

Životinje kod kojih su ustanovljene hidatidne ciste bile su isključivo dobrog stanja uhranjenosti (100%).

Obe divlje svinje sa hidatidnim cistama na jetri bile su starosti od 3 do 5 godina, muškog pola, srednjeg stanja uhranjenosti.

U odnosu na uslove čuvanja uzoraka do dostave u laboratoriju, 47 organa sa hidatidnim cistama domaćih svinja čuvano je na temperaturi frižidera (95,9%), a samo 2 organa čuvana su u smrznutom stanju (4,1%). Do dostave u laboratoriju organi sa hidatidnim promenama poreklom od divljih svinja čuvani su na temperaturi frižidera (+4°C) (Tabela 23).

**Tabela 23.** Opšti podaci koji se odnose na domaće svinje kod kojih je ustanovljena hidatidoza

Opšte karakteristika ispitivanih životinja	Broj životinja	%	
Način gajenja	Ekstenzivno	4	8,2
	Intenzivno	45	91,8
Starost životinje	Mlađe od 3 godine	46	93,9
	Od 3 do 5 godina	3	6,1
	Starije od 5 godina	0	0
Pol životinje	Muški	39	79,6
	Ženski	10	20,2
Stanje uhranjenosti	Loše	0	0
	Srednje	0	0
	Dobro	49	100
Čuvanje cista do dostave na ispitivanje	Na +4°C	47	95,9
	Zamrznuto	2	4,1
<b>Ukupno životinja</b>	<b>49</b>		

### 5.2.1.2. Opšti podaci za goveda

Goveda kod kojih je ustanovljena hidatidoza dominantno su bila poreklom iz ekstenzivnog načina gajenja (96,0%).

Dvanaest životinja je bilo starije od 5 godina (48,0%), 11 životinja je bilo starosti od 3 do 5 godina (44,0%), a samo 2 životinje (8,0%) su bile starosti ispod 3 godine.

Ženski pol životinja bio je dominantan (92,0%), a samo 2 životinje su bile muškog pola (8,0%). Najveći broj životinja je bio srednjeg (52,0%) i dobrog (48,0%) stanja uhranjenosti.

U odnosu na temperaturne uslove čuvanja organa do dostave u laboratoriju, 16 organa sa hidatidnim cistama je čuvano na temperaturi frižidera (64,0%), a 9 organa je čuvano u smrznutom stanju (36,0%) (Tabela 24).

**Tabela 24.** Opšti podaci koji se odnose na goveda kod kojih je ustanovljena hidatidoza

Opšte karakteristika ispitivanih životinja		Broj životinja	%
Način gajenja	Ekstenzivno	24	96,0
	Intenzivno	1	4,0
Starost životinje	Mlađe od 3 godine	2	8,0
	Od 3 do 5 godina	11	44,0
	Starije od 5 godina	12	48,0
Pol životinje	Muški	2	8,0
	Ženski	23	92,0
Stanje uhranjenosti	Loše	0	0
	Srednje	13	52,0
	Dobro	12	48,0
Čuvanje cista do dostave na ispitivanje	Na +4°C	16	64,0
	Zamrznuto	9	36,0
<b>Ukupno životinja</b>		<b>25</b>	

### 5.2.1.3. Opšti podaci za ovce

Ovce kod kojih je ustanovljeno prisustvo hidatidoze isključivo su bile poreklom iz ekstenzivnog načina gajenja (100%).

Najveći broj životinja bio je u starosti od 3 do 5 godina (80,9%), samo 1 životinja mlađa od 3 godine (4,8%) i 3 životinje starije od 5 godina (14,3%). Isključivo je bio zastupljen ženski pol životinja (100%). Životinje kod kojih su ustanovljene ciste bile su dobrog (80,9%) i srednjeg (19,1%) stanja uhranjenosti.

U pogledu temperaturnih uslova čuvanja uzoraka do dostave u laboratoriju, 11 organa je čuvano na temperaturi frižidera (52,4%), a 10 organa u smrznutom stanju (47,6%) (Tabela 25).

**Tabela 25.** Opšti podaci koji se odnose na ovce kod kojih je ustanovljena hidatidoza

Opšte karakteristika ispitivanih životinja		Broj životinja	%
Način gajenja	Ekstenzivno	21	100,0
	Intenzivno	0	0
Starost životinje	Mlađe od 3 godine	1	4,8
	Od 3 do 5 godina	17	80,9
	Starije od 5 godina	3	14,3
Pol životinje	Muški	0	0
	Ženski	21	100,0
Stanje uhranjenosti	Loše	0	0
	Srednje	4	19,1
	Dobro	17	80,9
Čuvanje cista do dostave na ispitivanje	Na +4°C	11	52,4
	Zamrznuto	10	47,6
<b>Ukupno životinja</b>		<b>21</b>	

### 5.2.2. Rezultati ispitivanja fertilitnosti i vijabilnosti

U okviru parazitoloških ispitivanja za svaku uzorkovanu hidatidnu cistu izvršen je pregled na fertilitnost i vijabilnost.

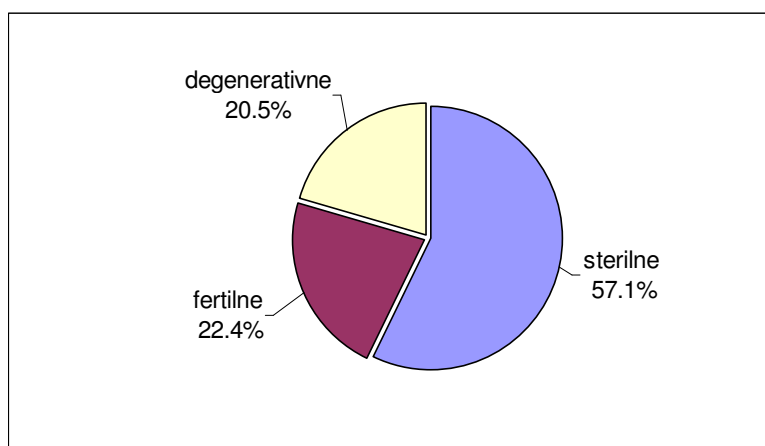
### 5.2.2.1. Fertilnost i vijabilnost kod domaćih i divljih svinja

Od 49 pregledanih domaćih svinja sa hidatidnim cistama, kod 28 životinja ustanovljeno je da su ciste bile sterilne (57,1%). Od 52 pregledane ciste (51 u jetri i 1 u srcu), 29 cista bilo je sterilno (55,8%), a 13 cista fertilno (25,0%). Od 13 fertilnih cista koje su poticale iz jetre, 12 je bilo vijabilno (92,3%) (Slika 17). Hidatidna cista poreklom iz srca bila je sterilna (Tabela 26).

**Tabela 26.** Rezultati ispitivanja hidatidnih cista domaćih svinja na fertilnost i vijabilnost

Pregledano	Broj	Sterilne		Fertilne		Vijabilne		Kalcifikovane		Degenerativne	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
Životinja	49	28	57,1	11	22,4	10	90,9	0	0	10	20,5
Hidatidna cista	52	29	55,8	13	25,0	12	92,3	0	0	10	19,2
Jetra	51	28	54,9	13	25,5	12	92,3	0	0	10	19,6
Srce	1	1	100,0	0		0		0	0	0	

Kod domaćih svinja čiji su organi sa hidatidnim promenama dostavljeni na pregled, prisustvo degenerativnih hidatidnih cista ustanovljeno je kod 10 životinja (20,5%), u 10 jetri (19,6%) (Slika 13, Tabela 26).



**Slika 13.** Fertilnost hidatidnih cista kod domaćih svinja

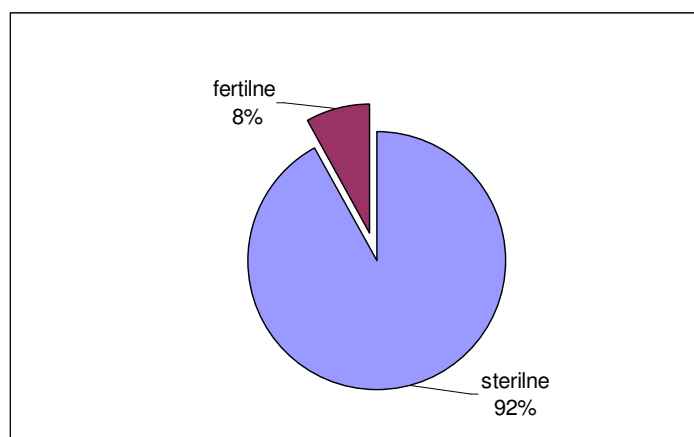
Hidatidne ciste obe divlje svinje su bile fertile, ali avijabilne.

### 5.2.2.2. Fertilnost i vijabilnost kod goveda

Od 25 pregledanih goveda sa hidatidnim cistama, kod 23 životinje ustanovljeno je da su ciste bile sterilne (92,0%), a fertile samo kod 2 životinje (8,0%). Od 32 pregledane ciste, 30 cista bilo je sterilno (93,8%), a samo 2 ciste su bile fertile (6,2%). Od 13 cista u plućima, 12 je bilo sterilno (92,3%), 1 je bila fertile (7,7%), a ona je bila i vijabilna. Od 19 hidatidnih cista u jetri, 18 je bilo sterilno (94,7%), 1 je bila fertile (5,3%), a ona je bila i vijabilna (100%). Razlika u fertilnosti i vijabilnosti u različitim organima kod istih životinja nije ustanovljena (Tabela 27, Slika 14).

**Tabela 27.** Rezultati ispitivanja hidatidnih cista goveda na fertilnost i vijabilnost

Pregledano	Broj	Sterilne		Fertilne		Vijabilne		Kalcifikovane		Degenerativne	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<b>Životinja</b>	25	23	92,0	2	8,0	2	100,0	0	0	0	0
<b>Hidatidna cista</b>	32	30	93,8	2	6,2	2	100,0	0	0	0	0
<b>Pluća</b>	13	12	92,3	1	7,7	1	100,0	0	0	0	0
<b>Jetra</b>	19	18	94,7	1	5,3	1	100,0	0	0	0	0



**Slika 14.** Fertilnost hidatidnih cista kod goveda

Kod goveda nije ustanovljeno prisustvo kalcifikovanih i degenerativnih hidatidnih cista.

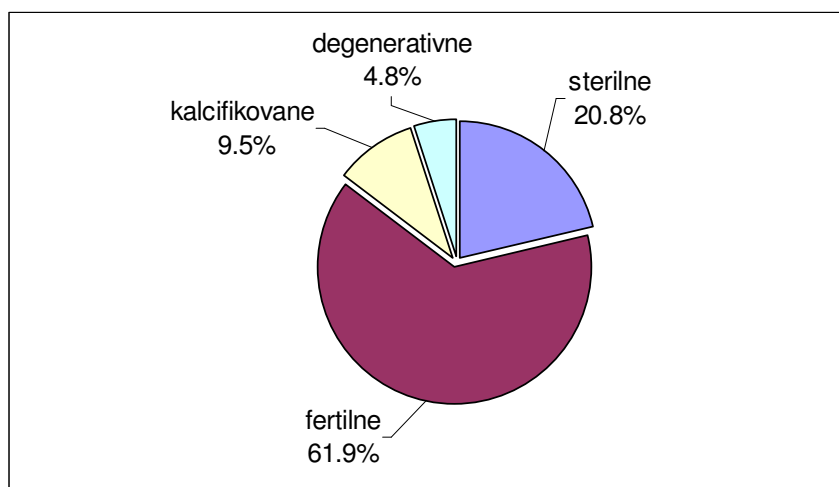
### 5.2.2.3. Fertilitnost i vijabilnost kod ovaca

Od 21 pregledane ovce sa hidatidnim cistama, kod 5 životinja ustanovljene ciste su bile sterilne (23,8%). Od 24 pregledane ciste (14 u plućima i 10 u jetri), 5 cista bilo je sterilno (20,8%). Od 21 pregledane, kod 13 životinja ciste su bile fertlne (61,9%). Od 24 pregledane ciste, 16 cista bilo je fertlno (66,7%). Od 14 cista poreklom iz pluća, 9 je bilo fertlno (64,3%), a od 10 iz jetre 7 je bilo fertlno (70,0%). Od 13 životinja sa fertlnim cistama u 8 životinja nalazile su se vijabilne ciste (61,6%) (Tabela 28, Slika 18).

**Tabela 28.** Rezultati ispitivanja hidatidnih cista ovaca na fertlnot i vijabilnost

Pregledano	Broj	Sterilne		Fertlne		Vijabilne		Kalcifikovane		Degenerativne	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<b>Životinja</b>	21	5	23,8	13	61,9	8	61,6	2	9,5	1	4,8
<b>Hidatidna cista</b>	24	5	20,8	16	66,7	9	56,3	2	8,3	1	4,2
<b>Pluća</b>	14	3	21,4	9	64,3	6	66,6	1	7,1	1	7,1
<b>Jetra</b>	10	2	20,0	7	70,0	3	42,8	1	10,0	0	0

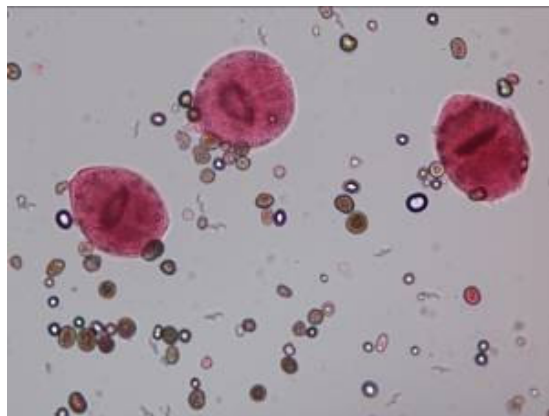
Od ukupno 16 fertlnih cista (9 iz pluća i 7 iz jetre), iz pluća je bilo 6 vijabilnih (66,6%) i iz jetre 3 vijabilne ciste (42,8%). Kod 2 životinje ustanovljeno je prisustvo kalcifikovanih (9,5%), a kod 1 životinje ustanovljene su degenerativne ciste (4,8%) (Slika 15).



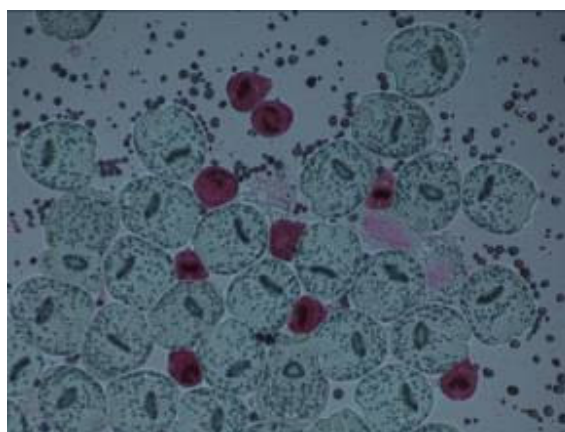
**Slika 15.** Fertlnot hidatidnih cista kod ovaca



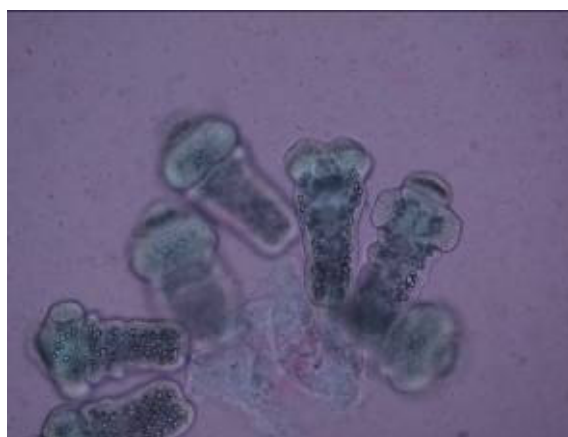
Kod 5 životinja kod kojih je ustanovljena fertilnost cista, a negativna vijabilnost (Slika 16) organi su do dostave na ispitivanje u laboratoriju čuvani u smrznutom stanju, što je imalo uticaj na rezultat ispitivanja vijabilnosti.



**Slika 16.** *Echinococcus polymorphus* - hidatidni pesak i protoskoleksi (fertilni, avijabilni)  
(Debeljak, 2014)



**Slika 17.** *Echinococcus polymorphus* - hidatidni pesak i protoskoleksi (fertilni, vijabilni)  
(Debeljak, 2014)



**Slika 18.** *Echinococcus polymorphus* - protoskoleksi (fertilni, vijabilni) (Debeljak, 2014)

### 5.3. Epizootiološka situacija hidatidoze

Patomorfološkim, morfometrijskim i parazitološkim pregledom uzorkovanog materijala hidatidoza je potvrđena kod 96 životinja, i to kod: 25 goveda, 20 ovaca 49 domaćih svinja i 2 divlje svinje.

