

Riikliku programmi "Põllumajanduslikud rakendusüriingud ja arendustegevus aastatel 2004–2008" lisa 6

PROJEKTI LÕPPARUANNE⁵

| | | | | |
|--|--------------------|--|--|---------------|
| 1. VALDKONNA NIMETUS: toiduohutus ja veterinaaria | | | | |
| 2. PROJEKTI NIMETUS: Tsüstilise ehhinokokoosi tekitaja <i>E. granulosus</i> levik ja tüved Eestis | | | | |
| 3. PROJEKTI NIMETUS inglise keeles: Distribution and strains of <i>E. granulosus</i> , as a cause of cystic echinococcosis, in Estonia | | | | |
| 4. PROJEKTI KESTUS | | Algus: Jaanuar 2007 | Lõpp: Detsember 2008 | |
| 5. PROJEKTI TÄITJA: Tartu Ülikool | | | | |
| Telefon: 737 5100 | | | | |
| Aadress: Ülikooli 18, 50090 TARTU | | | | |
| Registrikood: 74 00 10 73 | | | | |
| Pangarekviisidid: arveldusarve 10102000234007, SEB Eesti Ühispank, Tornimäe 2, 15010 TALLINN; IBAN: EE281010102000234007; BIC: EEUHEE2X | | | | |
| 6. PROJEKTI JUHT: | | Urmas Saarma (Ees- ja perekonnanimi) | vanemteadur, Tartu Ülikooli Ökoloogia ja Maateaduste Instituut, Zoologia Osakond, PhD (Ametikoht, teaduskraad) | |
| 7. RAHASTAMISE ALUS: Töövõtulepingud nr 3.4-23/166 ja nr 3.4-23/19 | | | | |
| 8. PROJEKTI TÄITJAD RAHASTAMISPERIOODI VÄLTEL (üksnes teema rahastamise raames tasustatud töötajad) | | | | |
| A. Projekti põhitäitjad (sh projekti juht): | | | | |
| Ees- ja perekonnanimi | Teaduskraad | Ülesanded projekti täitmisel | Koormus | Personalikulu |
| 1. Urmas Saarma | PhD | Projekti juht, geneetiline analüüs, projekti juhtimine | 1 | |
| 2. Epp Moks | PhD | Proovide määramine, puhastamine, geneetiline analüüs | 1 | |
| Kokku | | | 2 | |
| B. Projektiga seotud abitöötajad: | | | | |
| 1. Toivo Järvis | veterinaariadoktor | proovide kogumine | 0.5 | |
| 2. Jaak Kinnas | - | proovide | 0.5 | |

| | | | | |
|-------------------|-----|--|-----|--|
| | | kogumine, määramine morfoloogiliste tunnuste alusel | | |
| 3. Inga Jõgisalu | MSc | Proovide kogumine, määramine morfoloogiliste tunnuste alusel | 0.5 | |
| 4. Heli Talvik | PhD | Proovide kogumine, määramine morfoloogiliste tunnuste alusel | 0.5 | |
| 5. Harri Valdmann | PhD | Proovide kogumine | 0.5 | |
| Kokku 5 inimest | | | 2.5 | |

| 9. PROJEKTI KULUD RAHASTAMISPERIOODIL 321368 krooni | | | | | | |
|--|-------|---------------------------------|------|------|-----------|----------|
| | Kokku | Kulude jagunemine aastate kaupa | | | | |
| | | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 |
| Töötasud | | - | - | - | 54000 | 54000 |
| Sotsiaalmaks | | - | - | - | 17820 | 17820 |
| Töötuskindlustusmaks | | - | - | - | 162 | 162 |
| Administreerimiskulud (max 20%) | | - | - | - | 21960 | 21960 |
| Käibemaks (18%) | | - | - | - | 24 511.12 | 24511.12 |
| Kinnistute, hoonete ja ruumide majandamise kulud (max 20%) | | - | - | - | - | - |
| Ostetud teenused | | - | - | - | 8711 | 6350 |
| Lähetuskulud | | - | - | - | - | - |
| Muu erivarustus ja -materjal | | - | - | - | - | - |
| Masinad, seadmed | | - | - | - | - | - |
| Muud kulud | | | | | 33 519.88 | 35880.88 |
| Kokku | | - | - | - | 160684 | 160684 |

Kõiki kulusid on põhjendatud lisas (vt. Lisa 1)

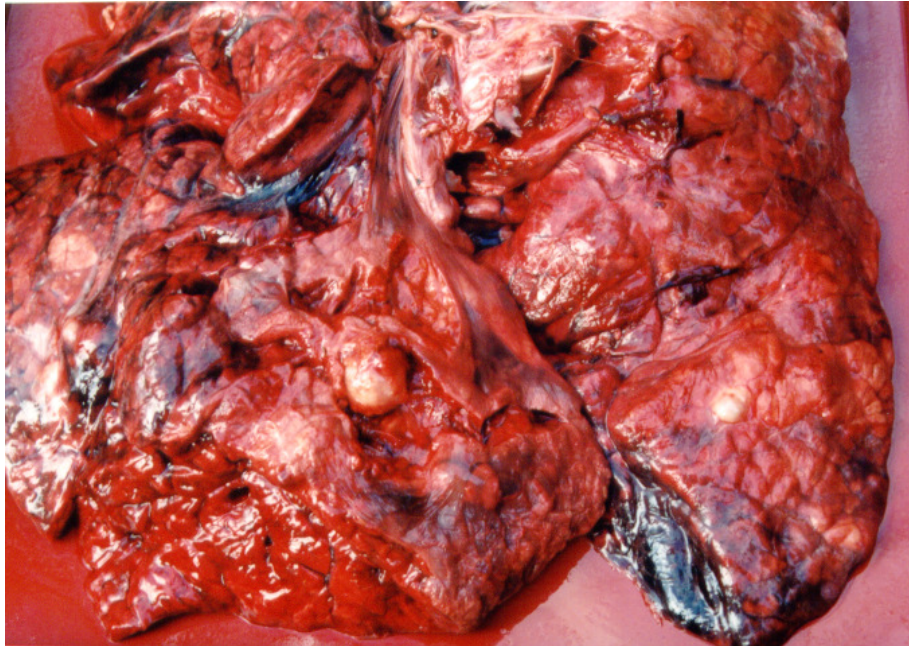
10. PROJEKTI ARUANNE (tehtud tööd, saadud uued teadmised ja tulemused jne):