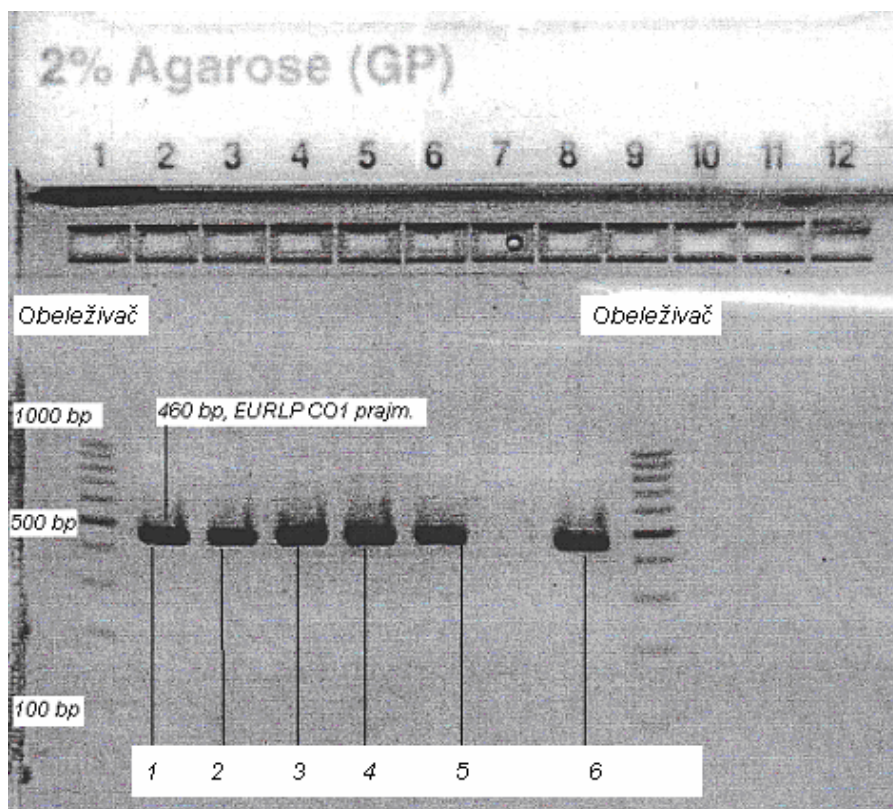
Životinje kod kojih je ustanovljena hidatidoza poreklom su iz različitih regija u Republici Srbiji, sa teritorije 20 opština: Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac, Niš, Užice, Novi Pazar, Valjevo (goveda), Niš, Svrlijig, Prijepolje i Tutin (ovce), Kikinda, Nova Crnja, Vladimirci, Šabac, Kraljevo, Sremska Mitrovica, Pančevo (domaće svinje), Kraljevo i Bajina Bašta (divlje svinje) (Tabela 29).

**Tabela 29.** Uporedni prikaz hidatidoze domaćih i divljih svinja, goveda i ovaca u Srbiji prikazana po regijama i opštinama porekla životinja

REGIJA	OPŠTINA	Goveče	Ovca	Domaća svinja	Divlja svinja
Istočna regija Srbije	1. Niš	2	2		
	2. Svrlijig		10		
Zapadna, Jugozapadna i Centralna regija Srbije	3. Bajina Bašta				1
	4. Užice	2			
	5. Prijepolje	5	7		
	6. Priboj	3			
	7. Nova Varoš	1			
	8. Čajetina	6			
	9. Tutin		1		
	10. Novi Pazar	2			
	11. Ivanjica	2			
	12. Kraljevo			4	1
	13. Aleksandrovac	1			
	14. Šabac			7	
	15. Vladimirci			6	
	16. Valjevo	1			
Severoistočna regija Srbije	17. Nova Crnja			15	
	18. Kikinda			2	
	19. Sr. Mitrovica			9	
	20. Pančevo			6	
<b>Ukupno</b>		<b>25</b>	<b>20</b>	<b>49</b>	<b>2</b>
<b>96 životinja</b>					

## 5.4. Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidoze

U okviru molekularnih ispitivanja, korišćenjem reakcije lančane polimeraze (PCR) i kapilarne elektroforeze dobijene su sekvence ispitujućih uzoraka. Za dalju analizu korišćen je deo sekvence sa istovetnim rasporedom aminokiselina na 133 kodona koji se poklapaju u prednjem i zadnjem smeru.



**Slika 19.** Rezultat vizuelizacije PCR metode elektroforezom

U kolonama 1 i 9 nalazi se molekularni marker Gene Ruler 100–1000 baznih parova (bp). U kolonama 2–6 (legenda 1–5) nalaze se ispitujući uzorci (1–2 goveda, 3–4 ovce, 5 divlja svinja), u koloni 8 (legenda 6) nalazi se pozitivna kontrola

U određivanju vrste i genotipa u materijalu iz sadržaja hidatidnih cista korišćen je analitički deo metode EURLP (MI-05).

Takođe, dobijene nukleotidne sekvence ispitivanih uzoraka upoređene su pomoću „BLAST“ pretraživača sa registrovanim sekvencama u Banci gena (GenBank), kojoj se može pristupiti preko sledeće internet adrese: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

#### 5.4.1. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod domaćih i divljih svinja

Molekularno ispitivanje kod domaćih svinja urađeno je u 19 materijala iz 19 cista koje su se nalazile u jetrama, poreklom od 17 životinja. Od 15 domaćih svinja sa hidatidnim cistama za molekularna ispitivanja uzorkovana je po 1 cista, a od 2 životinje uzorkovane su po 2 hidatidne ciste iz jetre.

*Echinococcus canadensis*, genotip G7, ustanovljen je kod svih 17 ispitanih domaćih svinja (100%), u svih 19 hidatidnih cista (100%) koje su bile poreklom iz jetre (Tabela 30).

**Tabela 30.** Zbirni rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista domaćih svinja

Životinjska vrsta	Vrsta	Genotip	Životinje		Hidatidne ciste (jetra)	
			Broj	%	Broj	%
Domaća svinja	<i>E. canadensis</i>	G7	17	100,0	19	100,0

Prikaz ustanovljenog genotipa po organima i teritoriji porekla životinja, za domaće svinje, dat je u Tabeli 31.

**Tabela 31.** Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista domaćih svinja prikazani po ispitivanim organima i opštini porekla životinja

Životinja	Opština	Organ	Vrsta	Genotip
1.	Kikinda	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
2.	N. Crnja	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
3.	Vladimirci	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
4.	Vladimirci	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
5.	Šabac	jetra (2 ciste)	<i>E. canadensis</i>	G7
6.	Šabac	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
7.	Šabac	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
8.	Kraljevo	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
9.	Kraljevo	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
10.	Kraljevo	jetra (2 ciste)	<i>E. canadensis</i>	G7
11.	Kraljevo	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
12.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
13.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
14.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
15.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
16.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
17.	S. Mitrovica	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7

Sekvenca determinisanog genotipa kod domaćih svinja prikazana je na Slici 20.

(Kodon 2)	(Kodon 16)	(Kodon 18)
TTG <b>CCC</b> GGATTTGGTGTATTAGTCATATTTGTTTGAGGATTAGT <b>TCT</b> AAT <b>TTG</b> GAT		
<b>GTT</b> TTTTGGGTTTTATGGGTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTAGGTAGTA		
GTGTTTGGGGACATCATATGTTTACTGTTGGATTAGATGTGAAGACTGCTGTTTTTT		
TTAGTTCTGTTACTATGATTATAGGTGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGTT		
GTATATGTTATTGAATTCT <b>AAT</b> GTTAAT <b>GCT</b> AGTGATCCTGTTTTGTGGTGGGTTATT		
TCTTTTATAGTTTTATTTACGTTTGGGGCGTCACTGGTATAGTTTTGTCTGCTTGTG		
<u>TGTTGGATAATGTTTTACATGATACTTGGTTTGTAGTAGCTCATTTCATTA</u>		
(kod.116)		(kodon 133)

**Slika 20.** Sekvenca *E. canadensis*, genotipa G7, iz hidatidne ciste jetre domaće svinje

Takođe, u 2 hidatidne ciste poreklom od 2 divlje svinje (iz jetre), ustanovljeno je prisustvo vrste *E. canadensis*, genotipa G7 (Tabela 32). Prikaz ustanovljenog genotipa po organima i teritoriji porekla životinja, za divlje svinje, dat je u Tabeli 33.

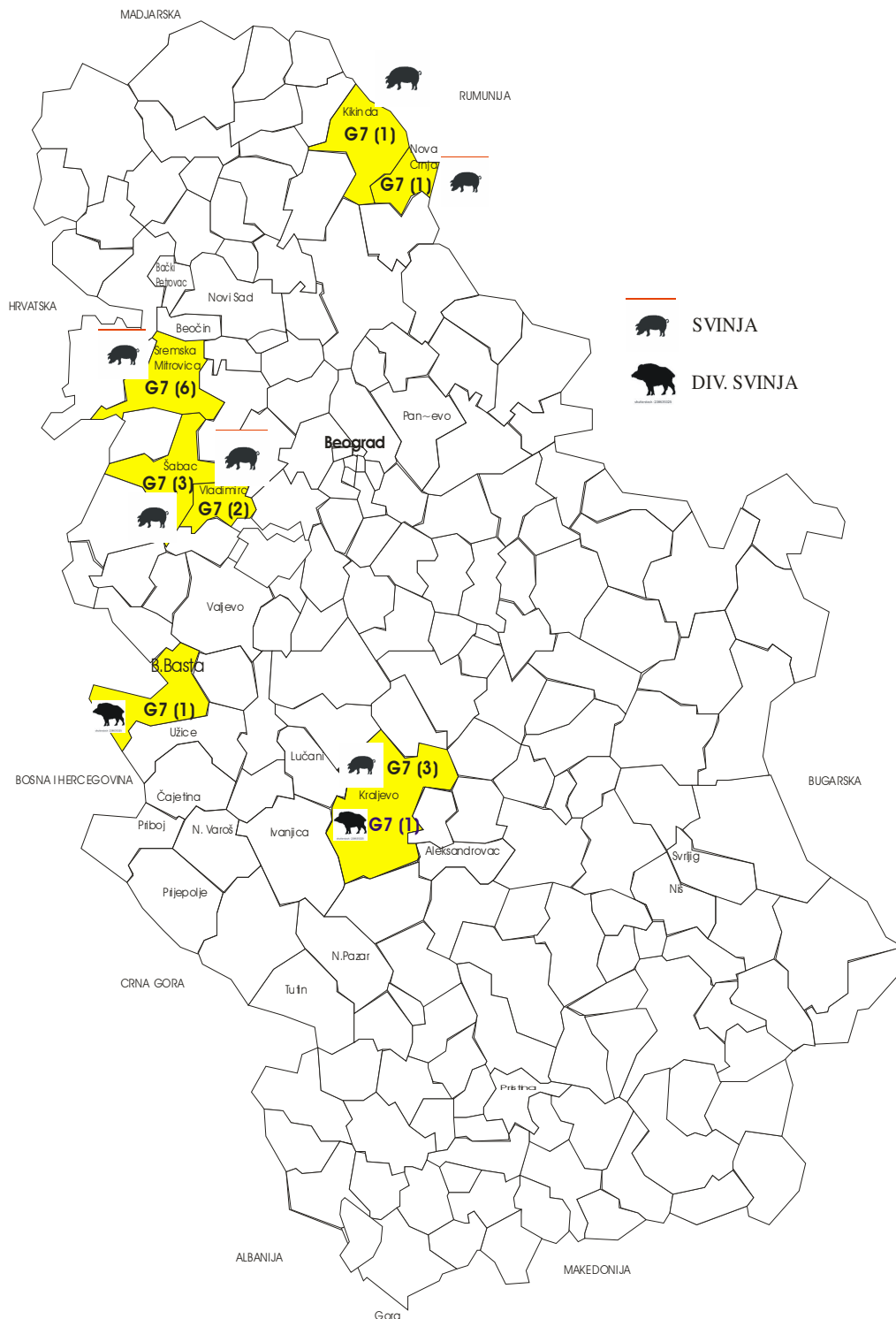
**Tabela 32.** Zbirni rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista divljih svinja

Životinjska vrsta	Vrsta	Genotip	Životinje		Hidatidne ciste (jetra)	
			Broj	%	Broj	%
Divlja svinja	<i>E. canadensis</i>	G7	2	100,0	2	100,0
	<b>Ukupno</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>100,0</b>	<b>2</b>	<b>100,0</b>

**Tabela 33.** Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista divljih svinja prikazani po ispitivanim organima i opštini porekla životinja

Životinja	Opština porekla	Organ	Vrsta	Genotip
1.	Kraljevo	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7
2.	B. Bašta	jetra	<i>E. canadensis</i>	G7

Geografska distribucija porekla domaćih i divljih svinja kod kojih je dokazan genotip G7 prikazana je na Kartogramu 4.



**Kartogram 4.** Geografska distribucija *E. canadensis*, genotipa G7, kod domaćih i divljih svinja

#### 5.4.2. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod goveda

Molekularnim ispitivanjima kod goveda obuhvaćena je 21 hidatidna cista, poreklom od 16 životinja. Pregledana je po 1 hidatidna cista poreklom od 11 životinja (iz jetre od 7 životinja, iz pluća od 4 životinje). Kod 5 goveda uzorkovane su po 2 hidatidne ciste za molekularna ispitivanja (po 1 iz jetre i 1 iz pluća) (Tabela 34).

Iz 2 hidatidne ciste poreklom od jednog govečeta (1 iz jetre i 1 iz pluća), nije dokazan DNK, tako da u materijalu poreklom od ove životinje nije urađeno molekularno ispitivanje (Tabela 34).

**Tabela 34.** Zbirni rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista goveda sa distribucijom genotipova po organima

Vrsta	Genotip	Životinja		Hidatidnih cista					
				Ukupno		Jetre		Pluća	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	9	60,0	10	52,6	6	60,0	4	40,0
<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	6	40,0	9	47,4	5	55,5	4	44,5
<b>Ukupno</b>	<b>2</b>	<b>15</b>	<b>100,0</b>	<b>19</b>	<b>100,0</b>	<b>11</b>	<b>100,0</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>
<i>Nije dokazan DNK</i>	-	1	6,2	2	9,6	1	8,3	1	11,1
<b>Svega</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>21</b>	<b>-</b>	<b>12</b>	<b>-</b>	<b>9</b>	<b>-</b>

Detaljan prikaz ustanovljenih genotipova kod goveda, sa haplotipovima, po organima iz kojih potiču uzorci, sa teritorijom porekla životinja, dat je u Tabeli 35.

**Tabela 35.** Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista goveda prikazani po ispitivanim organima i opštinama porekla životinja

Životinja	Opština porekla	Organ	Vrsta	Genotip	Haplotip
1.	Priboj	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
2.	Prijepolje	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
3.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
4.	Prijepolje	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 6
		pluća			
5.	Prijepolje	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
6.	Čajetina	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
7.	Čajetina	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
8.	Čajetina	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
		jetra			
9.	Čajetina	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
10.	Nova Varoš	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
		jetra			
11.	Ivanjica	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 1
12.	Ivanjica	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 1
13.	Aleksandrovac	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
		jetra			
14.	Niš	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
15.	Niš	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 4
16.	Priboj	pluća	Nije dokazana DNK		
		jetra			

Determinisana sekvenca *E. granulosus s.s.*, genotipa G3, kod goveda, prikazana je na Slici 21.

U materijalima iz hidatidnih cista poreklom od goveda, ustanovljeno je prisustvo vrste *E. granulosus s.s.*, i to dva genotipa: G1 i G3 (Slika 22).

*Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G1, ustanovljen je kod 9 goveda (60%), u 10 hidatidnih cista (52,6%), od toga – u 6 cista poreklom iz jetre (60,0%) i u 4 ciste poreklom iz pluća (40,0%). *Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G3, ustanovljen je



kod 6 goveda (40%), u 9 hidatidnih cista (47,4%), od toga – u 5 cista poreklom iz jetre (55,5%) i u 4 ciste poreklom iz pluća (45,5%).

(Kodon 16) (Kodon 18)

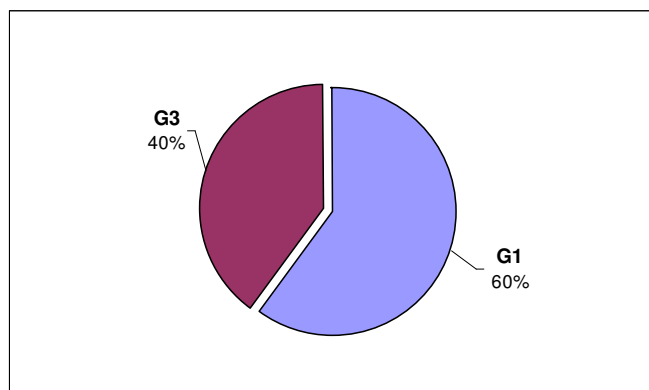
```

TTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAATTTTGAT
GCGTTTGGGTTTTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGGTAGCA
GGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTTTT
TTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGT
TATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGCTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTG
TTTCTTTTATAGTGTGTTTACGTTTGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTG
TGTGTTAGATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTTCATT

```

**Slika 21.** Sekvenca *E. granulosus s.s.*, genotip G3, iz hidatidne ciste jetre govečeta

Kod 4 od 15 životinja rađeno je molekularno ispitivanje 2 ciste, po 1 iz jetre i pluća. Kod 3 životinje je ustanovljen genotip G3, a kod 1 genotip G1 u sadržaju obe ciste (iz jetre i pluća).

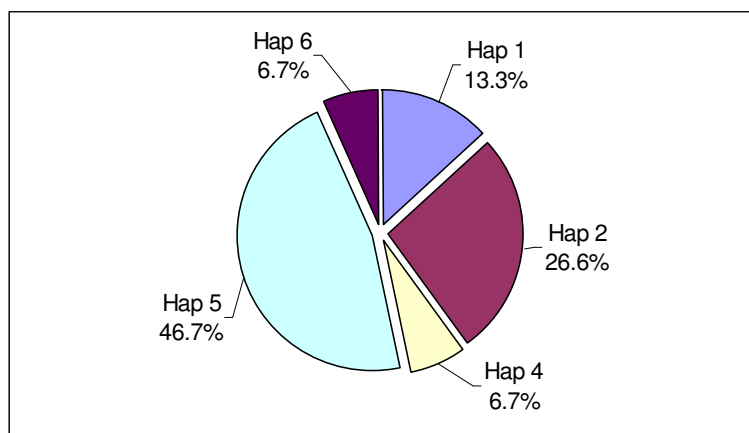


**Slika 22.** Zastupljenost pojedinih genotipova kod goveda

Statističkom analizom zastupljenosti ustanovljenih genotipova G1 i G3 kod goveda, nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,527$  ( $p>0,05$ ).