Projekti **eesmärgiks** oli välja selgitada tsüstilise ehhinokokkoosi tekitaja paelussi *Echinococcus granulosus* levik ja genotüübid (tüved) Eestis ning nende fülogeneetiline positsioon võrreldes teiste genotüübigruppidega Euroopas ja mujal

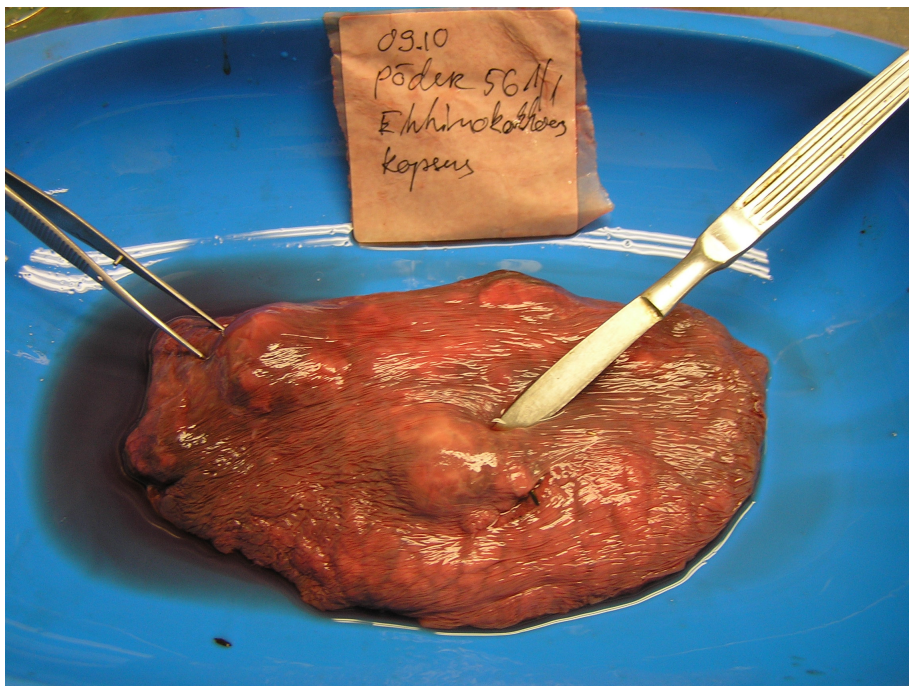
Läbi viidud tegevused ja tulemused

Projekti käigus vaadati parasitoloogilise lahangu käigus läbi 2038 põtra (*Alces alces*), 1044 metskitse (*Capreolus capreolus*), 442 metssiga (*Sus scrofa*) ja 26 punahirve (*Cervus elaphus*) – kokku 3550 sõralist üle Eesti (kõik loomad olid lastud legaalse jahi käigus). Lahangu tulemusena leiti kokku 24 ehhinokokkpaelussi tsüsti 16. põdralt (osadelt mitu tsüsti, vt. joonised 1a-1c) ja tehti mitokondriaalse geeni *nad1* sekveneerimise ja teiste GenBankis olevate ehhinokokkide *nad1* geenijärjestuste võrdlemise teel kindlaks, et tegemist on liigiga *Echinococcus granulosus*. Teistelt uurimise all olnud sõralistelt ehhinokoki tsüste ei leitud. Seega leidsime, et ehhinokokkpealussiga *Echinococcus granulosus* on

nakatunud ~0.8% põdrapopulatsioonist. Nakatunud põdrad olid pärit Harju-, Lääne-, Pärnu- ja Raplamaalt. Tegemist on esimeste parasiidi *E. granulosus* leidudega sõralistel peale 1950ndaid aastaid, mil tuvastati, et 0.6% sõralistest olid selle parasiidiga nakatunud (Lesinš, 1955). Vahepealsetel aastatel (üle 50 aasta!) parasiiti *E. granulosus* ei tuvastatud (Järvis, 2003).



Joonis 1a. Ehhinokokiga (*Echinococcus granulosus*) nakatunud põdra (*Alces alces*) kops Eestis (foto I. Jõgisalu)



Joonis 1b. Ehhinokokipõied põdra kopsust (foto I. Jõgisalu)

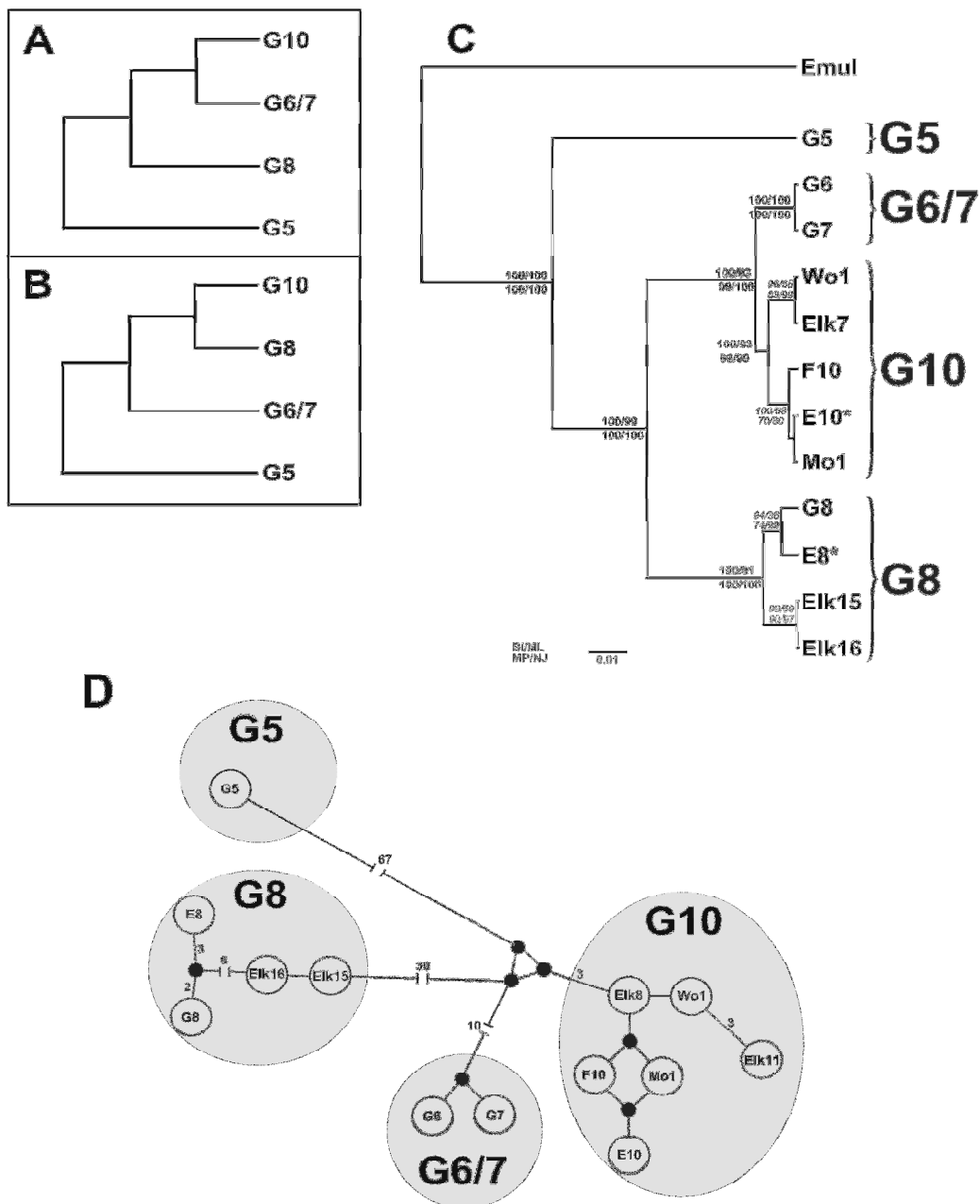


Joonis 1c. Ehhinokokipõied põdra kopsust Eestis (foto I. Jõgisalu)

Kuna epidemioloogiliselt on väga oluline teada *E. granulosus* genotüüpi (seni on teada 10 erinevat *E. granulosus* genotüübi gruppi, millel on erinev spetsiifika peremeesorganismide, sealhulgas ka inimeste nakatamise võimes), siis selle kindlakstegemiseks kasutasime DNA analüüsi. Selleks eraldasime ja puhastasime kõikidest tsüstidest genoomse DNA, kasutades selleks High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) ja sekveerisime 16. tsüstil mitokondriaalse DNA kolme geeni järjestused. Amplifitseeriti PCR (polümeraasi ahelreaktsioon) meetodil kolm mtDNA geeni: *atp6*, *nad1* ja *cox1* (järjestuste kogupikkus iga proovi jaoks 1028 nukleotiidi). Kõigi kolme geeni mõlemad DNA ahelad sekveeriti tsükkelsekveerimis-meetodil, kasutades DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit'i (Amersham Biosciences) ja sekveerimisproduktid lahutati geelelektroforeesil automaatsekvenaatoriga. Saadud DNA järjestused joondati ja DNA järjestused kontrolliti üksikshaaval üle ning leitud sekveerimisvead parandati käsitsi. Leiti, et Eesti esineb kaks *E. granulosus* genotüüpi. Võrreldes nende järjestusi teadaolevate genotüüpide järjestustega andmebaasist, selgus, et üks genotüüp (panime nimeks E8) kuulub genotüübigruppi G8. Seni oli genotüübigruppi G8 kuuluvaid ehinokokke leitud vaid Põhja-Ameerikast (Thompson jt. 2006) – seega on meie poolt leitud genotüüp esimene genotüübigruppi G8 kuuluv genotüüp Euraasias. Teine leitud genotüüp (nimetasime E10) kuulub genotüübigruppi G10, millist on leitud nii Skandinaavias kui Põhja-Ameerikas ja mis on arvatavasti Holarktilise levikuga. Genotüübi E8 esinemissagedus oli Eestis suurem kui E10 oma: 16st proovist 11 kandsid genotüüpi E8 (69%) ja 5 genotüüpi E10 (31%). Toodu fakt on tähelepanuväärne, sest Soomes seni analüüsitud 32 tsüstist kuulusid kõik genotüübigruppi G10 (Lavikainen jt. 2006), seega ei ole mingil põhjusel G8 veel Soome jõudnud või esineb seal väga madala sagedusega ja pole seetõttu tuvastatud. Seejärel asusime analüüsima Eestist tuvastatud *E. granulosus* genotüüpide E8 ja E10 fülogeneetilist