Analizom nukleotidnih sekvenci determinisanih genotipova kod goveda (G1 i G3), ustanovljeno je 5 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6). U okviru genotipa G1 determinisana su 3 haplotipa: Hap 4 kod 1 životinje (6,7%), Hap 5 kod 7 životinja (46,7%) i Hap 6 kod 1 životinje (6,7%). U okviru genotipa G3 determinisana

su 2 haplotipa: Hap 1 kod 2 životinje (13,3%) i Hap 2 kod 4 životinje (26,6%) (Slika 23).



**Slika 23.** Zastupljenost pojedinih haplotipova determinisanih genotipova (G1 i G3), kod goveda

Statističkom analizom zastupljenosti svih determinisanih haplotipova kod goveda (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6), nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,0699$  ( $p>0,05$ ).

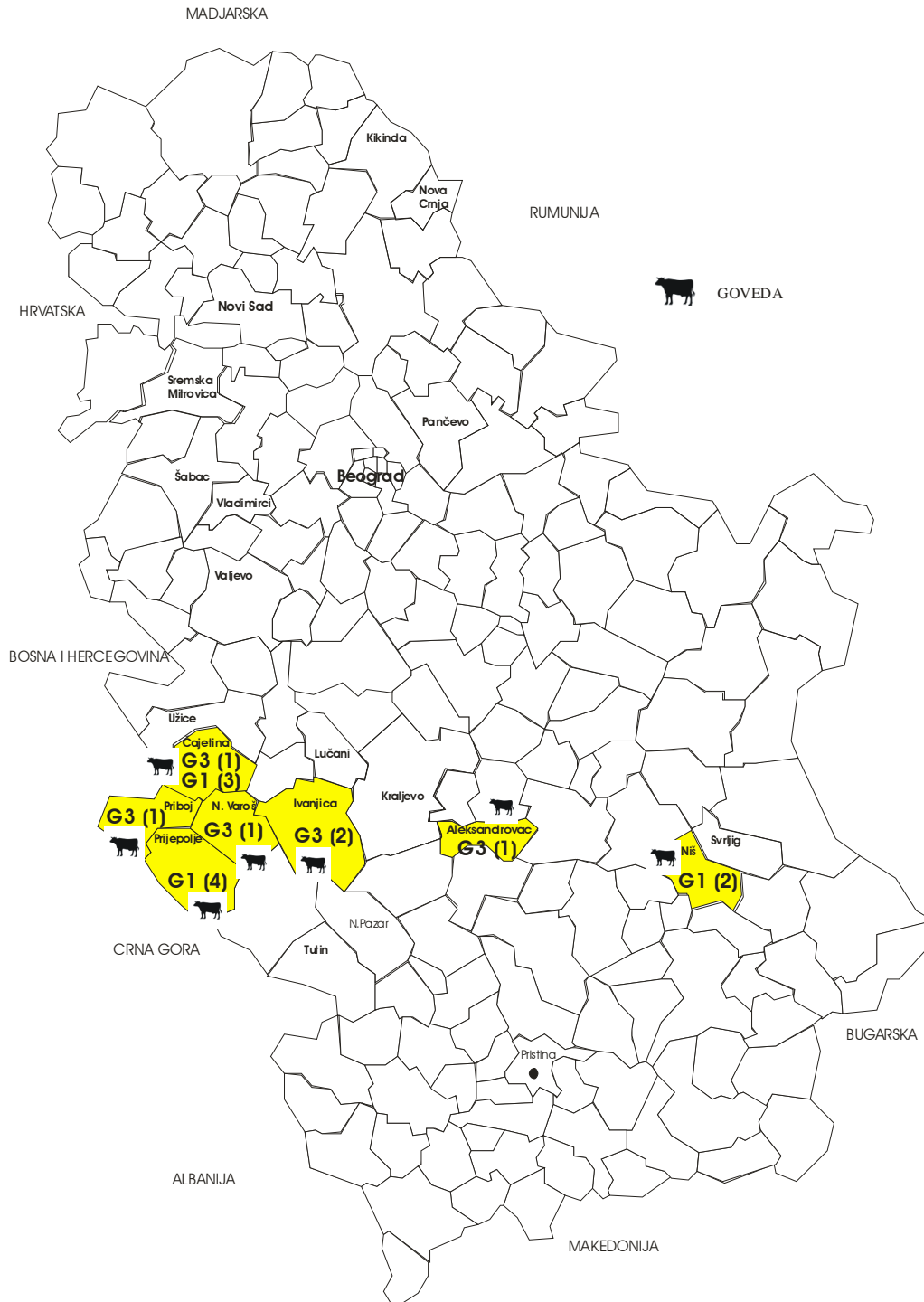
Statističkom analizom zastupljenosti haplotipova ustanovljenih u okviru genotipa G1 kod goveda (Hap 4, Hap 5 i Hap 6), ustanovljena je statistički značajna razlika u njihovoj zastupljenosti,  $P=0,0183$  ( $p<0,05$ ).

Statističkom analizom zastupljenosti determinisanih haplotipova u okviru genotipa G3 kod goveda (Hap 1 i Hap 2), nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,4141$  ( $p>0,05$ ).

**Tabela 36.** Uporedni prikaz distribucije determinisanih genotipova *E. granulosus s.s.* kod goveda po opštinama porekla životinja

Red. broj	OPŠTINA	Genotip			
		G1		G3	
		Br. životinja	%	Br. životinja	%
1.	Priboj			1	6,7
2.	Prijepolje	4	26,7		
3.	Nova Varoš			1	6,7
4.	Čajetina	3	20,0	1	6,7
5.	Ivanjica			2	13,3
6.	Aleksandrovac			1	6,7
7.	Niš	2	13,3		
<b>Ukupno</b>		<b>9</b>	<b>60,0</b>	<b>6</b>	<b>40,0</b>

Geografska distribucija ustanovljenih genotipova kod goveda, prema poreklu životinja, prikazana je u Tabeli 36 i na Kartogramu 5.



**Kartogram 5.** Geografska distribucija ustanovljenih genotipova

*E. granulosus s.s.* kod goveda

### 5.4.3. Molekularna ispitivanja hidatidoze kod ovaca

Za molekularna ispitivanja kod ovaca uzorkovane su 22 ciste, poreklom od 19 životinja. Od 16 životinja uzorkovan je sadržaj iz 1 hidatidne ciste, a kod 3 životinje uzorkovan je sadržaj iz po 2 hidatidne ciste (kod 2 životinje po 1 cista iz jetre i 1 iz pluća, a kod 1 životinje 2 ciste iz pluća).

Broj i vrsta ustanovljenih genotipova kod ovaca, sa distribucijom po životinjama i organima u kojima su dokazani, prikazani su u Tabeli 37.

**Tabela 37.** Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista ovaca sa distribucijom genotipova po organima

Vrsta	Genotip	Životinja		Hidatidnih cista					
				Ukupno		Pluća		Jetre	
		Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	6	33,3	7	33,3	5	71,4	2	28,6
<i>E. granulosus s.s.</i>	G2	4	22,4	6	28,6	1	16,7	5	83,3
<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	6	33,3	8	38,1	6	75,0	2	25,0
<i>E. granulosus s.s.</i>	G1/G2	1	5,5						
<i>E. granulosus s.s.</i>	G2/G3	1	5,5						
<b>Ukupno</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>100,0</b>	<b>21</b>	<b>100,0</b>	<b>12</b>	<b>100,0</b>	<b>9</b>	<b>100,0</b>
<i>Taenia hydatigena</i>		1	5,3	1	4,5			1	10,0
<b>Svega</b>		<b>19</b>		<b>22</b>		<b>12</b>		<b>10</b>	

Detaljan prikaz ustanovljenih genotipova kod ovaca, po: organima iz kojih potiču uzorci, teritoriji porekla životinja, sa ustanovljenim haplotipovima, dat je u Tabeli 38.

**Tabela 38.** Rezultati molekularnih ispitivanja hidatidnih cista ovaca prikazani po ispitivanim organima i opštinama porekla životinja

Životinja	Opština porekla	Organ	Vrsta	Genotip	Haplotip
1.	Niš	pluća (2 ciste)	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
2.	Niš	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 7
3.	Svrljig	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 7
4.	Svrljig	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G2	Hap 3
5.	Svrljig	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
6.	Svrljig	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
7.	Svrljig	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G2	Hap 3
8.	Svrljig	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G2	Hap 3
9.	Svrljig	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G2	Hap 3
10.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
		jetra		G2	Hap 3
11.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
		jetra		G2	Hap 3
12.	Svrljig	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
13.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
14.	Prijepolje	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
15.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
16.	Prijepolje	pluća	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
17.	Prijepolje	jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G3	Hap 2
18.	Tutin	Jetra	<i>E. granulosus s.s.</i>	G1	Hap 5
19.	Lučani	jetra	<i>Taenia hydatigena</i>		

Determinisana sekvenca *E. granulosus s.s.*, genotipa G1, kod ovaca, prikazana je na Slici 24.

(Kodon 16) (Kodon 18)

```

TTGCCTGGATTTGGTATAATTAGTCATATTTGTTTGAGTATTAGTGCTAATTTTGAT
GCGTTTGGGTTCTATGGGTTGTTGTTTGCTATGTTTTCTATAGTGTGTTTGGGTAGCA
GGGTTTGGGGTCATCATATGTTTACTGTTGGGTTGGATGTGAAGACGGCTGTTTTTT
TTAGCTCTGTTACTATGATTATAGGGGTTCCCTACTGGTATAAAGGTGTTTACTTGGT
TATATATGTTGTTGAATTCGAGTGTTAATGTTAGTGATCCGGTTTTGTGATGGGTTG
TTTCTTTTATAGTGTGTTTACGTTTGGGGGAGTTACGGGTATAGTTTTGTCTGCTTG
TGTGTTAgATAATATTTTGCATGATACTTGGTTTGTGGTGGCTCATTTTCATTATGTT
ATGTCGTT

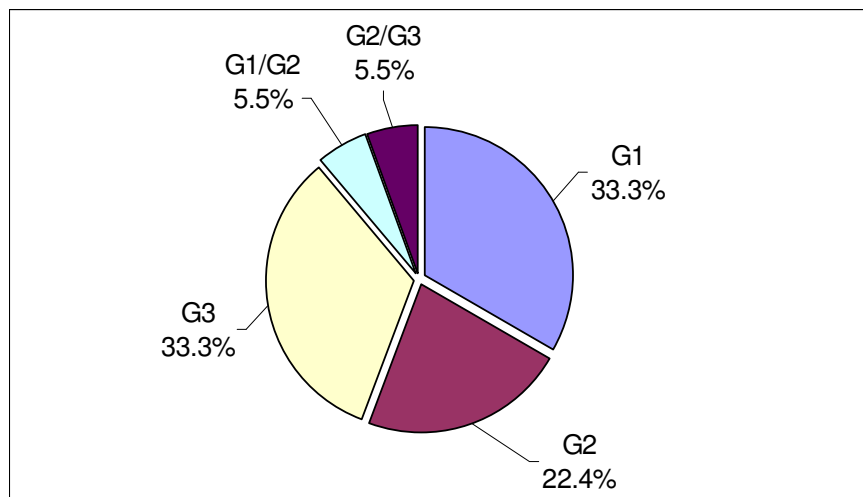
```

**Slika 24.** Sekvenca *E. granulosus s.s.*, genotipa G1, iz hidatidne ciste pluća ovce

U sadržaju 1 ciste poreklom od 1 ovce (jetra), molekularnim ispitivanjem ustanovljen je genom larvenog oblika *T. hydatigena*.

U materijalima iz hidatidnih cista poreklom od ostalih 18 ovaca, ustanovljeno je prisustvo *E. granulosus s.s.*, i to tri genotipa: G1, G2 i G3 (Slika 25). *Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G1, ustanovljen je kod 6 životinja (33,3%), u 7 hidatidnih cista (33,3%), od toga u 5 cista poreklom iz pluća (71,4%) i u 2 ciste poreklom iz jetre (28,6%). *Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G2, ustanovljen je kod 4 životinje (22,4%), u 6 hidatidnih cista (28,6%), od toga u 1 cisti poreklom iz pluća (16,7%) i u 5 cista iz jetre (83,3%). *Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G3, ustanovljen je kod 6 životinja (33,3%), u 8 hidatidnih cista (38,1%), od toga u 6 cista poreklom iz pluća (75,0%) i u 2 ciste iz jetre (25,0%). Kod 1 od ovih životinja, genotip G3 je ustanovljen u sadržaju 2 ciste, koje su bile poreklom iz pluća.

Kod 2 životinje je vršeno molekularno ispitivanje po jedne hidatidne ciste iz jetre i pluća, kada je ustanovljena mešovita infekcija (11,1%). Kod jedne životinje ustanovljeno je prisustvo genotipova G1 (pluća) i G2 (jetra), a kod druge životinje genotipova G3 (pluća) i G2 (jetra).

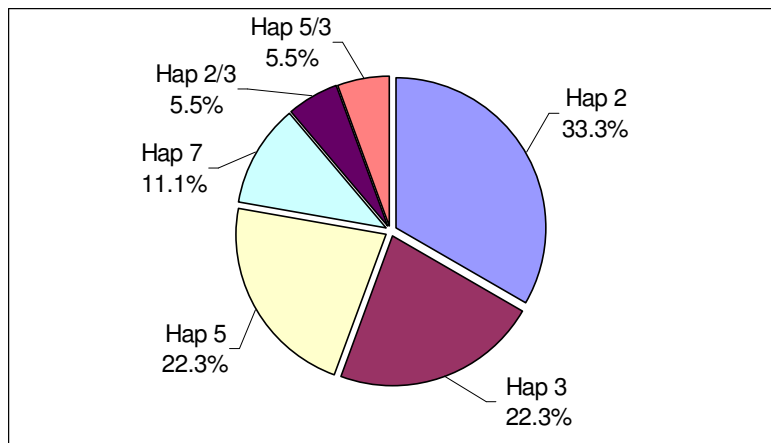


**Slika 25.** Zastupljenost pojedinih genotipova *E. granulosus s.s.* kod ovaca

Statističkom analizom zastupljenosti ustanovljenih genotipova (G1, G2 i G3) kod ovaca, nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,9608$  ( $p>0,05$ ).

Analizom nukleotidnih sekvenci determinisanih genotipova ovaca (G1, G2 i G3) ustanovljena su 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7). U okviru genotipa G1 determinisana su 2 haplotipa: Hap 5 kod 4 životinje (22,3%) i Hap 7 kod 2 životinje (11,1%). U okviru genotipa G2 determinisan je Hap 3 kod 4 životinje (22,3%), a u okviru genotipa G3 determinisan je Hap 2 kod 6 životinja (33,3%) (Slika 26).

Kod 2 životinje ustanovljena je mešovita infekcija i genotipova i haplotipova. Kod jedne životinje (5,5%) ustanovljeni su: u plućima genotip G1 (Hap 5) i u jetri G2 (Hap 3). Kod druge životinje (5,5%) ustanovljeni su: u plućima genotip G3 (Hap 2) i u jetri G2 (Hap 3).



**Slika 26.** Zastupljenost pojedinih haplotipova determinisanih genotipova (G1, G2 i G3), kod ovaca

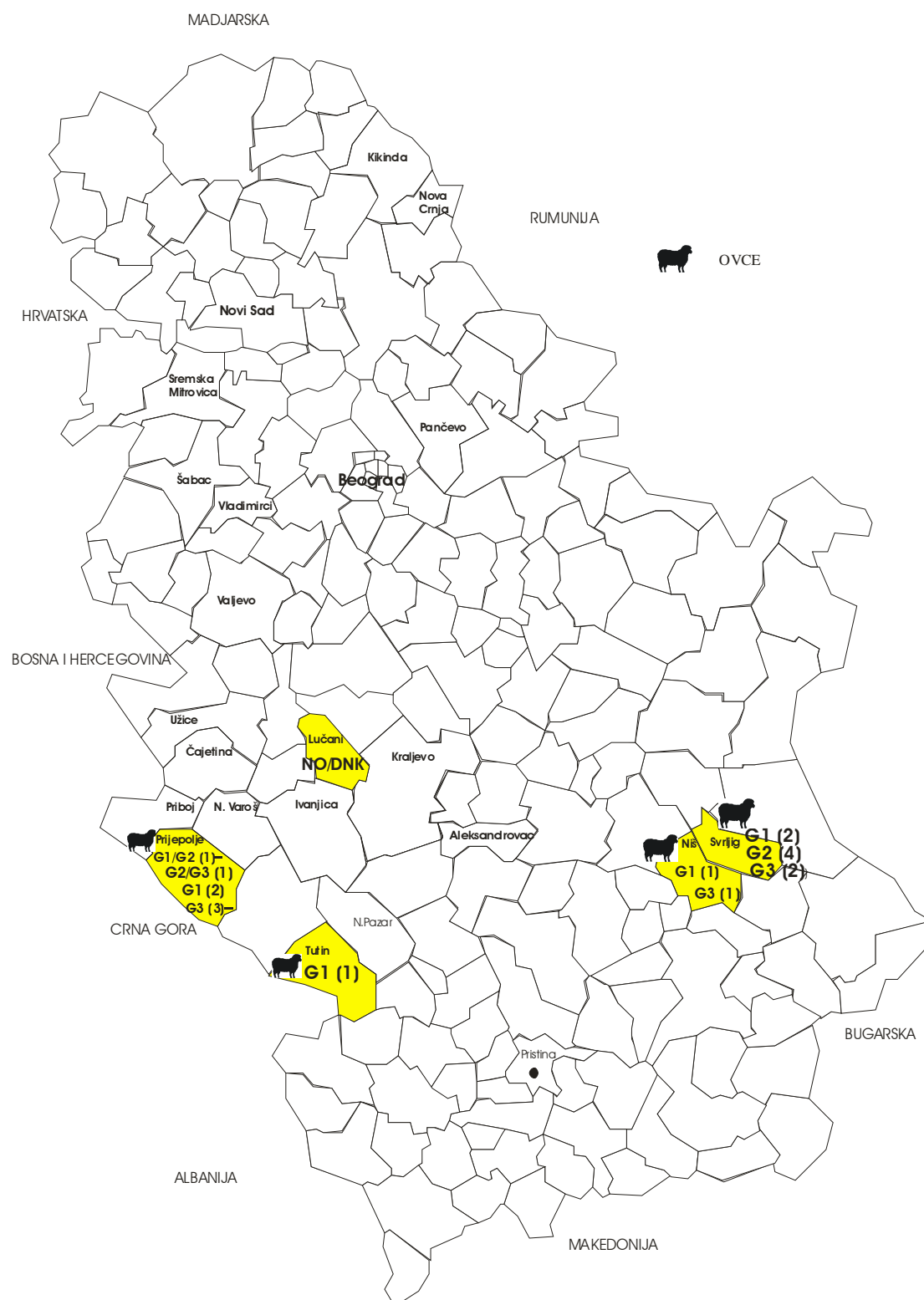
Statističkom analizom zastupljenosti ustanovljena 4 haplotipa kod ovaca (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7), nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,4235$  ( $p>0,05$ ).