positsiooni teiste evolutsiooniliselt lähedaste *E. granulosus* genotüübigruppide suhtes. Seni oli teada, et genotüübigrupid G8 ja G10 (kuhu kuuluvad siis vastavalt ka Eestist tuvastatud genotüübid E8 ja E10) paiknevad fülogeneetiliselt lähestikku genotüübigruppidega G5 ja G6/7. Samas ei olnud teada, milline on nende genotüübigruppide omavaheline fülogeneetiline seos – seniste uurimistulemuste põhjal oli välja pakutud kaks hüpoteesi (joonis 2A ja 2B), kuid polnud selge, milline neist võiks olla õige, kuna statistilised toetused kõigile olulistele fülogeneetilistele sõlmedele polnud piisavalt usaldusväärsed. Antud töö tulemusena näitasime aga selgelt (kõik neli kasutatud fülogeneetilist meetodit andsid samaväärse topoloogiaga fülogeneesipuu ning kõik olulised sõlmed olid väga kõrge statistilise toetusega, mis viitab tulemuse usaldusväärsusele), et õigeks osutus hüpotees, mis on toodud joonisel 2A. Et näha detailsemalt kõigi mitokondriaalsesse klaadi G5-G10 kuuluvate genotüübigruppide omavahelisi fülogeneetilisi suhteid, konstrueerisime parsimooniaprintsiibist lähtuvalt geneetilise võrgustiku (joonis 2D). Antud joonis toob selgelt esile kõigi genotüübigruppide omavahelised geneetilised kaugused ja näitab, et genotüübigrupp G10 on evolutsiooniliselt kõige lähem genotüübigrupiga G6/7.

Detailsema ülevaate eelpoolkirjeldatud tulemustest leiate artiklist Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of “genotypes” G5-G10. *Parasitology*, 135: 647-654 (vt. lisa 2).



Joonis 2

A ja B. Kaks seni teaduskirjanduses püstitatud alternatiivset hüpoteesi *Echinococcus granulosus* mitokondriaalse klaadi G5-G10 kohta

C - Bayesi fülogramm *E. granulosus* klaadist G5-G10, mis põhineb kolme mtDNA geeni (*atp6*, *nad1* ja *cox1*, kokku 1028 aluspaari) põhjal. Liiki *E. multilocularis* kasutati välisgrupina. Kasutati nelja erinevat fülogeneetilist meetodit, ülalpool joont on statistilised toetused: Bayesi meetod (BI) ja suurima tõepära meetod (ML) ning allpool joont säästuprintsiibi meetod (MP) ja lähinaabri (NJ) meetod. Antud töö kontekstis olulised statistilised toetused on tumendatud kirjas Tärniga on näidatud Eestist tuvastatud genotüübid.

D – Fülogeneetiline mediaanvõrgustik *E. granulosus* klaadist G5-G10: genotüübigrupid nimed on toodud suures kirjas ja tumendatult

Siiani on perekonna *Echinococcus* fülogeneesi uurijad kasutanud peamiselt mitokondriaalseid geene, sh. ka mitokondri täisgenoomide järjestusi (näit. Nakao jt. 2007), mis aga tähendab, et tegelikult uuriti emaliinide fülogeneesi, eeldades, et see langeb kokku liikide ja perekonna fülogeneesiga. Samas tuumageenidel põhinev (annavad informatsiooni mõlema liini kohta tervikuna) fülogenees seni puudus. Leidsime, et lisaks mitokondriaalsetel geenijärjestustel põhinevale analüüsile on vaja leida ka fülogeneetiliseks analüüsiks sobivad tuumageenid, et teha kindlaks, kas meie poolt Eestist leitud genotüübigrupid G8 ja G10 on omavahel ka tuumagenoomi tasemel lahutunud nagu mtDNA järjestuste alusel sai näidatud või on hoopis fülogeneetiliselt segunenud. Samuti oli plaanis teha selgeks perekonna *Echinococcus* fülogenees tervikuna ka tuumageenide alusel. Töö käigus töötasime välja täiesti uued primerid 7 tuumageeni amplifitseerimiseks ja leidsime, et 5 geeni sobivad edasiseks analüüsiks (järjestuse kogupikkusega 5086bp): elongatsioonifaktor 1 (*efl*), transformeeriv kasvufaktor (*tgf*), thioredoksiini peroksüdaas (*th*), kalretikuliin (*cal*) ja ezriin-radiksiin-moesiin (*elp*). Kõigi geenide mõlemad DNA ahelad sekveneeriti tsüklisekveneerimis-meetodil, kasutades DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit'i (Amersham Biosciences) ja sekveneerimisproduktid lahutati geelelektroforeesil automaatsekvenaatoriga ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Saadud DNA järjestused joondati ja järjestuste homoloogia võrdlemisel tuvastati, et genotüübigrupid G8 ja G10 on küll omavahel eristatavad, kuid ei klasterdu selgelt eraldi nagu mitokondri DNA järjestuste puhul (mitokondri järjestuste korral paigutusid fülogeneesipuul G6/G7 hirvlaste genotüübigruppide G8 ja G10 vahele (Moks jt. 2008)). Antud tulemus viitab selgelt asjaolule, et G8 ja G10 ei ole tegelikult eraldiseisvad bioloogilised üksused nagu seni on arvatud. Lisaks Eesti genotüübigruppidele kaasasime analüüsi ka mujal maailmas esinevad genotüübigruppe ja analüüsisime ka nende tuumageenide järjestusi. Proovid kogusime rahvusvahelistelt koostööpartneritelt (vt. lisa 3 artikli Saarma jt. autorite loetelu ja institutsioone) ja kaasasime ka DNA järjestusi GenBankist nii, et fülogeneetilises analüüsis olid esindatud kõik perekonna *Echinococcus* esindajad (lisaks *E. granulosuse* genotüübigruppidele veel *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. oligarthrus* ja *E. vogeli*). Teostasime saadud järjestuste alusel põhjaliku fülogeneetilise analüüsi Bayesi meetodil (programmidega Beast ja MrBayes), seejuures jagasime andmed 11-ks erinevaks andmevariandiks ja arvutasime kõigile variantidele sobivad evolutsioonilised mutatsioonimudelid (programmiga Modeltest) ning rakendasime neid fülogeneetilises analüüsis (detailsema metoodika kirjeldust vt. lisa 3 artikli metoodika osast). Analüüsil saadud fülogeneetiline puu erines oluliselt varem publitseeritud perekonna *Echinococcus* fülogeneetilistest puudest (joonis 3). Peamised erinevused võrreldes varem publitseeritud ja mitokondriaalse DNA järjestustel põhinevast fülogeneesipuust olid: 1) *E. multilocularis* paigutus tuumageenide puul basaalse taksonina (mitokondri puul oli selleks *E. vogeli*), 2) kõik *E. granulosus* genotüübigrupid paiknesid tuumageenide puul monofüleetilise rühmana (mitokondri puul paigutusid *E. granulosus* genotüübigruppide vahele *E. multilocularis* ja *E. shiquicus*), 3) *E. granulosus* genotüübigrupid G8 ja G10 (need, mis ka Eestis esindatud on) moodustasid ühtse kogumi (mitokondri järjestuste analüüsil paigutusid nende vahele G6 ja G7). Kuna tuumageenide põhjal tehtud perekonna

Echinococcus fülogeneetiline puu erines oluliselt mitokondri järjestuste põhjal varem saadust, siis tekkis kohe ka ilmne küsimus – kumb neist siis kirjeldab adekvaatsemalt perekonna *Echinococcus* fülogeneesi? Leidsime, et selleks on tuumageenid ja selgitasime, et peamine põhjus peitub tõsiasjas, et mitokondri DNA pärandub vaid emaliini pidi ja esindab seega üksnes emaliinide fülogeneesi, samas kui tuumageenid esindavad liigi fülogeneesi tervikuna (pikemat selgitust vt. lisa 3 artikli tulemuste ja arutelu osadest). Esitasime perekonna *Echinococcus* uue fülogeneesipuu (joonis 3) koos taksonoomilise kokkuvõttega, kus tõime nii oma tööle kui hiljuti avaldatud taksonoomilisele ülevaatele (Thompon 2008) tuginedes välja, millised *E. granulosus* genotüübigrupid väärisksid omaette liigi staatust: genotüübigrupid G1, G2 ja G3 võiksid jääda staatusesse *E. granulosus sensu stricto*, G4 – *E. equinus*, G5 – *E. ortleppi*, G6, G7 ja G9 – *E. intermedius*, G8 ja G10 – *E. canadensis* (täpsema taksonoomilise ülevaate leiate jällegi lisa 3 artiklist). Käesoleva töö tulemusel õnnestus seega näidata, et Eestis esinevate *E. granulosus* genotüüpide G8 ja G10 vahel esineb rekombinatsioon ning et neid tuleks käsitleda kui ühtset bioloogilist üksust *E. canadensis*. Lisaks näitasime, et perekonna *Echinococcus* fülogenees on hoopis teistsugune kui varem mitokondri järjestuste põhjal oli arvatud. Kui varasem mitokondri järjestuste põhjal saadud fülogeneesipuu oli teravas vastuolus perekonna *Echinococcus* nn. klassikalise taksonoomiaga (vt. Thompson 2008), siis tuumageenidel põhinev fülogenees on sellega kenasti kooskõlas, lisades muidugi väga mitmeid uusi täiendavaid aspekte, millised olid varem teadmata (näiteks perek. *Echinococcus* esindajate ja *E. granulosus* genotüübigruppide omavahelised detailsed evolutsioonilised suhted).

Kasutatud kirjandus

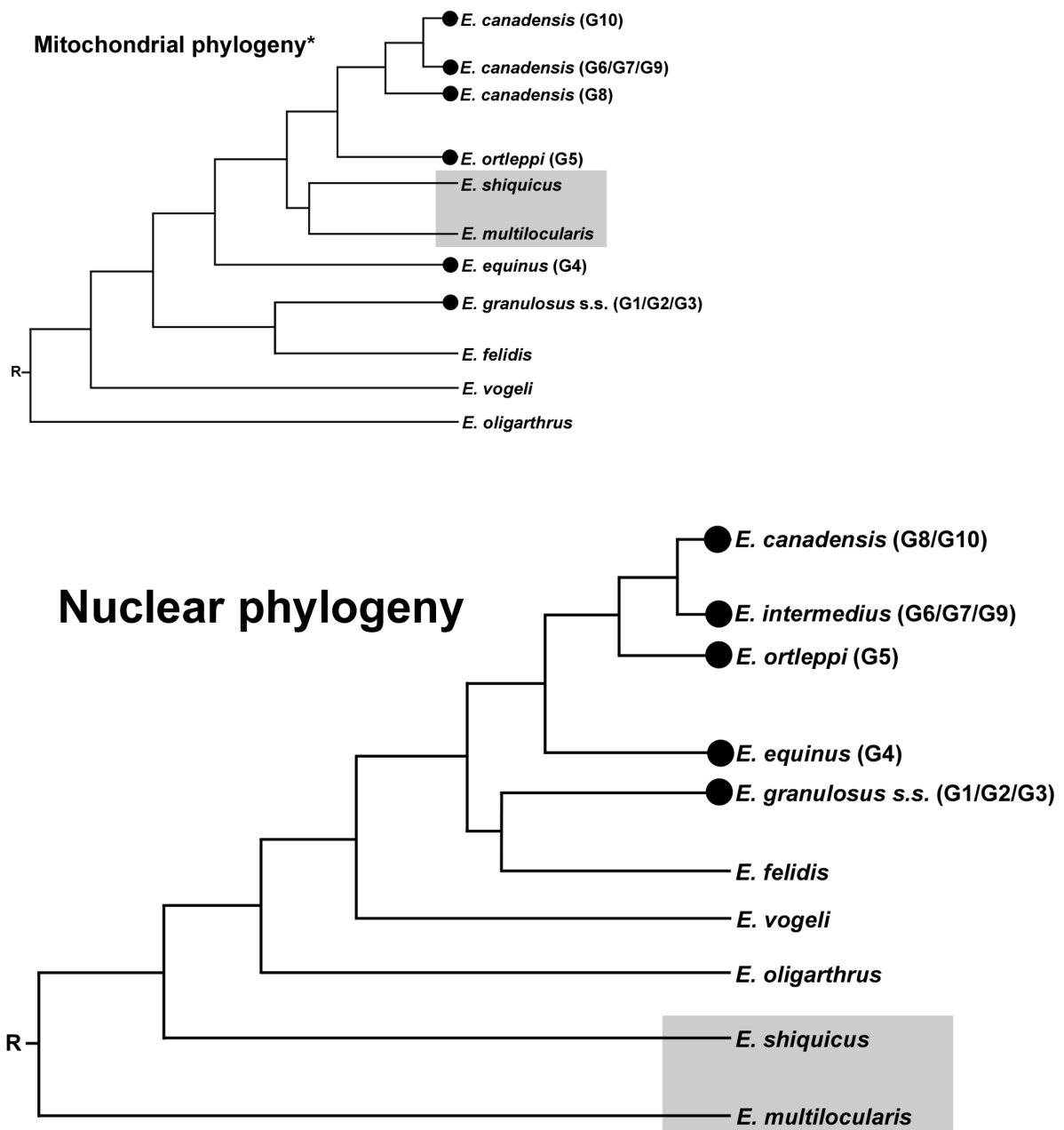
Lavikainen, A., Lehtinen, M. J., Laaksonen, S., Ågren, E., Oksanen, A. and Meri, S. (2006). Molecular characterisation of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology* 133, 565-570.