Geografska distribucija ustanovljenih genotipova ovaca, na osnovu porekla ovaca, prikazana je u Tabeli 39. i na Kartogramu 6.

**Tabela 39.** Uporedni prikaz distribucije determinisanih genotipova *E. granulosus s.s.* kod ovaca po opštinama porekla životinja

R. br.	OPŠTINA	Genotip									
		G1		G2		G3		G1/G2		G2/G3	
		Broj život.	%	Broj život.	%	Broj život.	%	Broj život.	%	Broj život.	%
1.	Prijepolje	2	11,1			3	16,7	1	5,5	1	5,5
2.	Tutin	1	5,5								
3.	Svrljig	2	11,1	4	22,2	2	11,1				
4.	Niš	1	5,5			1	5,5				
<b>Ukupno</b>		<b>6</b>	<b>33,3</b>	<b>4</b>	<b>22,2</b>	<b>6</b>	<b>33,3</b>	<b>1</b>	<b>5,5</b>	<b>1</b>	<b>5,5</b>



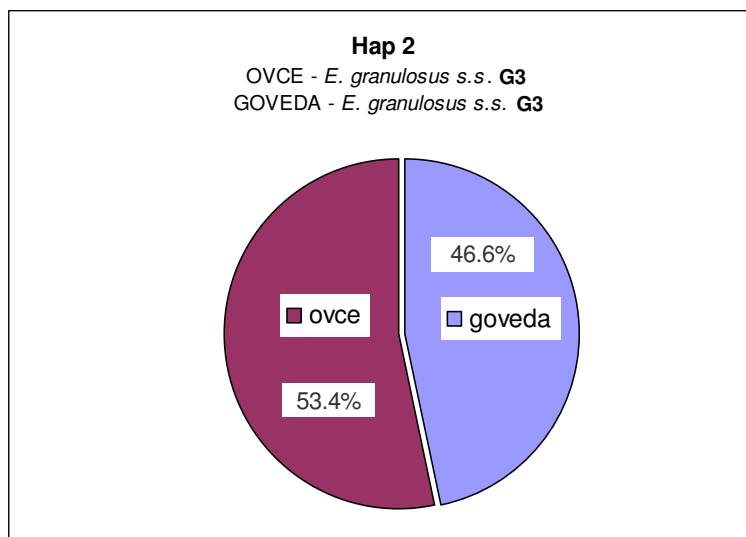


**Kartogram 6.** Geografska distribucija ustanovljenih genotipova *E. granulosus* s.s. kod ovaca

#### 5.4.4. Zajednički haplotipovi kod goveda i ovaca

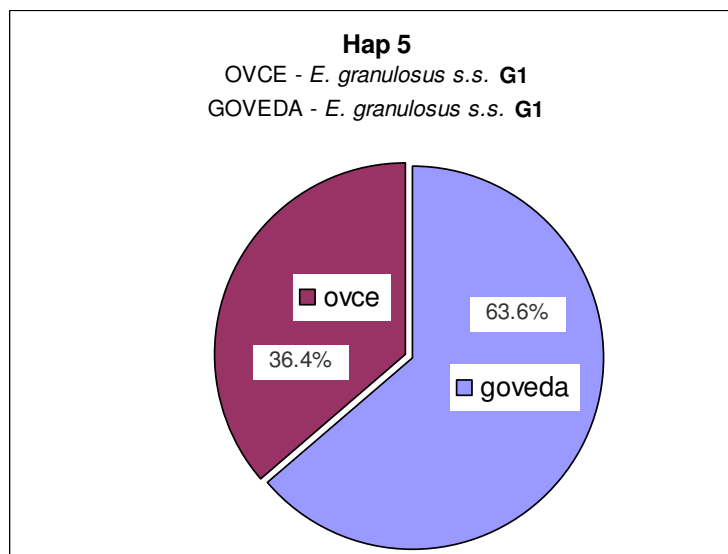
Kod goveda i ovaca ustanovljeno je prisustvo dva ista haplotipa: (Hap 2 i Hap 5).

U okviru genotipa G3, (Hap 2) je ustanovljen kod 10 životinja, i to kod: 4 govečeta (46,6%) i 6 ovaca (53,4%) (Slika 27).



**Slika 27.** Zastupljenost Hap 2 kod goveda i ovaca

U okviru genotipa G1, (Hap 5) je ustanovljen kod 11 životinja, i to kod: 7 goveda (63,6%) i 4 ovce (36,4%) (Slika 28).

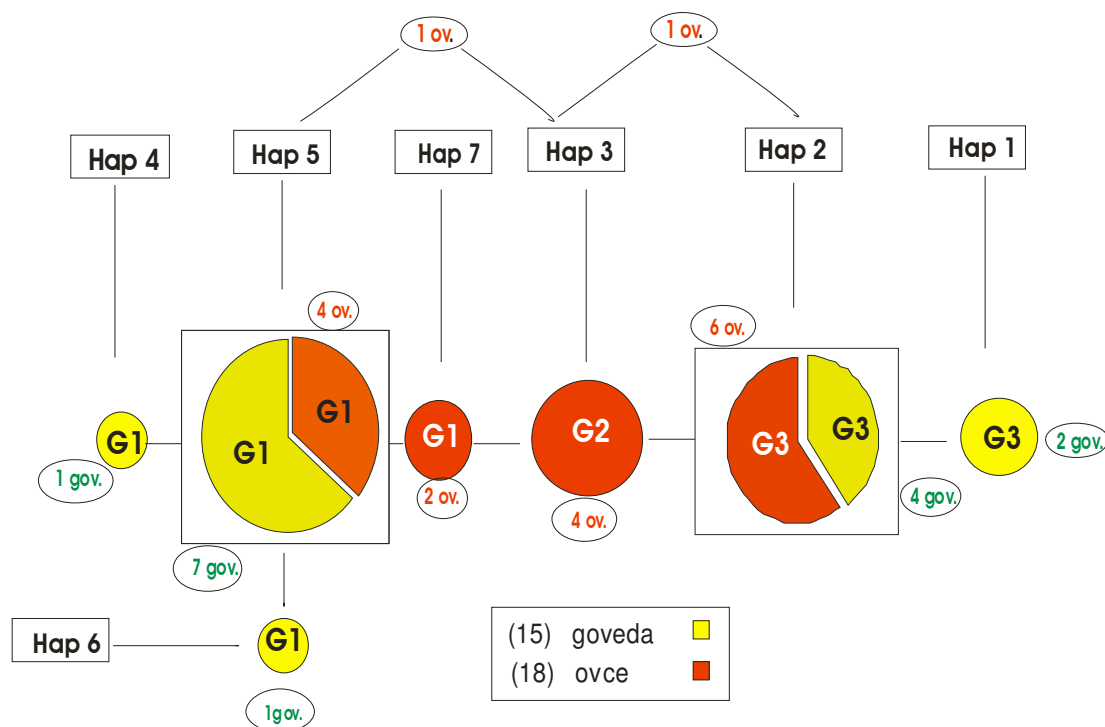


**Slika 28.** Zastupljenost Hap 5 kod goveda i ovaca

#### 5.4.5. Mreža ustanovljenih haplotipova kod goveda i ovaca

S obzirom na to da su kod goveda i ovaca ustanovljeni genotipovi koji pripadaju *E. granulosus s.s.* (G1, G2 i G3), u ovim uzorcima je rađena i analiza haplotipova.

Mreža determinisanih genotipova i haplotipova, generisana je upotrebom citohrom C-oksidadze subjedinice 1 (cox1) mitohondrijalne nukleotidne sekvence *E. granulosus s.s.* (Slika 29).



**Slika 29.** Mreža determinisanih genotipova i haplotipova kod goveda i ovaca

Kod goveda i ovaca, u okviru *E. granulosus s.s.* ustanovljeno je prisustvo tri genotipa (G1, G2 i G3) i 7 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap3, Hap 4, Hap 5, Hap 6 i Hap 7).

Kod goveda je ustanovljeno prisustvo 2 genotipa (G1 i G3) (66,6%) i 5 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6).

Kod ovaca je ustanovljeno prisustvo 3 genotipa (G1, G2 i G3) i 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7).

Kod goveda dva ustanovljena genotipa pokazuju veću genetsku raznovrsnost u okviru 5 haplotipova (71,4%) nego kod ovaca, kod kojih se u okviru tri determinisana genotipa izražava genetska raznovrsnost u okviru 4 haplotipa (57,1%).

Kod goveda i ovaca ustanovljeno je prisustvo dva zajednička haplotipa: Hap 2 i Hap 5 (28,6%). Haplotip 2 (u okviru genotipa G3) je determinisan kod 4 govečeta i 6 ovaca. Haplotip 5 (u okviru genotipa G1) je ustanovljen kod 7 goveda i 4 ovce.

Kod 2 ovce ustanovljena je mešovita infekcija, kako na nivou genotipa, tako i na nivou haplotipa. Kod obe životinje sa mešovitom infekcijom u jetri je dokazano prisustvo genotipa G2 (Hap 3), dok je u plućima kod jedne životinje dokazano prisustvo genotipa G1 (Hap5), a kod druge genotip G3 (Hap2).

## 6. DISKUSIJA

Istraživanja realizovana u okviru disertacije imala su za cilj određivanje patomorfoloških, morfometrijskih, parazitoloških i epizootioloških karakteristika hidatidoze, i utvrđivanje prisutnih genotipova i haplotipova u ispitivanoj grupaciji životinja poreklom sa različitih epizootioloških područja Republike Srbije. S obzirom na različite biološke i epizootiološke karakteristike pojedinih genotipova i haplotipova *E. granulosus s.l.*, njihova identifikacija i definisanje prevalencije od izuzetnog su značaja za razumevanje biološkog ciklusa parazita, kao i mera kontrole (Parsa i sar., 2010).

**Domaće i divlje svinje.** U okviru sprovedenih ispitivanja, od organa domaćih svinja koji su sa hidatidnim promenama dostavljeni na pregled, dominirala je jetra u kojoj su hidatidne promene ustanovljene u 97,9% slučajeva.

Ispitivanja drugih autora o distribuciji hidatidnih promena na pojedinim organima razlikuju se od dobijenih rezultata, u sledećim okvirima: u plućima 31,41–35,40%, u jetri 46,83–48,40% i istovremeno u plućima i jetri 15,22–15,71% (Simonović, 1974).

S obzirom na činjenicu da 91,8% svinja potiče iz intenzivnog uzgoja i da je 93,9% životinja bilo mlađe od 3 godine, razumljivo je da u promenjenim organima preovlađuju ciste prečnika manjeg od 5 cm. U skladu sa načinom gajenja svinja, stanje uhranjenosti je ocenjeno kao dobro (100,0%), a muški pol je bio zastupljeniji (79,6%). Manji broj životinja poticao je iz ekstenzivnih uslova gajenja (8,2%), starosti od 3 do 5 godina (6,1%) i kod njih je ustanovljeno pojedinačno prisustvo cista prečnika većeg od 5 cm. Veličinu cista pratila je i odgovarajuća zapremina hidatidne tečnosti, pri čemu su dominirale ciste zapremine do 6 ml (98,0%).

Takođe, kod dve pregledane divlje svinje u jetri je ustanovljena po jedna hidatidna cista, prečnika manjeg od 5 cm i zapremine manje od 6 ml. Veličina cista je odgovarala starosti životinja, koje su bile mlađe od 3 godine. I pored toga što se radi o



malom broju divljih svinja, navedeni nalazi imaju izuzetan značaj s obzirom na činjenicu da se do uzoraka iz grupacije divljih životinja teško dolazi.

Uvidom u podatke o poreklu domaćih svinja zaključuje se da je u pitanju intenzivno gajenje, u mini farmama na poljoprivrednim gazdinstvima. U ovom načinu gajenja nema zatvorenog ciklusa proizvodnje, već se prasad za intenzivni tov otkupljuju iz većeg broja gazdinstava, sa većeg broja mini farmi priplodnih krmača koje proizvode prasad za tov. U obe faze gajenja dominiraju objekti sa srednjim nivoom biosigurnosnih mera, a česti su i oni sa niskim. Objekti ovog tipa sa visokim nivoom biosigurnosnih mera su znatno ređi.

Prema rezultatima istraživanja u Republici Srbiji dominantni stalni domaćin pantljičare *E. granulosus* je pas, a prevalencija infekcije je različita u različitim krajevima (Dimitrijević, 1996). Procenat inficiranih vlasničkih pasa, u koje spadaju i lovački psi, kreće se od 15% u Valjevu, Nišu i Zrenjaninu (Marković, 1978; Antanasijević, 1993; Paunović i sar., 1994), do 48% kod pasa u Požarevcu (Tešić, 1997) i 46,82% na teritoriji Zaječarskog područja (Simonović, 1974). Na području Istočne Srbije prevalencija infekcije kod pasa je različita, ali visoka: Boljevac 44,4%, Bor 70%, Zaječar 45%, Kladovo 55,55%, Knjaževac 13,33%, Majdanpek 46,66%, Negotin 45%. Na ovom području, kao i na drugim terenima u Srbiji gde je kontakt lokalnog stanovništva sa psima prisniji, a nivo prosvete slabiji, ova parazitoza predstavlja veliki epizootiološko-epidemiološki problem (Simonović, 1974).

S obzirom na činjenicu da lovački psi predstavljaju deo vlasničkih pasa, ovi podaci se odnose i na njih. Infekcija prelaznih domaćina je moguća na svim mestima gde psi defeciraju. Međutim, ona se najčešće obavlja u dvorištu, na paši, u prirodi, jer se tamo feces inficiranih pasa razmekšava i raspada pod dejstvom atmosferskih uticaja, a jaja parazita se raznose po većoj površini i postaju dostupna prelaznim domaćinima (Šibalić i Cvetković, 1996; Dimitrijević i Ilić, 2011). Svinje se lako inficiraju jajima parazita iz fecesa pasa, s obzirom na sklonost ka koprofagiji. Sa druge strane, domaće svinje inficirane metacestodama *E. granulosus* značajan su izvor za infekciju pasa kao stalnih domaćina, s obzirom na uobičajenu praksu klanja svinja u domaćinstvima, van kontrole veterinarske službe. Nažalost, veoma nizak nivo znanja stočara o načinima širenja oboljenja uslovljava neadekvatno postupanje sa organima u kojima se nalaze hidatidne ciste („žednjaci“). Po verovanju neprosvećenih stočara oni nastaju kod životinja koje



dugotrajno nisu imale dovoljno vode, a dobro ih je dati psima, jer mogu da ih zaštite od besnila. Imajući u vidu nizak nivo znanja stočara o ovoj parazitozi i putevima njenog širenja, kontrola na ovom nivou skoro da ne postoji (Kulišić i sar., 1999).

O raširenosti hidatidoze, što je posledica nedovoljne prosvetljenosti uzgajivača svinja i o nepostojanju adekvatnih načina za neškodljivo uklanjanje leševa uginulih životinja, kao i klaničnih konfiskata u Srbiji, govore i drugi autori (Novakov i sar., 2012).

Inficiranje divljih svinja u prirodi, gde im je dostupan feces lovačkih pasa, veoma je moguće. Takođe, posle odstrela divljih svinja i evisceracije koja se radi u prirodi, eviscerirani organi ostaju dostupni lovačkim psima, što zatvara potencijalni krug inficiranja i preklapanja silvatičnog i ciklusa bolesti između domaćih životinja.

Naravno, epizootiološki značaj drugih stalnih domaćina, posebno kada su divlje svinje u pitanju se ne isključuje, ali o njihovom učešću ima malo egzaktnih rezultata ispitivanja. Na osnovu ispitivanja vukova u Italiji ustanovljena je prevalencija 15% (Guberti i sar., 2014), a ispitivanja sprovedena kod lisica govore u prilog njihovog značaja u epizootiologiji bolesti (Camel, 1959). I drugi autori govore o značaju divljih životinja kao izvora bolesti, pre svega u silvatičnom ciklusu (McManus i sar., 2003).

**Goveda.** Distribucija hidatidnih promena kod goveda značajno se razlikuje od distribucije kod svinja. Kod 48,0% pregledanih životinja promene su bile lokalizovane u jetri, kod 25,0% u plućima i kod 28,0% životinja istovremeno u jetri i plućima. Posmatrano po organima, hidatidne promena kod goveda su bile zastupljenije u jetri (59,4%) nego u plućima (40,6%).