Lesinš, K. L. (1955). *Analysis of helminth fauna and seasonal dynamics of helminthosis of farm animals in South-East of ESSR*. Candidate Dissertation, Tartu – Moscow (vene keeles)

Nakao, M., McManus, D. P., Schantz, P. M., Craig, P. S. and Ito, A. (2007). A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134, 713-722.

Thompson, R. C. A. (2008). The taxonomy, phylogeny and transmission of *Echinococcus*. *Experimental Parasitology* 119, 439-446.

Thompson, R. C. A., Boxell, A. C., Ralston, B. J., Constantine, C. C., Hobbs, R. P., Shury, T. and Olson, M. E. (2006). Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. *Parasitology* 132, 439-447.



Joonis 3

Perekonna *Echinococcus* fülogenees: ülal varasem mitokondri geenijärjestustel põhinev fülogeneesipuu ja all käesoleva projekti käigus tuumageenide alsuel saadud fülogeneesipuu. Hallis kastis on liikide *E. multilocularis* ja *E. shiquicus* positsioonid ning mustade ringidega on tähistatud *E. granulosus* eri genotüüpide positsioonid (osa varasematest *E. granulosus* genotüüpidest on nimetatud ümber uuteks liikideks)

Järeldused ning eeldatav põllumajanduslik ja majanduslik efekt

Projekti käigus läbiviidud tegevused ja tulemused olid kõik kooskõlas algselt püstitatud eesmärgiga. Projekti käigus viidi läbi rahvusvahelisele teadustasemele vastav analüüs nii inimesele kui loomadele äärmiselt ohtliku parasiidi *Echinococcus granulosus* leviku ja genotüüpide identiteedi kohta Eestis. Kokku analüüsiti 3550 uluksõralist (põdrad, metskitsed, metssead, punahirved) ning parasiidi *E. granulosus* tsüste leiti 16. põdralt - seega 0.8% uuritud põtradest olid nakatunud. Nakatunud põdrad olid pärit Harju-, Lääne-, Pärnu- ja Raplamaalt. Tegemist on esimeste parasiidi *E. granulosus* leidudega sõralistel peale 1950ndaid aastaid. Tsüstidest eraldati genoomne DNA ja fülogeneetilise uuringu tarvis määrati kolme mitokondriaalse geeni DNA järjestused (igast tsüstist 1028 aluspaari). Mitokondri geenijärjestuste fülogeneetilisel analüüsil selgus, et Eestis esineb kaks uut genotüüpi E8 ja E10, mis kuuluvad vastavalt genotüübigruppidesse G8 ja G10. Seejuures oli tuvastatud genotüüp E8 esimene genotüübigruppi G8 kuuluv leid terves Euraasias. Määrati ka leitud genotüüpide fülogeneetiline positsioon ja tehti kindlaks mitokondriaalse klaadi G5-G10 omavahelised fülogeneetilised suhted. Et siiani olid perekonna *Echinococcus* fülogeneesi uurijad kasutanud peamiselt mitokondriaalseid geene, mis aga tähendab, et tegelikult uuriti vaid emaliinide fülogeneesi, eeldades, et see langeb kokku liigi fülogeneesiga. Samas tuumageenide, mis annavad informatsiooni liigi kohta tervikuna, fülogenees seni puudus. Peapõhjus selleks oli sobivate tuumageenide jaoks praimerite puudumine, mille väljatöötamine on üsna raske ülesanne. Siiski leidsime, et lisaks mitokondriaalsetel geenijärjestustel põhinevale analüüsile on vaja kindlasti leida ka fülogeneetiliseks analüüsiks sobivad tuumageenid. Projekti käigus töötasimegi välja praimerid viie analüüsiks sobiliku tuumageeni tarvis ja näitasime, et varasem mitokondri geenijärjestustel põhinev perekonna *Echinococcus* fülogenees ei peegelda tegelikku perekonna *Echinococcus* evolutsiooni ja esitasime uue tuumageenidel põhineva fülogeneesi ning põhjendasime, miks tuumageenide fülogenees näitab adekvaatsemalt evolutsioonilisi seoseid. Kõik käesoleva projekti käigus saadud tulemused nii liigi *Echinococcus granulosus* tüvede esinemise kohta eri loomaliikidel Eestis kui ka ehinokokkide perekonna tuumageenide alusel saadud uus fülogeneesipuu on määrava tähtsusega mõistmaks selliste ülimalt eluohtlike parasiitide (nii mets kui koduloomadele, aga ka inimestele) nagu seda on perekonna *Echinococcus* esindajad epidemioloogilist potentsiaali, transmissiooni erinevate peremeesorganismide vahel, patogeneesi ja evolutsiooni. Olulisteks lisaväärtusteks võiks lugeda: a) projekt oli interdistsiplinaarne, ühendades klassikalise parasitoloogia moodsa fülogeneetilise analüüsiga; b) projekt oli rahvusvaheline, ühendades endas paljude maade teadusrühmi; c) projekt oli uudne – selle käigus töötati esmakordselt välja rida fülogeneetilisteks analüüsideks sobivaid tuumageenide markereid (varasemad analüüsid põhinesid suuresti mitokondri geenide järjestustel) ja näidati nende abil, et perekonna *Echinococcus* fülogenees on hoopis teistsugune kui varem mitokondri järjestuste põhjal oli arvatud; d) projekti käigus saadud tulemuste põhjal valmis ja kaitsti Tartu Ülikoolis 2008. a. doktoritöö (Epp Moks); e) projekti tulemuste põhjal on avaldatud kaks artiklit (üks neist väga tunnustatud rahvusvahelises teadusajakirjas *Parasitology*).