Rezultati obavljenih ispitivanja se delimično poklapaju sa ispitivanjima drugih autora, čiji je cilj bio utvrđivanje distribucije hidatidnih promena u različitim organima: u jetri 16,11–20,15%, u plućima 53,23–57,12% i istovremeno u plućima i jetri 25,48–25,56% (Simonović, 1974).

Kod 65,6% životinja utvrđeno je 10 cista, a kod 34,4% više od 10 cista. Dijagnostikovane su ciste manjeg prečnika od 5cm (50,0%), sa zapreminom ispod 6 ml (46,9% ) i one prečnika od 5–10cm (43,7%), sa zapreminom od 6–12ml (46,9%). S obzirom na činjenicu da je 96,0% goveda bilo poreklom iz ekstenzivnog uzgoja i da je 92,0% životinja bilo starije od 3 godine, razumljive su morfometrijske karakteristike promena. Navedene morfometrijske karakteritike hidatidnih cista kod goveda u skladu

su sa starošću ispitivanih životinja, odnosno starošću hidatidnih cista, kao što potvrđuju i literaturni podaci (Jakšić i Sofrenović, 1979).

Ekstenzivni način gajenja podrazumeva brojne mogućnosti inficiranja u različitoj starosti životinja. S obzirom na ujednačenost morfometrijskih karakteristika cista u organima kod pojedinih životinja, mogućnost superinfekcije u ovim ispitivanjima bila je manje zastupljena.

Način gajenja goveda na teritoriji navedenih opština u jugozapadnoj Srbiji obavlja se kombinacijom štalskog i pašnog, sa značajnim udelom pašne ishrane u toku većeg dela godine. Imajući u vidu značaj vlasničkih pasa i pasa lotalica u epizootologiji hidatidoze, kao i način gajenja goveda, mogućnosti inficiranja goveda su velike. Sa druge strane, goveda inficirana metacestodama *E. granulosus*, ne bi trebalo da budu značajan izvor za infekciju pasa kao stalnih domaćina, s obzirom na to da se klanje goveda obavlja u objektima pod kontrolom veterinarske službe. Teorijski, postoje mogućnosti da organi zaklanih goveda sa hidatidnim cistama budu dostupni psima, ali praktično nemaju veći značaj.

**Ovce.** Rezultati sprovedenih ispitivanja ukazuju da je distribucija hidatidnih promena kod ovaca: u plućima kod 52,4% životinja, u jetri kod 38,1%, a istovremena lokalizacija u plućima i jetri, kod 9,5% ovaca. Posmatrano po organima, hidatidne promene kod ovaca su bile zastupljenije u plućima (56,5%) nego u jetri (43,5%).

Rezultati ispitivanja o distribuciji hidatidnih promena u različitim organima uglavnom se poklapaju sa rezultatima ispitivanja drugih autora, koji su dijagnostikovali: u plućima 51,90–55,13%, u jetri 22,31–22,94% i istovremeno u plućima i jetri 22,28–24,52% (Simonović, 1974). Lokalizacija hidatidnih cista u jetri ovaca poreklom sa Pešterske visoravni bila je zastupljena sa 30,5% (Pavličević, 1974).

S obzirom na iznete opšte i epizootiološke podatke koji se odnose na pregledane ovce, morfometrijske karakteristike promena su očekivane. Do 10 cista ustanovljeno je kod 78,3%, a zastupljenost životinja sa više od 10 cista bila je 21,7%. Kod 91,3% životinja prečnik cista je bio do 5 cm, a zapremina cista manja od 6 ml. Kod 8,7% životinja prečnik cista je bio od 5 do 10 cm, a zapremina cista od 6 do 12 ml.

Navedene morfometrijske karakteristike hidatidnih cista kod ovaca u skladu su sa starošću ispitivanih životinja i hidatidnih cista, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Jakšić i Sofrenović, 1979).





Na osnovu uvida u iznete opšte i anamnestičke podatke, kao i činjenice da se radi o životinjama dobrog (80,9%) i srednjeg (19,1%) stanja uhranjenosti, može se zaključiti da se u najvećem broju slučajeva ovaca sa hidatidozom, radi o ženskim životinjama koje su upućene na klanje, ili u okviru planiranog remonta stada, ili zbog problema u reprodukciji (sterilitet) iz različitih razloga.

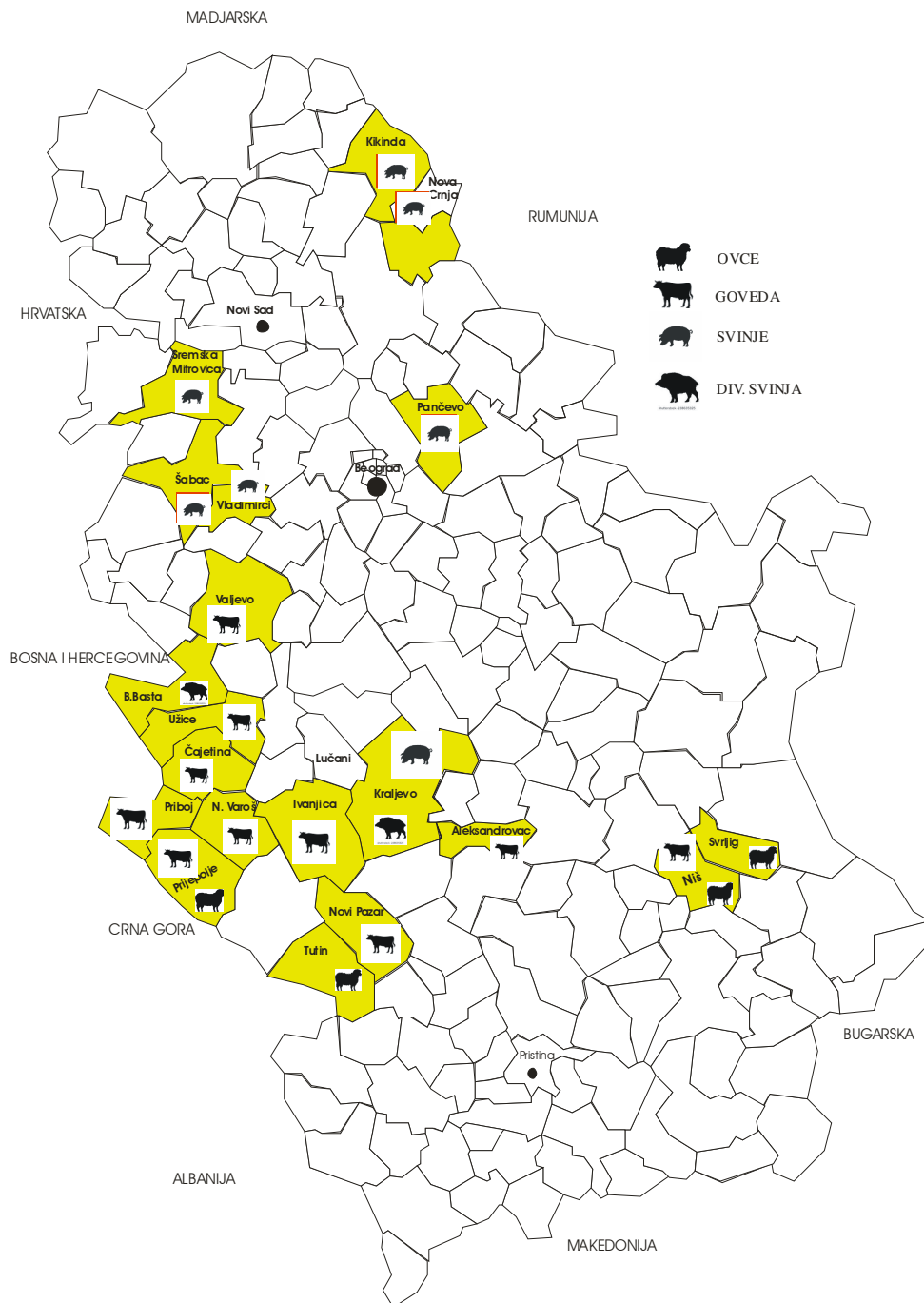
Sve pregledane ovce iz istraživanja su poreklom iz ekstenzivnog načina gajenja, što znači da potiču iz malih i srednjih vlasničkih zapata koji se gaje na tradicionalan način, u okviru koga se primenjuju skromne zoohigijenske i preventivne veterinarske mere i dominantno pašno gajenje. Prevladavala je starost životinja od 3 do 5 godina (80,9%) i isključivo životinje ženskog pola (100,0%).

Tradicionalni pašni način gajenja ovaca u ovim regijama, koji je inače i dominantan u gajenju ovaca širom Srbije, omogućava lako inficiranje ovaca, preko direktnog ili indirektnog kontakta sa psima. Ovo je posebno razumljivo ako se ima u vidu kohabitacija ovaca i pasa, koji mogu, ali i ne moraju, biti ovčarski psi. Na inficiranim pašnjacima ovce se lako inficiraju jajima parazita iz fecesa pasa. Sa druge strane, ovce inficirane metacestodama *E. granulosus* značajan su izvor za infekciju pasa kao stalnih domaćina, s obzirom na uobičajenu praksu klanja ovaca u domaćinstvima, van kontrole veterinarske službe. Slično kao i u epizootiologiji bolesti kod svinja, veoma nizak nivo znanja stočara o epizootiologiji oboljenja uslovljava neadekvatno postupanje sa organima u kojima se nalaze hidatidne ciste („žednjaci“).

Imajući u vidu nizak nivo znanja stočara o ovoj parazitozi i putevima njenog širenja, njena kontrola ni kod ovaca na ovom nivou skoro da ne postoji (Kulišić i sar., 1999; Masala i Parodi, 2004).

**Epizootiološka situacija hidatidoze.** Patomorfološkim, morfometrijskim i parazitološkim pregledom uzorkovanog materijala, hidatidoza je ustanovljena kod 96 životinja, i to kod: 49 domaćih svinja, 2 divlje svinje, 25 goveda i 20 ovaca (Tabela 29).

Životinje kod kojih je ustanovljena hidatidoza poreklom su iz različitih epizootioloških područja u Republici Srbiji sa teritorije 20 opština: Kikinda, Nova Crnja, Vladimirci, Šabac, Kraljevo, Sremska Mitrovica, Pančevo (domaće svinje), Kraljevo i Bajina Bašta (divlje svinje), Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac, Niš, Užice, Novi Pazar, Valjevo (goveda), Niš, Svrljig, Prijepolje i Tutin (ovce) (Kartogram 7).



**Kartogram 7.** Uporedni prikaz geografske distribucije hidatidoze kod domaćih i divljih svinja, goveda i ovaca

Uvidom u rezultate pregleda, kao i u geografsku distribuciju porekla životinja kod kojih je ustanovljena hidatidoza, primećuje se široka rasprostranjenost ove cestodoze na teritoriji Republike Srbije.

Kod domaćih svinja oboljenje je rasprostranjeno na teritoriji 7 opština u Srbiji: Nova Crnja, Kikinda, Sremska Mitrovica, Pančevo, Šabac, Vladimirci i Kraljevo. Navedene opštine pripadaju regijama Republike Srbije u kojima je svinjarstvo veoma zastupljeno kao grana stočarske proizvodnje.

Kod divljih svinja oboljenje je ustanovljeno na teritoriji dve opštine: Bajina Bašta i Kraljevo, na čijoj teritoriji je potvrđeno i kod domaćih svinja.

Kod goveda hidatidoza je ustanovljena na teritoriji 10 opština: Niš, Užice, Prijepolje, Priboj, Nova Varoš, Čajetina, Novi Pazar, Ivanjica, Aleksandrovac i Valjevo. Navedene opštine pripadaju jugozapadnoj, centralnoj i istočnoj regiji Republike Srbije, u kojima je govedarstvo različito zastupljeno kao grana stočarske proizvodnje. Osam opština zapadne i jugozapadne Srbije (Valjevo, Priboj, Prijepolje, Užice, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica i Novi Pazar) predstavljaju izrazito govedarski kraj, što se za pojedine opštine Istočne (Niš) i Centralne Srbije (Aleksandrovac) ne može reći.

Hidatidoza kod ovaca je ustanovljena na teritoriji 2 opštine u Jugozapadnoj Srbiji: Prijepolje i Tutin, kao i 2 opštine u Istočnoj Srbiji: Svrljig i Niš. Sve četiri opštine pripadaju regijama Srbije u kojima je ovčarstvo zastupljeno kao značajna grana stočarske proizvodnje sa brojnim fondom ovaca.

**Fertilnost i vijabilnost.** Obrazovanjem skoleksa u hidatidnim cistama, koji nastaju najranije za 5–6 meseci, ciste postaju plodne i sposobne za infekciju stalnog domaćina (Šibalić i Cvetković, 1996).

Fertilnost hidatidnih cista određuje se mikroskopskim posmatranjem sadržaja ciste i germinativne membrane, a ciste se determinišu kao fertile ili sterilne (bez protoskoleksa) ili kalcifikovane i degenerisane. Fertile ciste se ispituju na vijabilnost uz pomoć bojenja 0,1% eozinom, pri čemu se živi protoskoleksi ne boje eozinom (Latif i sar., 2009).

U okviru parazitoloških ispitivanja koja su obavljena u materijalu poreklom iz hidatidnih cista različitih vrsta životinja, najveći procenat fertile cista ustanovljen je kod ovaca (61,9%), zatim svinja (22,4%) i najmanji kod goveda (8,0%).

Od 49 ispitanih domaćih svinja, fertile ciste su ustanovljene kod 22,4% životinja. Kod 57,1% životinja ciste su bile sterilne, a degenerativne ciste su utvrđene kod 20,5% svinja. Ustanovljeni procenat fertile cista je znatno niži od postojećih literaturnih podataka za svinje, koji se kreće od 70–88% (Šibalić i Cvetković, 1996; Kulišić, 2001). Vijabilnost je ustanovljena kod 90,9% fertile cista, što je razumljivo s



obzirom na starost procesa, kao i na adekvatne temperaturne uslove čuvanja cista (na temperaturi frižidera) do dostavljanja na laboratorijsko ispitivanje.

U toku istraživanja organa goveda sa hidatidnim promenama fertilne ciste su ustanovljene samo kod 8,0% životinja, a kod 92,0% životinja bile su sterilne. Fertilne ciste su se nalazile kod dve različite životinje: kod jedne u jetri, kod druge u plućima. Obe fertilne ciste su bile vijabilne (100%).

I drugi autori navode visok procenat sterilnih hidatidnih cista kod goveda – 80% (Šibalić i Cvetković, 1996), odnosno 87% (Ilić, 1987; Kulišić, 2001), dok je u našim ispitivanjima bio – 92,0%.

Ispitivanjem cista kod ovaca ustanovljene su fertilne ciste kod 61,9% životinja, kolika je bila i vijabilnost. Sterilne ciste su ustanovljene kod 23,8%, kod 9,5% kalcifikovane i kod 4,8% ovaca degenerativne.

Različiti autori navode različite podatke o fertilnosti cista kod ovaca. Fertilnost cista ispitivana kod ovaca poreklom sa Pešterske visoravni (opštine Tutin i Sjenica) kretala su se u rasponu od 40–60% (Pavličević, 1974). Istovetna ispitivanja kod ovaca u Pakistanu govore u prilog slabe vijabilnosti fertilnih cista (15,7%) (Ahmed i sar., 2006)

Prema literaturnim podacima ovce se navode kao najznačajnije u širenju ehinokokoze, s obzirom na visok procenat fertilnih cista – 90% (Šibalić i Cvetković, 1996), odnosno 93% (Ilić, 1987; Kulišić, 2001). Pored visokog procenta fertilnosti njihovom velikom značaju u širenju oboljenja doprinose i tradicionalno, pašno gajenje uz pomoć pasa sa kojima su u bliskom kontaktu, klanje van klanica bez veterinarskog nadzora, što često omogućava dostupnost konfiskata psima, kao i neadekvatno uklanjanje leševa uginulih životinja (Kesteren i sar., 2013). Iz navedenih razloga svetska karta intenzivnosti ovčarstva u visokom procentu se poklapa sa stepenom raširenosti hidatidoze kod životinja i ljudi (Šibalić i Cvetković, 1996).

**Molekularne karakteristike hidatidoze životinja u Srbiji.** Molekularnim ispitivanjima materijala iz hidatidnih cista poreklom od 52 životinje (15 goveda, 18 ovaca, 17 domaćih i 2 divlje svinje), u okviru kompleksa *E. granulosus s.l.* determinisana su 3 genotipa *E. granulosus s.s.* (G1, G2 i G3) kod goveda i ovaca, kao i *E. canadensis*, genotip G7, kod domaćih i divljih svinja.

*Echinococcus granulosus*, genotip G1 ustanovljen je kod 15 životinja: 9 goveda (60%) i 6 ovaca (40%). *Echinococcus granulosus*, genotip G2 ustanovljen je samo kod



4 ovce (100%). *Echinococcus granulosus*, genotip G3 ustanovljen je kod 12 životinja: 6 goveda (50%) i 6 ovaca (50%). Mešovita infekcija sa genotipovima G1/G2, kao i genotipovima G2/G3 ustanovljena je samo kod po jedne ovce (1,9%). *Echinococcus canadensis*, genotip G7 ustanovljen je kod 17 domaćih (89,5%) i 2 divlje svinje (10,5%) (Tabela 40).