Projekti tulemused annavad olulist teavet Eestis esinevate *E. granulosus* genotüüpide, nende peremeesorganismide, geograafilise leviku ja fülogeneetiliste seoste kohta teiste *E. granulosus* genotüübigruppidega üle maailma. Ajavahemikul, mil projekti läbi viidi, ei leitud ehhinokokke üheltki koduloomalt, mis aga ei tähenda, et see oleks lõplik tulemus. On vägagi tõenäoline, et liike *E. granulosus* ja võimalik, et ka *E. multilocularis* esineb kodukoortel, eriti maapiirkondades elavatel koortel, kes saavad vabalt ringi liikuda ja pääsevad sööma metsas lõpnud loomakorjuseid (ka jahimehed söödavad lastud metsloomade sisikondi sageli koortele) ja võivad seega kergesti ehhinokokkidega nakatuda. See omakorda kujutab potentsiaalset ohtu teistele koduloomadele (eelkõige sigadele, lehmadele ja lammastele) kui inimestele. Ilmekaks näiteks on väga värske uuring, kus tuvastati, et Leedus oli 13.2% taludes ja 4.1% suurfarmides peetavatest sigadest olid ehhinokokkidega nakatunud (R. Bružinskaitė, M. Šarkūnas, P.R. Torgerson, A. Mathis, P. Deplazes Echinococcosis in pigs, intestinal infection with *Echinococcus* spp. in dogs in southwestern Lithuania. *Veterinary Parasitology, In Press, Accepted Manuscript, Available online 17 November 2008*). Arvatavasti pole meilgi olukord palju teistsugune kui Leedus. Viimastel aastatel on ehhinokokkoos jõudnud ka inimesteni - Eestis inimestel registreeritud neli ehhinokokkidega nakatumise juhtu.

Ehchinokokkoosi uuringud ei piirdu aga vaid *E. granulosus*'ega (mis põhjustab tsüstilist ehhinokokkoosi). Oma varasemates uurimustes näitasime ka *E. multilocularis*'e (mis põhjustab alveolaarset ehhinokokkoosi) esinemist rebastel Eestis (Moks, E., Saarma, U. and Valdmann, H. 2005. *Echinococcus multilocularis* in Estonia. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1973-1974), kuid tegemist oli nõ. pilootprojektiga, kus läbi sai vaadatud vaid 17 rebast, mida on ilmselgelt liiga vähe, et öelda, kui suur osa rebaste populatsioonist Eestis on selle parasiidiga nakatunud ja milline on nakatunud rebaste geograafiline jaotus Eestis. Peale marutaudivastase vaksineerimise edukat käivitumist on meil aga rebaste (ja ka kährikkoorte) arvukus tõusuteel, nagu see on juhtunud ka mujal Euroopas, aga arvukuse tõus sunnib osa rebasteid liikuma järjest lähemale inimasustele ja ühes sellega suureneb nii koduloomade kui inimeste nakatumise oht.

Seega tuleks edaspidi uurimistöödel keskenduda ehhinokokkpaelusside monitooringutele koortel, rebastel, kährikkoortel ja koduloomadel ja teostada riskianalüüs, nagu seda on teinud paljud Euroopa riigid, et saada põhjalik ülevaade hetkeolukorrast ja teha kava, et vältida edasist ohtu nii koduloomadele kui inimestele. Et ehhinokokkide näol on tegemist potentsiaalselt väga suure ohuga kogu Euroopas (on leidnud ka väga laia meediakajastust paljudes Euroopa riikides), sh. ka Eestis, siis oleks edasiste uuringute ja riskianalüüsi teostamine hädatarvilik. Sõltuvalt edasiste uuringute tulemustest saaks otsustada, kas on vajalik algatada vastavaid kontrollprogramme ehhinokokkoosi vältimiseks või mitte. Käesoleval projektil on kindlasti oluline mõju nii avalikule sektorile kui hetkel kui lähiaastatel (Euroopa kogemus on näidanud, et selliste uuringute mõju on aastakümnete pikkune ja kestab seni, kuni ehhinokokkoos saab nõ. välja juuritud). Projektis osalenud inimeste sulest või osalusel on ilmunud ehhinokokke puudutavad artiklid üle-eestilistes väljaannetes nagu Postimees, Roheline värav, Maaleht ja

plaanis on lähiajal kirjutada ka ülevaatlilik emakeelne populaarteaduslik artikkel ehinokokkoosist Eestis ja Euroopas. Projekti tulemustest lähtuvalt on võimalik tõsta inimeste teadlikkust ehinokokkoosist kui väga ohtlikust haigusest Eestis ja Euroopas, eriti aitab see tõsta veterinaaride ja arstide teadlikkust ning võimaldab nõustada talunikest loomapidajaid ja toiduainesektoris töötavaid spetsialiste.