**Tabela 40.** Uporedni prikaz determinisanih vrsta i genotipova *E. granulosus* s.s. kod goveda, ovaca, domaćih i divljih svinja

VRSTA/GENOTIP	Životinja		Goveda		Ovaca		Dom. svinja		Div. svinja	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
<i>E. granulosus</i> s.s. G1	15	28,8	9	60	6	40,0				
<i>E. granulosus</i> s.s. G2	4	7,8			4	100				
<i>E. granulosus</i> s.s. G3	12	23,0	6	50	6	50,0				
<i>E. granulosus</i> s.s. G1/G2	1	1,9			1	5,5				
<i>E. granulosus</i> s.s. G2/G3	1	1,9			1	5,5				
<i>E. canadensis</i> G7	19	36,6					17	89,5	2	10,5
<b>Ukupno</b>	<b>52</b>	<b>100,0</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	<b>36,0</b>	<b>17</b>	<b>34,0</b>	<b>2</b>	<b>4,0</b>

**Domaće i divlje svinje.** U okviru obavljenih ispitivanja *E. canadensis*, genotip G7, ustanovljen je kod svih 17 ispitanih domaćih svinja (100%), u svih 19 pregledanih hidatidnih cista (100%) koje su bile poreklom iz jetre.

Analizom geografske distribucije porekla životinja kod kojih je ustanovljen *E. canadensis*, genotip G7, koja je prikazana na Kartogramu 4, vidi se rasprostranjenost ovog genotipa na teritoriji 6 opština u Republici Srbiji: Nova Crnja, Kikinda, Sremska Mitrovica, Šabac, Vladimirci i Kraljevo. Većina tih opština predstavljaju delove regija u kojima je svinjarstvo izuzetno zastupljeno kao grana stočarske proizvodnje.

Takođe, *E. canadensis*, genotip G7, ustanovljen je kod 2 ispitane divlje svinje poreklom iz lovišta sa teritorije opština Kraljevo i Bajina Bašta. Na teritoriji opštine Kraljevo isti genotip je ustanovljen i kod domaće i divlje svinje.

Razlozi prisustva istog genotipa kod domaćih i divljih svinja mogu biti različiti. Pre svega, velika je verovatnoća da *E. canadensis*, genotip G7, čije metacestode nalazimo kod domaćih i divljih svinja ima zajedničkog stalnog domaćina, verovatno lovačke pse. Na žalost, danas je veoma raširena praksa da vlasnici lovačkih pasa

vakcinaciju protiv besnila i dehelmintizaciju, koje su propisane mere, uglavnom izbegavaju.

Mogućnost inficiranja divljih svinja infektivnim oblikom parazita u prirodi, preko fecesa lovačkih pasa, takođe je moguć. Eviscerirani organi odstreljenih divljih svinja ostavljaju se u prirodi, što ih čini dostupnim lovačkim psima. Na ovaj način omogućava se preklapanje silvatičnog ciklusa sa ciklusom bolesti u krugu domaćih životinja.

Epizootiološki značaj drugih stalnih domaćina u silvatičnom ciklusu oboljenja, ne isključuje se, ali o njihovom učešću nema puno literaturnih podataka. Prema rezultatima istraživanja kod 119 vukova koja su obavljena u Italiji u periodu 1987-1999, odrasli oblik parazita *E. granulosus* je ustanovljen kod 15% ispitanih životinja. Imajući u vidu geografsku distribuciju vukova koji su bili pozitivni, kao i ustanovljene prevalencije kod ovaca u tim regijama, može se smatrati da su oni u Italiji sastavni deo ciklusa infekcije pasovca. S obzirom na pojedinačne pozitivne rezultate na hidatidozu kod divljih preživara, koja nisu bazirana na sistematskim ispitivanjima, ne može se proceniti evolucija silvatičnog ciklusa infekcije (Guberti i sar., 2004). Slična ispitivanja obavljena u grupaciji lisica u Slovačkoj Republici, pored ustanovljavanja drugih parazita, nisu dokazala prisustvo odraslih oblika parazita *E. granulosus* (Letkova i sar., 2006).

U okviru ranijih molekularnih ispitivanja hidatidoze kod ljudi u Srbiji, urađena su i inicijalna ispitivanja kod svinja (4 svinje zaklane na klanici u Bačkoj Topoli). Kod 2 svinje ustanovljen je *E. canadensis*, genotip G7, a kod preostale 2 životinje ustanovljen je *E. granulosus*, genotip G1, koji u obavljenim ispitivanjima nije ustanovljen (Maillard i sar., 2008; Čolović, 2009; Čolović i sar., 2009).

*Echinococcus canadensis*, genotip G7, dokazan je u zemljama članicama EU (Estoniji, Latviji, Litvaniji, Rumuniji, Poljskoj, Slovačkoj, Italiji i Španiji) i mnogim zemljama Istočne Evrope, delovima Rusije, Meksiku i Peruu (EFSA Scientific report, 2010).

Pojedinačni nalaz *E. canadensis*, genotip G7, u materijalima poreklom od ljudi predstavljaju novinu u genotipizaciji ovog parazita u Turskoj (Eryildiz i sar., 2012). Molekularnim proučavanjem materijala iz hidatidnih cista poreklom od ovaca i ljudi u području Zapadne Turske, pored više genotipova *E. granulosus* s.s., ustanovljeno je i prisustvo *E. canadensis*, genotip G7. Pretpostavlja se da su u Turskoj rezervoari genotipa



G7, divlje svinje i koze (Snabel i sar., 2009). I pored toga što je dokazan i kod ljudi, ovaj genotip se smatra manje infektivnim za ljude (Erylidiz i sar., 2012).

*Echinococcus canadensis*, genotip G7, koji je prvi put dokazan na teritoriji Austrije u hidatidnim cistama većeg broja pacijenata poreklom sa teritorije bivše Jugoslavije i Turske, govori u prilog značaja ovog genotipa u epidemiologiji bolesti u Evropi, u okviru importovanih slučajeva. Takođe, kao novi genotip u Evropi, zahteva dalja molekularna proučavanja čiji bi rezultati bili uključeni u buduće programe kontrole (Schneider i sar., 2009).

**Goveda.** U okviru molekularnih ispitivanja obavljenih kod 15 goveda, ustanovljeno je prisustvo *E. granulosus s.s.*, i to: genotip G1 kod 9 životinja (60%) i genotip G3, kod 6 životinja (40%). Statističkom analizom zastupljenosti genotipova G1 i G3 kod goveda, nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,527$  ( $p>0,05$ ).

Distribucija oba genotipa po organima je veoma slična. U cistama poreklom iz jetre, genotip G1 je zastupljen sa 60,0%, a G3 sa 55,5%. U cistama poreklom iz pluća genotip G1 je zastupljen sa 40,0%, a genotip G3 sa 44,5%.

Analizom geografske distribucije porekla goveda kod kojih je ustanovljen *E. granulosus s.s.*, genotip G1 i genotip G3, vidi se široka rasprostranjenost ovih genotipova na teritoriji 7 opština u Srbiji: Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac i Niš.

Genotip G1 ustanovljen je kod 60,0% ispitanih životinja, na teritoriji 3 opštine (42,9%), i to: u 2 opštine (Niš i Prijepolje) kao jedini, i kao drugi genotip na teritoriji opštine Čajetina.

Genotip G3 ustanovljen je kod 40,0% ispitanih životinja, na teritoriji 5 opština (71,4%), i to: 4 opštine Jugozapadne (Priboj, Nova Varoš, Čajetina i Ivanjica) i u jednoj opštini Centralne Srbije (Aleksandrovac).

Geografska raširenost genotipa G3 je veća od raširenosti genotipa G1, ali je prevalencija genotipa G1 veća od prevalencije genotipa G3. U okviru geografske distribucije, genotip G1 je prisutan na teritoriji manjeg broja opština (42,8%) nego genotip G3 (71,4%). Istovremeno, genotip G1 je determinisan kod većeg broja životinja (60,0%) nego genotip G3 (40,0%).

Samo na teritoriji jedne opštine u jugozapadnoj Srbiji (Čajetina), ustanovljeno je istovremeno prisustvo jednog i drugog genotipa, i to kod različitih životinja.



Ranijim molekularnim ispitivanjima materijala poreklom od goveda (4 životinje poreklom sa klanice u Knjaževcu), dokazano je prisustvo *E. granulosus s.s.*, genotipa G1 kod 2 životinje, a kod preostale 2 životinje *E. canadensis s.s.*, genotip G7 (Čolović, 2009; Čolović i sar., 2009; Maillard i sar., 2009). U obavljenim ispitivanjima genotip G7 nije ustanovljen u materijalu poreklom od goveda.

Molekularne studije *E. granulosus* kod domaćih preživara u Iranu pokazuju da su goveda inficirana dominantno sa genotipom G1, ali da mogu biti inficirana i drugim genotipovima. Iste studije, takođe, pokazuju da je genotip G1 kod goveda manje patogen i u mnogim slučajevima produkuje sterilne ciste (Parsa i sar., 2011; Pezeshky i sar., 2012).

**Ovce.** Molekularnim ispitivanjima koja su obavljena u materijalu poreklom od 18 ovaca, ustanovljeno je prisustvo sva tri genotipa *E. granulosus s.s.*, i to: genotip G1 kod 33,3% životinja, genotip G2 kod 22,4% i genotip G3 kod 33,3% ispitanih životinja. Mešovita infekcija sa G1/G2 i G2/G3 genotipovima ustanovljena je kod po 5,5% životinja. Statističkom analizom zastupljenosti pojedinih genotipova (G1, G2 i G3) kod ovaca, nije ustanovljena statistički značajna razlika,  $P=0,9608$  ( $p>0,05$ ).

U okviru praćenja distribucije genotipova po organima genotipovi G1 i G3 bili su dominantni u plućima (71,4% i 75,0%), a genotip G2 dominirao je u materijalima iz hidatidnih cista poreklom iz jetre (83,3%).

Kod 2 ovce kod koje je vršeno molekularno ispitivanje po jedne hidatidne ciste iz jetre i pluća, ustanovljena je mešovita infekcija. Kod obe životinje ustanovljeno je prisustvo genotipa G2 u jetri, dok je u plućima ustanovljeno prisustvo različitih genotipova: kod jedne G1, a kod druge životinje genotip G3.

Analizom geografske distribucije porekla ovaca kod kojih je ustanovljen *E. granulosus s.s.*, genotipovi G1, G2 i G3, uočava se rasprostranjenost ovih genotipova na teritoriji svih opština u kojima su rađena ispitivanja, i to: na teritoriji 2 opštine u jugozapadnoj Srbiji (Prijeplje i Tutin), kao i 2 opštine u istočnoj Srbiji (Svrljig i Niš). Navedene opštine pripadaju regijama Srbije u kojima je ovčarstvo zastupljeno kao značajna grana stočarske proizvodnje, sa izuzetno brojčano velikim fondom ovaca.

Genotip G1 ustanovljen je na teritoriji sve četiri opštine porekla ispitivanih životinja (100,0%), kod 33,3% pregledanih ovaca. Ovi rezultati govore u prilog značajnoj raširenosti ovog genotipa kod ovaca i na teritoriji Republike Srbije. Genotip





G2 ustanovljen je samo na teritoriji opštine Svrlijig (25,0% opština), kod 22,2% pregledanih životinja. Genotip G3 ustanovljen je na teritoriji 3 opštine: Prijepolje, Svrlijig i Niš (75,0% opština), kod 33,3% pregledanih ovaca.

Mešovita infekcija (G1/G2 i G2/G3), ustanovljena je kod 2 životinje (11,1%), samo na teritoriji opštine Prijepolje (25,0% opština).

Sa determinisanim genotipovima *E. granulosus s.s.* (G1, G2 i G3) kod goveda i ovaca, Srbija se svrstava u grupu zemalja Mediterana i zemalja iz okruženja, u kojima su dokazani isti genotipovi. U zemljama članicama EU, ova tri genotipa su dokazana u: Francuskoj, Španiji, Portugaliji, Italiji, Bugarskoj i Rumuniji. Jedino je genotip G1 dodatno ustanovljen u UK (EFSA Scientific report, 2010). Isti genotipovi su determinisani u različitim geografskim područjima Severne Indije (Sharma i sar., 2013). *Echinococcus granulosus s.s.*, genotip G1, najčešći je genotip kod ovaca u Iranu (86,7%), koje su često inficirane i sa genotipom G3 (Hajjalilo i sar., 2011), kao i u Tunisu (M' rad i sar., 2010), Pakistanu (Ali i sar., 2015) i Turskoj (Eryldiz i Sakru, 2012).

Ranijim molekularnim ispitivanjima materijala poreklom od ovaca (8 životinja poreklom iz istočne Srbije) dokazano je prisustvo samo G1 genotipa (Čolović, 2009; Čolović i sar., 2009; Maillard i sar., 2008).

Molekularnim ispitivanjima 22 uzorka iz hidatidnih cista operisanih pacijenata u Srbiji dokazano je prisustvo genotipa G1 (devet cista) i genotipa G7 (trinaest cista) (Čolović, 2009).

**Analiza haplotipova.** Od 7 ustanovljenih haplotipova (Hap 1 - Hap 7), dva haplotipa (Hap 2 i Hap 5) su dominantni i ustanovljeni kod 21 životinje (40,4%). Haplotip 2 je ustanovljen kod 10 životinja (4 govečeta i 6 ovaca), a haplotip 5 kod 11 životinja (7 goveda i 4 ovce). Poređenja dobijenih sekvenci iz ispitujućih materijala poreklom od goveda i ovaca sa sekvencama u Banci gena (uz pomoć BLAST pretraživača), pokazuju da su sekvence dobijene kod goveda i ovaca, koje pripadaju Hap 5 (genotip G1), 100% identične sa haplotipom koji je globalno rasprostranjen i opisan u Kini (Nakao i sar., 2010), Evropi (Casulli i sar., 2012), na Srednjem Istoku (Yanagida i sar., 2012), u Tunisu, Libiji, Keniji, Australiji, Kazahstanu, Foklandskim ostrvima i Peruu (Boufana i sar., 2015). Ova dva dominantna haplotipa koji su ustanovljeni kod najvećeg broja životinja, zajednička su za goveda i ovce (Hap 2 i Hap



5). Dva haplotipa (Hap 3 i Hap 7) vezani su samo za ovce, a ostala tri samo za goveda (Hap 1, Hap 4 i Hap 6).

Statistički značajna razlika u zastupljenosti determinisanih haplotipova u okviru pojedinih životinjskih vrsta i genotipova, ustanovljena je jedino kod goveda, u okviru genotipa G1 (Hap 4, Hap 5 i Hap 6),  $P=0,0183$  ( $p<0,05$ ).

Analiza sekvenci determinisanih haplotipova u Srbiji govori u prilog niskom nukleotidnom diverzitetu i različitosti haplotipova. Takođe, populacija kompleksa *E. granulosus s.s.* u Srbiji i susednim zemljama (Bugarska, Mađarska i Rumunija) i pored malih varijacija, genetski se ne razlikuju, što je verovatno uslovljeno pripadnošću istoj geografskoj regiji, odnosno njihovom blizinom. Razlika koja postoji u karakteristikama mreže haplotipova, verovatno je uslovljena razlikama u brojnosti populacije i trendovima u brojnosti prijemčivih prelaznih domaćina, koji su u Srbiji u opadanju, za razliku od susednih zemalja u kojima su na znatno višem nivou i u ekspanziji (Debeljak i sar., 2016).

Nukleotidni diverzitet između haplotipova ustanovljenih u Severnoj Indiji, takođe je veoma nizak (Sharma i sar., 2009; Sharma i sar., 2013).

Značajne varijacije u okviru *E. granulosus s.s.* ustanovljene su i u drugim zemljama Evrope koje se nalaze u okruženju. U Istočnoj Evropi ustanovljeno je prisustvo 24 haplotipa, sa najčešćim haplotipom EG1 (genotip G1), kao i EG2, EG3 i EG4. Haplotip EG1 (koji je ekvivalent našem Hap 1) glavni je haplotip i u italijanskoj populaciji sa zastupljenošću od 73%, od ukupno ustanovljenih 7 haplotipova (Casulli i sar., 2012).

U okviru *E. granulosus s.s.*, genotip G1 predstavlja dominantni genotip u materijalu iz hidatidnih cista poreklom od ljudi i životinja sa identičnim sekvencama kod goveda, ovaca i ljudi u Turskoj (Eryildiz i sar., 2012) i Iraku (Hama i sar., 2012).

Molekularnim ispitivanjima sprovedenim istovremeno u Argentini i Španiji ustanovljeno je da je *E. granulosus s.s.*, genotip G1, dominantan kod goveda i ovaca u obe zemlje, ali da se genetske varijante ovog genotipa značajno razlikuju u navedenim zemljama. Takođe, izveden je zaključak da je genetska varijabilnost unutar genotipova nezavisna od vrste prelaznog domaćina ili rase (Andresiuk sar., 2009).



## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Patomorfološkim, morfometrijskim i parazitološkim pregledom uzorkovanog materijala hidatidoza je ustanovljena kod 96 životinja (49 domaćih svinja, 2 divlje svinje, 25 goveda i 20 ovaca), poreklom sa teritorije 20 opština iz različitih epizootioloških područja Republike Srbije.
2. Hidatidne promene su dominantno bile lokalizovane u jetri domaćih i divljih svinja (97,9%), u jetri goveda (48,0%) i u plućima ovaca (52,4%).
3. Najveći procenat fertilnih cista dijagnostikovani su kod ovaca (61,9%), degenerativnih cista kod svinja (20,5%), dok su kalcifikovane ciste ustanovljene samo kod ovaca (9,5%). Samo kod goveda sve fertilne ciste (100%) su bile vijabilne, dok je kod domaćih svinja vijabilnost fertilnih cista utvrđena u 90,9%, a kod ovaca u 61,6% slučajeva.
4. Molekularnim ispitivanjima materijala iz hidatidnih cista poreklom od 52 životinje (15 goveda, 18 ovaca, 17 domaćih i 2 divlje svinje), u okviru *E. granulosus s.l.*, determinisane su: 2 vrste (*E. granulosus s.s.* i *E. canadensis*), 4 genotipa (G1, G2, G3 i G7) i 7 haplotipova (Hap 1 - Hap 7).
5. Kod domaćih svinja na teritoriji 6 opština (Nova Crnja, Kikinda, Sremska Mitrovica, Šabac, Vladimirci i Kraljevo) i kod divljih svinja na teritoriji 2 opštine (Bajina Bašta i Kraljevo) ustanovljen je *E. canadensis*, genotip G7.
6. Kod goveda na teritoriji 7 opština (Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac i Niš) determinisana su 2 genotipa *E. granulosus s.s.*, (G1 - kod 60% i G3 - kod 40% životinja) i 5 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6).
7. Kod ovaca na teritoriji jugozapadne (Prijepolje i Tutin) i istočne Srbije (Svrljig i Niš) ustanovljeno je prisustvo sva tri genotipa *E. granulosus s.s.* (G1- kod 33,3%, G2 - kod 22,4% i G3 - kod 33,3% životinja) i 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3,



- Hap 5 i Hap 7). Kod 2 ovce na teritoriji opštine Prijepolje ustanovljeno je postojanje mešovite infekcije, na nivou genotipa i haplotipa (genotip G2 - Hap 3 u jetri obe životinje, genotipa G1 – Hap 5 u plućima jedne životinje i genotip G3 - Hap 2 kod druge).
8. Dva genotipa ustanovljena kod goveda, pokazuju veći nukleotidni diverzitet i genetsku raznovrsnost (5 haplotipova) u poređenju sa 3 determinisana genotipa kod ovaca, u kojima su zastupljena 4 haplotipa.
  9. Od 7 ustanovljenih haplotipova, dva haplotipa (Hap 2 i Hap 5) su dominantni kod 40,4% životinja i zajednički su za goveda i ovce.
  10. Statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u zastupljenosti determinisanih haplotipova u okviru pojedinih životinjskih vrsta i genotipova, ustanovljena je jedino kod goveda, u okviru genotipa G1 (Hap 4, Hap 5 i Hap 6).
  11. Sekvence dobijene kod goveda i ovaca koje pripadaju haplotipu 5 (genotip G1), 100% su identične sa haplotipom koji je globalno rasprostranjen u svetu.



## 8. SPISAK LITERATURE

1. Ahmadi N., Dalimi A. (2002) - Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus* Isolated from Sheep and Camel in Iran, Archives of Razi Institute, (53): 47-56.
2. Ahmed S., Nawaz W., Gul R., Zakir M., Razzaq A. (2006) - Some Epidemiological Aspects of Hydatidosis of Lungs and Livers of Sheep and Goats in Quetta, Pakistan, Pakistan Journal of Zoology, 38(1): 1-6.
3. Aleksić N. (2004) - Parazitske bolesti - specijalni deo, Autorovo izdanje, Jugoslovenska autorska agencija, K-79/02, Beograd.
4. Al-Saimary E.I., Al-Shemari N.M., Al-Fayadh M. (2010) - Molecular characterization of antigens extracted from hydatid cysts of human and other intermediate hosts, Medical Practice and Review, 1(2): 19-25.
5. Ali I., Panni K.M., Iqbal A., Iqbal M., Ahmad S., Ali A. (2015) - Molecular Characterization of *Echinococcus* Species in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan, Acta Scientiae Veterinariae, 43(1277): 1-7.
6. Andresiuk V.M., Gordo P.F., Bandera C.C., Elissoindo C.M., Dopchiz M., Denegri G. (2009) - *Echinococcus granulosus*: biological comparison of cattle isolates from endemic regions of Argentina and Spain, Revista Argentina de Microbiologia, 41: 218-225.
7. Antanasijević S. (1993) - Značajnije parazitoze domaćih životinja na epizootiološkom području Niša, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
8. Antanasijević S., Petrović M., Ignjatović R., Kulišić Z., Pavlović I. (1997) - Echinococcosis and hydatidosis of domestic animals in Nis area - Socio-economical aspects, Archivos Internacionales de la Hidatidosis, XXXII: 286, XVIII International Congress of Hydatidology, 03-07 November 1997, Lisboa, Portugal.



9. Anwar H.A., Rana H.S., Khan N.M., Qudoos A. (2000) - Hydatidosis: Prevalence and Biometrical Studies in Cattle (*Bob indicus*), Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 37(1-2): 29-32.
10. Balić D., Krovina Z., Sokol K., Agičić M., Lolić M., Skrivanko M., Krajina H., Vukičević M. (2013) - Trihinelozna i ehinokokoza – parazitarne zoonoze od primarnog značenja za javno zdravstvo zemalja EU i Hrvatske, Veterinarska stanica, 44(5): 339-349.
11. Blutke A., Hamel D., Huttner M., Gehlen H., Romig T., Pfister K., Hermanns W. (2010) - Cystic Echinococcosis Due to *Echinococcus Equinus* in a Horse from Southern Germany, Journal of Veterinary Diagnostic Investigations, 22(3): 458-462.
12. Bobić B., Nikolić A., Radivojević-Katić S., Klun I., Đurković-Đaković O. (2012) - Echinococcosis in Serbia: An Issue for the 21<sup>st</sup> Century (review), Foodborne Pathogens and Disease, 9(11): 967-973.
13. Bobić B., Nikolić A., Klun I., Štajner T., Djurković-Djaković O. (2014) - Current status of echinococcosis in Serbia, Book of abstracts International Congress 48. Days of preventive medicine, Niš, 23-26. September 2014.
14. Boore L.J. (2001) - Mitochondrial Gene Arrangement Source Guide, DOE Joint Genome Institute, Version 6.1, Walnut Creek, CA.
15. Boue F., Boes J., Boireau P., Cleas M., Cook A., Dorny P., Enemark H., Gleiven J., Hunt R.K., Hovell M., Kirjušina M., Nockler K., Pozio E., Rossi P., Smith C.G., Snow L., Taylor A.M., Theodoropoulos G., Vallee I., Viera-Pinto M.M., Zimar A.I. (2010) - Development of harmonized schemes for the monitoring and reporting of *Echinococcus* in animals and foodstuffs in the European Union, Scientific report submitted to EFSA (European Food Safety Authority) in accordance with Article 36 of Regulation (EC) No. 178/2002.
16. Boufana B., Lett.W, Lahmar S., Griffiths A., Jenkins J.D., Buishi I., Engliez A.S., Alfredi A.M., Eljaki A.A., Elmestiri M.F., Reyes M.M., Pointing S., Al-Hindi A., Torgerson R.P., Okamoto M., Craig S.P. (2015) – Canine echinococcosis genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) from definitive hosts, Journal of Helminthology, 89(6): 689-698.



17. Bowles J., Blair D., McManus P.D. (1992) - Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNK sequencing, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 54(2): 165-174.
18. Casulli A., Interisano M., Sreter T., Chitimia L., Kirkova Z., La Rosa G., Pozio E. (2012) - Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNK sequences, *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2): 377–383.
19. Cikota B., Jenežić A., Magić Z. (2002) - Kvantifikacija ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze, *Vojnosanitetski pregled*, 59(5): 551-556.
20. Craig C.S., McManus P.D., Lightowlers W.M., Chabalgoity A.J., Garcia H.H., Gavidia M.C., Gilman R.H., Gonzales F.A., Lorca M., Naquira C., Nieto A., Shhantz P. (2007) - Prevention and control of cystic echinococcosis: review, *The Lancet Infectious Disease*, 7(6): 385-394.
21. Crandall I. (2000) - Parasitology Manual, Collection and Laboratory Procedures for Specimens Other Than Stool or Blood, MSH/TML Shared Microbiology Service Policy & Procedure Manual, 70-71.
22. Ćirović D., Pavlović I., Kulišić Z., Ivetić V., Penezić A., Ćosić N. (2012) - *Echinococcus multilocularis* in the European beaver (*Castor fibre L.*) from Serbia: first report, *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.100879.
23. Čolović I. (2009) - Morfološke i genetske osobine sojeva *Echinococcus granulosus* od bolesnika sa cističnom hidatidozom jetre, Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
24. Čolović I., Džamić A., Maillard S., Piarroux R., Katić-Radivojević S. (2009) - Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes isolated from cattles and pigs in Serbia, 6th Balkan Congress of Microbiology (Ohrid 2009), *Makedonski Medicinski Pregled*, 63(78): 75.
25. Damnjanović D., Kulišić Z., Pavlović I. (1995) - Prevalence of hydatidosis in Valjevo area, XVII International Congress of Hydatidology, Limassol, Cyprus, 10-14 November, 1995.
26. Dariani A., Alaei R., Sharif M., Dehghan H.M., Ziaei H. (2006) - Prevalence of Hydatid Cyst in Slaughtered Animals in Northwest Iran, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(4): 330-334.



27. Debeljak Z., Kulišić Z., Vidanović D., Tomić A. (2013) - Molecular investigations of echinococcosis in domestic and wild animals – Book of abstracts 47. Days of Preventive medicine, p. 27, 8-11 May 2013., Niška Banja.
28. Debeljak Z., Kulišić Z., Vidanović D., Tomić A. (2013) - Epizootiološko epidemiološki aspekt molekularnog proučavanja ehinokokoze i hidatidoze domaćih i divljih životinja, Zbornik radova i kratkih sadržaja trećih internacionalnih epizootioloških dana i petnaesti epizootiološki dani Srbije, str. 150-151, 8-11. maj 2013., Niška Banja.
29. Debeljak Z., Boufana B., Interisano M., Vidanović D., Kulišić, Z., Casulli A (2016) - First insights into the genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) in Serbia, *Veterinary Parasitology*, 223: 57-62.
30. Dimitrijević Sanda (1996) - Hidatidoza ljudi i životinja u nekim delovima Srbije, Zbornik referata i kratkih sadržaja radova Interfakultetskog sastanka Veterinarskih fakulteta Beograda i Soluna, str. 220-223, 20-23. jun 1996, Kopaonik, Srbija.
31. Dimitrijević S, Ilić T, 2011, *Klinička parazitologija*, Autori i Interprint d.o.o., Beograd.
32. Dinkel A., Njoroge M.E., Zimmermann A., Walza M., Zeyhle E., Ibrahim E. E., Mackenstedt U., Romig T. (2004) - A PCR system for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with reference to the epidemiological situation in eastern Africa, *International Journal for Parasitology*, 34(5): 645–653.
33. Dumitru M.I., Dumitru E., Rugina S. (2011) - Role of epidemiologic data in management of hydatidosis in Constanta county, Romania, *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology*, XV(2): 132-138.
34. Eckert J., Gemmell A.M., Meslin X.-F., Pawłowski S.Z. (2002) - WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, World Health Organization & World Organisation for Animal Health.





35. EFSA (European Food Safety Authority), (2002) – EU summary report on Trends and sources of zoonotic agents in the European Union and Norway, 207.
36. EFSA (European Food Safety Authority), (2013) – EU summary report on Trends and sources of zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013,
37. EFSA (European Food Safety Authority), (2010) – Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Echinococcus* in animals and foodstuffs in the European Union, Scientific report, 2010.
38. Eryildiz C., Sakru N. (2012) - Molecular Characterization of Human and Animal Isolates of *Echinococcus granulosus* in the Thrace Region, Turkey, Balkan Medical Journal, 29(3): 261-267.
39. Ergin S., Saribas S., Yuksel P., Zengin K., Midilli K., Adas G., Arikan S., Aslan M., Uysal H., Caliskan R., Oner A., Kucukbasmaci O., Kaygusuz A., Mamal Torun M., Kocazeybek B. (2010) – Genotypic characterisation of *Echinococcus granulosus* isolated from human in Turkey, African Journal of Microbiology Research, 4(7): 551-555.
40. Esfandiari B., Yoissefi R.M. (2010) - Comparison of Eosin and Trypan Blue Staining in Viability of Hydatid Cyst Protoscoleces, Global Veterinaria, 4(5): 456-458.
41. European Union Reference Laboratory for Parasites Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases (2010) - Identification of *Echinococcus granulosus* complex at genotype/species level from hydatid cysts by PCR and sequencing, Unit of Gastroenteric and Tissue Parasitic Diseases Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299 – 00161 Rome, Italy.
42. Gemmell A.M. (1959) - The fox as a definitive host of echinococcus and its role in the spread of hydatid disease, Bulletin of the World Health Organization, 20: 87-99.
43. Gloria A., Webster B.A., Cameron M.W.T. (1967) - Epidemiology and Diagnosis of Echinococcosis in Canada, Canadian Medical Association Journal, 96: 600-607.



44. Gottstein B. (1992) - Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis, *Clinical Microbiology Review*, 5(3): 248-261.
45. Gottstein B. (2010) - *Echinococcus* spp. and echinococcosis, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(Suppl 1): S5.
46. Gottstein B., Wang J., Blagosklonov O., Grenouillet F., Millon L., Vuitton A.D., Muller N. (2014) - *Echinococcus* metacestode: in search of viability markers, *Parasite*, 21(63): 1-10.
47. Grenouillet F., Umhang G., Arbez-Gindre F., Manton G., Delabrousse E., Millon L., Boue F. (2014) - *Echinococcus ortleppi* infestations in Humans and Cattle, France, *Emerging Infectious Diseases*, 20(12): 2100-2102.
48. Guberti V., Bolognini M., Lanfranchi P., Battelli G. (2004) - *Echinococcus granulosus* in the wolf in Italy, *Parassitologia*, 46(4): 425-427.
49. Hajjalilo E., Harandi F.M., Sharbatkhori M., Mirhendi H., Rostami S. (2011) - Genetic characterization of *Echinococcus* in camels, cattle and sheep from the south-east of Iran indicates the presence of the G3 genotype, *Journal of Helminthology*, 86(3): 263-270.
50. Hama A.A., Mero S.M.W., Jubreal S.M.J. (2012) - Molecular Characterization of *E. granulosus*, First Report of Sheep Strain in Kurdistan-Iraq, 2<sup>nd</sup> International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (EEBS 2012), 13-14 October 2012., Indonesia.
51. Harandi F.M., Hobbs P.R., Adams J.P., Mobedi I., Morgan-Ryan M.U., Thompson A.C.R. (2002) - Molecular and morphological characterization of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Iran, *Parasitology*, 125(4): 367-373.
52. Huttner M., Siefert L., Mackenstedt U., Romig T. (2009) - A survey of *Echinococcus* species in wild carnivores and livestock in East Africa, *International Journal for Parasitology*, 39(11): 1269-1276.
53. Ilić G. (1987) - Paraziti ovaca i koza Timočke Krajine, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
54. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2013) - Izveštaj o zaraznim bolestima u 2012. godini na teritoriji Republike Srbije, Beograd, 2013, 32.



55. Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ (2015) - Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2014.godinu, Beograd, 2015, 35.
56. Jakšić B., Sofrenović Đ. (1979) - Specijalna patološka morfologija, Naučna knjiga, Beograd.
57. Jovanović M., Aleksić Kovačević S., Knežević M. (2012) - Specijalna veterinarska patologija, Udruženje veterinarskih patologa Srbije, Beograd.
58. Jones C.T., Hunt D.R., King W.N. (1996) - Veterinary Pathology, Sixth edition, Williams& Wilkins, ISBN 0-683-04481-8.
59. Kesteren V.F., Mastin A., Mytyonova B., Ziadinov I., Boufana B., Torgerson R.P., Rogan T.M., Craig P. (2013) – Dog ownership, dog behaviour and transmission of *Echinococcus* spp. In the Alay Valley, southern Kyrgyzstan, Parasitology, 140(13): 1674-1684.
60. Khalifa O.N., Khater F.H., Fahmy A.H., Radwan I.E.M., Afify A.S.J. (2014) - Genotyping and Phylogenetic Analysis of Cystic Echinococcosis Isolated from Camels and Humans in Egypt, American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2(3): 74-82.
61. Knapp J., Chirica M., Simonnet C.C.M., Grenouillet F., Bart J.M., Sako Y., Itoh S., Nakao M., Ito A., Millon L. (2009) - *Echinococcus vogeli* Infection in a Hunter, French Guiana, Emerging Infectious Diseases, 15(12): 2029-2031
62. Kulišić Z., Aleksić-Bakrač N., Pavlović I. (1999) - Ehinokokoza i hidatidoza domaćih životinja, Monografija, Hemijska industrija „Župa“ Kruševac.
63. Kulišić Z. (2001) - Helmintologija, Veterinarska komora Srbije, Beograd.
64. Latif, A., Tanveer A., Riaz-ud-Din S., Maqbool A., Qureshi W.A. (2009) - Morphometry of protoscoleces rostellar hooks of *Echinococcus granulosus* isolates from Punjab, Pakistan, Pakistan Journal of Science, 61(4): 223-228.
65. Lepojev O., Kulišić Z., Aleksić N., Miklijan S. (1989) - Ehinokokoza na području SO Žagubica: Rasprostranjenost kod domaćih životinja i epizootiologija, Veterinarski glasnik, 43(3-4): 321-325.
66. Letkova V., Lazar P., Čurlik J, Goldova M., Kočišova A., Košuthova L., Mojžišova J. (2006) – The red fox (*Vulpes vulpes* L.) as source of zoonoses, Veterinarski Arhiv, 76 (Supl.):S73-S81.



67. Maillard S, Ma S, Haag KL, Gottstein B, Radonjic I, Benchikh-Elfegoun MC, Knapp J, Piarroux R. (2008) - Genotyping of *Echinococcus granulosus sensu lato*: overview of the mitochondrial COX1 and NAD1 polymorphism and evaluation of the multilocus microsatellite EmsB. *Xth European Multicolloquium of Parasitology*, Paris, Book of Abstracts, 65.
68. Mantovani A., Lasagna E. (2004) - Notes on cystic echinococcosis in the Mediterranean, *Parasitologia*, 46(4): 353-355.
69. Marković R. (1978) - Ehinokokoza domaćih životinja i ljudi na području SO Valjevo, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
70. Masala S., Parodi P. (2004) - Health education and formation: essential tools into the Echinococcosis/Hydatidosis preventions programs, *Parassitologia*, 46(4): 393-396.
71. McManus P.D., Zhang W., Li J., Bartley B.P. (2003) - Echinococcosis, *The Lancet*, 362 (Seminar): 1295-1304.
72. McGavin D.M., Zachary F.J. (2007) - Pathologic basis of veterinary disease, Four edition, Mosby-Elsevier.
73. Melaku A., Lukas B., Bogale B. (2012) - Cyst Viability, Organ Distribution and Financial Losses due to Hydatidosis in Cattle Slaughtered At Dessie Municipal Abattoir, North-eastern Ethiopia, *Veterinary World*, 5(4): 213-218.
74. Miladinović-Tasić N., Otašević S. (2014) - Human echinococcosis: epidemiological and serodiagnostic aspects, Book of abstracts International Congress 48. Days of Preventive medicine, Niš, 23-26. September 2014.
75. Moro P., Schantz M.P. (2009) - Echinococcosis: a review, *International Journal of Infectious Diseases*, 13(2): 125-133.
76. M'rad S., Oudni-M'rad M., Filisetti D., Mekki M., Nouri A., Sayadi T., Candolfi E., Azaiez R., Mezhoud H., Babba H. (2010) - Molecular Identification of *Echinococcus granulosus* in Tunisia: First Record of the Buffalo Strain (G3) in Human and Bovine in the Country. *The Open Veterinary Science Journal*, 4: 27-30.
77. Nakao M., McManus P.D., Schantz M.P., Craig S.P., Ito A. (2007) - A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes, *Parasitology*, 134(5): 713-722.



78. Nakao M., Li T., Han X., Xiao N., Qiu J., Wang H., Yanagida T., Mamuti W., Wen H, Moro P.L., Giraudoux P., Craig P.S., Ito A. (2010) - Genetic polymorphisms of *Echinococcus* tapeworms in China as determined by mitochondrial and nuclear DNA sequences, *International Journal for Parasitology*, 40(3): 379-385.
79. Nakao M., Lavikainen A., Yanagida T., Ito A. (2013) – Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae), *International Journal for Parasitology*, 43(12-13): 1017-1029.
80. Nejad R.M., Mojarad N.E., Norouzina M., Harandi F.M., (2010) - Echinococcosis: based on molecular studies in Iran, *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 3(4): 169-176.
81. Nevenić V., Šibalić S., Cvetković LJ. (1955) - Ehinokokoza domaćih životinja, Sekcija za parazitologiju i invazione bolesti društva veterinara NR Srbije, Beograd.
82. Nevenić V. (1957) – Invazione bolesti domaćih životinja, *Medicinska knjiga*, Beograd-Zagreb, 116-128.
83. Novakov N., Bjelić-Čubrilo O., Ćirković M., Ljubojević D., Davidov I., Aleksić N., Kostić D., (2012) - Epizootological factors responsible for mass echinococcosis of sows, *Book of abstracts Second international epizootiology days*, 183-187, Beograd, 18-21. April 2012.
84. OIE, Office International des Epizootie (2012) - Echinococcosis/ Hydatidosis, *Terrestrial Manual*, Chapter 2.1.4., 175-189.
85. OIE, Office International des Epizootie (2014) - Infection with *Echinococcus granulosus*, *Terrestrial Animal Health Code – V 8 - Chapter 8.5.*, 1-3.
86. OIE, Office International des Epizootie (2011) - Echinococcosis/ Hydatidosis, *Terrestrial Animal Health Standards Commission (Report) - Chapter 8.4.*
87. Parsa F., Behzad H., Pestechian N., Salehi M. (2010) - Molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* strains in domestic herbivores of Lorestan, Iran, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4(2): 123-130.
88. Pavličević M. (1976) - Parazitske infekcije jetre ovaca Sjeničko Peštarske visoravni, *Specijalistički rad*, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.



89. Pavlović I., Hadžić I., Žugić G., Anđelić-Buzadžić G., Vaić D., Jovčevski S. (2011) - Hidatidoza aktuelan problem stočarske proizvodnje, Radovi sa 25. savetovanja agronoma, veterinara i tehnologa, 17(3-4): 133-137.
90. Pavlović I., Ivanović S. (2006) - Ehinokokoza/Hidatidoza bolest životinja i ljudi, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd.
91. Paunović V., Savin Ž., Kulišić Z. (1994) - Helmintoze pasa na području opštine Zrenjanin. Veterinarski glasnik, 48(10): 905-908.
92. Pazeshki A., Akhlaghi L., Sharbatkhori M., Razmjou E., Oormazdi H., Mohebalı M., Meamar R.A. (2012) - Genotyping of *Echinococcus granulosus* from domestic animals and humans from Ardabil Province, northwest Iran, Journal of Helminthology, Available on CJO doi:10:1017/S0022149X120051X.
93. Petrović T., Velhner M., Petrović J., Stojanov I., Grgić Ž., Lazić S. (2010) – Savremene metode laboratorijske dijagnostike u veterinarskoj medicini i mogućnosti njihove primene, Arhiv veterinarske medicine, 3(1): 39-61.
94. Pozio E. (2010) – Work programmes for EU reference laboratory Parasites in 2011 (in particular *Trichinella*, *Echinococcus* and *Anisakis*) - European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
95. Pozio E. (2011) - Work programmes for EU reference laboratory Parasites in 2012 (in particular *Trichinella*, *Echinococcus* and *Anisakis*) - European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
96. Pozio E. (2012) – Work programmes for EU reference laboratory Parasites in 2013 (in particular *Trichinella*, *Echinococcus* and *Anisakis*) - European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
97. Pozio E. (2014) - Work programmes for EU reference laboratory Parasites in 2015 (in particular *Trichinella*, *Echinococcus* and *Anisakis*) - European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
98. Picoli L., Bazzocchi C., Brunetti E., Michailescu P., Bandi C., Mastalier B., Cordos I., Beuran M., Popa L., Meroni V., Genco F., Cretu C. (2012) - Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* in south-eastern Romania: evidence of G1-G3 and G6-G10 complexes in humans, Clinical Microbiology and Infection, doi 10.1111/j.1469-0691.2012.03993.X.



99. Radojčević M., Šebetić Č. (1984) - Priručnik za laboratorijsku dijagnostiku, Savez veterinarara i veterinarskih tehničara Jugoslavije – Odbor za izdavačku delatnost, Beograd.
100. Refik M., Mehmet N., Durmaz B., Egri M. (2002) - Determination of some biochemical parameters in hydatid cyst fluids, *Erciyes Medical Journal*, 24(1): 10-13.
101. Rezabek B.G., Giles C.R., Lyons T.E. (1993) - *Echinococcus granulosus* hydatid cysts in the livers of two horses, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5(1): 122-125.
102. Samavatian A., Valilou R.M., Lofti R.A., Khani Y.M., Mirzaei H. (2009) - Study of the incidence rate of liver and lung hydatidosis in slaughtered cattle and buffaloes, at Ahar abattoir (Arasbaran region-Northwestern Iran) during 2007-2008, *Buffalo Bulletin*, 28(4): 218-222.
103. Sanchez E., Caceres O., Naquira C., Garcia D., Patino G., Herera S., Volotao C.A., Fernandes O. (2010) - Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6): 806-810.
104. Savić-Pavićević D., Matić G. (2011) - Molekularna biologija 1, NNK Internacional, Beograd.
105. Schneider R., Gollackner B., Schindl M., Tucek G., Auer H. (2010) - *Echinococcus canadensis* G7 (pig strain): an underestimated cause of cystic echinococcosis in Austria, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5): 871-874.
106. Sharma U., Jogisalu I., Moks.E., Varcasia A., Lavikainen A., Oksanen A., Simsek S., Andresiuk V., Denegri G., Gonzalez M.L., Ferrere E., Garate T., Rinaldi T., Maravilla P. (2009) – Novel phylogeny for the genus *Echinococcus* based on nuclear data challenges relationships based on mitochondrial evidence, *Parasitology*, 136(03): 317-328.
107. Sharma M., Fomda A.B., Mazta S., Schgal R., Singh B.B. (2013) - Genetic Diversity and Population Genetic Structure Analysis of *Echinococcus*



- granulosus sensu stricto* Complex Based on Mitochondrial DNA Signature. PLoS ONE 8(12) e:82904. doi:10.1371/journal.pone.0082904.
108. Sharma M., Schgal R., Fomda A.B., Malhotra A., Malla N. (2013) - Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* Cysts in North Indian Patients: Identification of G1, G3, G5 and G6 Genotypes, PLOS Neglected Tropical Diseases, 7(6): e2262. Doi: 10.1371/journal/pntd.0002262.
109. Shahzad W., Abbas A., Munir R., Khan S.M., Avais M., Ahmad J., Rana Y.M., Mehmood F. (2014) - A PCR Analysis of Prevalence of *Echinococcus granulosus* Genotype G1 in Small and Large Ruminants in Three Districts of Punjab, Pakistan, Pakistan Journal of Zoology, 46(6): 1541-1544.
110. Sigurdarson S. (2010) - Dogs and echinococcosis in Iceland, Acta Veterinaria Scandinavica, 52(Suppl 1): S5.
111. Simić Č., Petrović Z. (1962) - Helminti čoveka i domaćih životinja, Zavod za izdavanje udžbenika Narodne Republike Srbije, Beograd.
112. Simonović J. (1974) - Prilog izučavanju raširenosti ehinokokoze na epizootiološkom području Zaječar, Magistarski rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
113. Siracusano A., Delunardo F., Teggi A., Ortona E. (2012) - Host-Parasite Relationship in Cystic Echinococcosis: An Evolving Story, Clinical and Developmental Immunology, 2012m, Article ID 639362, 12 pages, doi:10.1155/2012639362.
114. Snabel V., Altintas N., Amelio S., Nakao M., Roming T., Yolasigmas A., Gunes K., Turk M., Busi M., Sevcova D., Ito A., Dubinsky P. (2009) - Cystic echinococcosis in Turkey: genetic variability and first record of the pig strain (G7) in the country, Parasitology Research, 105(1): 145-154.
115. Spotin A. (2015) – *Echinococcus shiquicus* and *Echinococcus felidis*, Chapter 4, <http://dx.doi.org/10.5772/60819>
116. Stanley L.R. (1985) - Patologijske osnove bolesti, II izdanje, Školska knjiga, Zagreb.
117. Stevanović M. (1992) - Ehinokokoza domaćih životinja i ljudi na području Vranja, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.





118. Stefan-Mikić S., Hrnjaković-Cvetković I., Milošević V., Jerant-Patić V. (2011) - Analiza podataka o pojavi i raširenosti značajnih zoonoznih infekcija u humanoj populaciji u Srbiji, *Medicina danas*, 10(7-9): 246-254.
119. Stanimirović Z., Stevanović J. (2012) - Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini, Zbornik predavanja sa XXXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, 24. februar, Beograd, 17-33.
120. Subotić V. (1989) – Rad srpskog lekarskog društva (Report of Serbian Medical Society), *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 1989(1):15-18.
121. Šibalić S., Cvetković Lj. (1996) - Parazitske bolesti domaćih životinja, Veterinarski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
122. Tavakoli R.H., Bayat M., Kousha A. (2008) - Hydatidosis Infection Study in Human and Livestock Populations During 2002-2007, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 4(4): 473-477.
123. Tešić S. (1997) - Helmintoze digestivnog trakta pasa na području Požarevca, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
124. Vesić S. (1996) - Helminti digestivnog trakta pasa na području Valjeva, Specijalistički rad, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
125. Villalobos N., Gonzales M.L., Morales J., Aluja A.S., Jimenes I.M., Blanco A.M., Harison S.Lj., Parkhouse E.M.R., Garate T. (2007) - Molecular identification of *Echinococcus granulosus* genotypes (G1 and G7) isolated from pigs in Mexico, *Veterinary Parasitology*, 147(1-2): 185-189.
126. Vural G., Baca U.A., Charles G.G., Bagci O., Gicik Y., Lightowlers W.M. (2008) - Variability in the *Echinococcus granulosus* Cytochrome C oxidase 1 mitochondrial gene sequence from livestock in Turkey and a re-appraisal of the G1–3 genotype cluster, *Veterinary Parasitology*, 154(3-4): 347–350.
127. Wardle A.R., McLeod A.J. (1970) – Advances in the zoology of tapeworms, Chapter 17, 139-155.
128. Xiao N., Qui J.M., Nakao M., Li T.Y., Jang W., Chen C.W. (2005) – *Echinococcus shiquicus n.sp.*, a taenid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China, *International Journal for Parasitology*, 35(6): 693-701.



129. Zhong X., Wang N., Hu D., Wang J., Liu T., Gu X., Wang S., Peng X. (2014) - Sequence Analysis of cytb Gene in *Echinococcus granulosus* from Western Cina, Korean Journal of Parasitology, 52(2): 1-5.
130. Živković M. (2007) - Osnovni principi PCR metode i njena primena u kliničkoj praksi, Medicinski časopis, 41(2): 32-37.
131. Yanagida T., Mohammadzadeh T., Kamhawi S., Nakao M., Sadjjadi M.S., Hijjawi N., Abdel-Hafez K.S., Sako Y. (2012) - Genetic polymorphisms of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the Middle East, Parasitology International, 61(4): 599-603.
132. Youssefi R.M., Tabaripour R., Omrani F.V., Spotin A., Esfandiari B. (2013) - Genotypic characterization of *Echinococcus granulosus* in Iranian goats, Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(5): 362-366.



## BIOGRAFIJA

Zoran Debeljak je rođen 05.08.1961. godine u Kraljevu, opština Kraljevo, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu, gimnaziju društveno-jezičkog smera, završio je u Kraljevu. Veterinarski fakultet u Beogradu je upisao školske 1979/80. godine, a diplomirao na istom fakultetu 1984. godine, sa prosečnom ocenom 8,08.

Posle odsluženja vojnog roka u novembru 1985. godine, zaposlio se u Međuregionalnom veterinarskom zavodu u Kraljevu, na mestu saradnika za epizootologiju. Na Veterinarskom fakultetu u Beogradu završio je specijalizaciju iz oblasti epizootologije zaraznih i parazitskih bolesti životinja, odbranivši specijalistički rad pod naslovom „Ispitivanje uzroka uginuća živine u brojlerskoj proizvodnji na teritoriji Regiona Kraljevo“, 13.06.1988. godine. Magistarsku tezu pod naslovom "Epizootiološko epidemiološke karakteristike bruceloze na teritoriji Kosova i Metohije" odbranio je 23.06.1998. godine na istom fakultetu, čime je stekao zvanje magistra veterinarskih nauka. Godine 2000. izabran je u zvanje istraživača saradnika, a u isto zvanje reizabran je 20.03.2006. godine. Vanredni član Akademije veterinarske medicine postao je 2003, a redovni 2010. godine.

Od 1985. godine zaposlen je u epizootiološkoj službi, a od 1991. godine je šef Odeljenja za epizootologiju Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ u Kraljevu. Od 2007. do 2013. godine bio je direktor ovog Instituta, a od oktobra 2013. godine šef Odeljenja za epizootologiju ove ustanove.

U toku 2003. i 2004. godine boravio je na višemesečnim usavršavanjima iz oblasti epizootologije u Engleskoj, SAD (Colorado State University) i Švajcarskoj (Faculty of Veterinary Medicine - Bern). Stručno se usavršavao u oblasti epizootologije zaraznih i parazitskih bolesti životinja u različitim institucijama u Nemačkoj, Rumuniji i Bugarskoj. Učestvovao je u radu brojnih domaćih i međunarodnih savetovanja i stručnih sastanaka u zemlji i inostranstvu.

U periodu od 1985. godine do danas, kao autor ili koautor objavio je 137 prikaza, stručnih i naučnih radova i stručnih publikacija u oblasti epizootologije zaraznih i parazitskih bolesti životinja.

Služi se engleskim jezikom. Aktivno koristi veći broj kompjuterskih programa. Koautor je nekoliko softverskih rešenja u oblasti epizootiološke analitike.

Oženjen je i ima troje dece.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani Zoran R. Debeljak

Broj upisa: 0123/27

### Izjavljujem

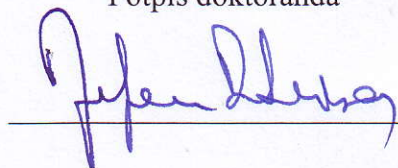
da je doktorska disertacija pod naslovom „Parazitološka i molekularna ispitivanja genotipova i haplotipova metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod različitih vrsta životinja“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

27.06.2016. godine

Potpis doktoranda



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Zoran R. Debeljak

Broj upisa: 0123/27

Studijski program: Izrada doktorske disertacije

Naslov rada: „Parazitološka i molekularna ispitivanja genotipova i haplotipova metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod različitih vrsta životinja“

Mentor: Dr Zoran Kulišić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

**Potpisani Zoran R. Debeljak**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

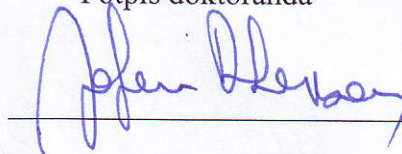
Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

27.06.2016. godine

Potpis doktoranda



### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom: „Parazitološka i molekularna ispitivanja genotipova i haplotipova metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod različitih vrsta životinja“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu,

27.06.2016. godine

Potpis doktoranda