Projektist kasusaajad

Eesti loomakasvatajad, toiduainesektor, veterinaarid, meditsiinitöötajad, haridus-, keskkonna- ja jahindusspetsialistid ning talunikud.

11. LÜHIKOKKUVÕTE (*Summary* - kokkuvõte inglise keeles kuni 2 lk):

Tapeworm *Echinococcus granulosus* is a major public health concern, causing life-threatening zoonotic parasitic disease called cystic echinococcosis in most parts of the World. The parasite propagates in a biphasic manner and its intermediate hosts, who suffer from cysts of the parasite in liver, lungs and other organ systems, include both wild and domestic ungulates, but also humans. Definitive hosts of the parasite are primarily wild and domestic canids, including grey wolf (*Canis lupus*) and dog. Based on molecular genetic analyses of mitochondrial genes, ten different genotype groups G1-G10 (or strains as often written earlier) have been proposed for *E. granulosus*.

The goal of the project was to analyse distribution and strains of *E. granulosus* in Estonia and to evaluate the phylogenetic position of these genotype groups (strains)

In this study we investigated the presence of the tapeworm *Echinococcus granulosus* in wild ungulates in Estonia, determined genotypes of *E. granulosus* isolates and used these genotypes together with those available in a public database to infer the phylogeny of the *E. granulosus* mitochondrial clade G5-G10. While 0.8% of investigated moose (*Alces alces*, 2038 specimens were examined) were found to be infected with *E. granulosus*, the parasite was not detected in other wild ungulates, such as roe deer (*Capreolus capreolus*, 1044 individuals were examined), wild boar (*Sus scrofa*, 442 individuals were examined) and red deer (*Cervus elaphus*, 26 individuals examined). Altogether, 3550 wild bovids were examined. During this project, no domestic animals were reported to be infected with *Echinococcus*. Genetic analysis, based on sequences of concatenated mitochondrial *atp6*, *nad1* and *cox1* genes (1028bp in total), revealed that two new *E. granulosus* genotypes, namely E8 (11 samples, 69%) and E10 (5 samples, 31%), belonging to genotype groups G8 and G10 respectively, are present in Estonia. This is the first record from Eurasia of an *E. granulosus* genotype belonging to genotype group G8. Phylogenetic analysis, using four different methods, demonstrated with considerable statistical support that genotype group G6/7 forms a subclade together with G10, while G8 is a sister group for G6/7-G10. Verification of the genotype groups (strains) of *E. granulosus* in Estonia helps to estimate the potential risk for humans, domestic and game animals. The results are important for human and animal welfare.

The taxonomic status of *Echinococcus*, an important zoonotic cestode genus, has remained controversial, despite numerous attempts to revise it. Although mitochondrial DNA (mtDNA) has been the source of markers of choice for reconstructing the phylogeny of the genus, results derived from mtDNA have led to

significant inconsistencies with earlier species classifications based on phenotypic analysis. Here, we used nuclear DNA markers to test the phylogenetic relationships of members of the genus *Echinococcus*. The analysis of sequence data for five nuclear genes revealed a significantly different phylogeny for *Echinococcus* from that proposed on the basis of mitochondrial DNA sequence data, but was in agreement with earlier species classifications. The most notable results from the nuclear phylogeny were: (1) *E. multilocularis* was placed as basal taxon, (2) all genotypes of *Echinococcus granulosus* grouped as a monophyletic entity, and (3) genotypes G8 and G10 clustered together. We conclude that the analysis of nuclear DNA data provides a more reliable means of inferring phylogenetic relationships within *Echinococcus* than mtDNA and suggest that mtDNA should not be used as the sole source of markers in future studies where the goal is to reconstruct a phylogeny that does not only reflect a maternal lineage, but aims to describe the evolutionary history at species level or higher.

Further details can be found from two enclosed manuscripts that are based on current study:

- 1) Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of “genotypes” G5-G10. *Parasitology*, 135: 647-654
- 2) Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, Gonzalez LM, Ferrer E, Garate T, Rinaldi L, Maravilla P. 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus* based on nuclear data challenges relationships based on mitochondrial evidence. *Parasitology*, in press (MS ID: PAR-2008-0243.R2, please find enclosed an e-mail from the editor of *Parasitology* Dr. R. Gasser)

12. PROJEKTIGA HAAKUVAD TEADUSTEEMAD, GRANDID, DOKTORI- JA MAGISTRITÖÖD, JÄRELDOKTORITE UURIMISTEEMAD, LEPINGUD, PATENDID:

Projektiga seotud teadusteemad:

1. Aastal 2007, sihtfinantseeritav teadusteema „Rakulised, arengulised ja evolutsioonilised tegurid organismide ontogeneesis ja loomastiku bioloogilise mitmekesisuse kujunemisel” (teema juht. prof. A. Karis)
2. Aastal 2008, sihtfinantseeritav teadusteema „Fülogeneetilised ja võrdlev-ökoloogilised uuringud loomadel” (teema juht. prof. T. Tammaru)
3. Suurkiskjate ja nende parasiitide fülogenees ning fülogeograafia” (ETF grant 7040, U. Saarma)

Projektiga seotud doktori- ja magistritööd:

1. Epp Moks kaitses Tartu Ülikoolis 31.9.2008 doktoritöö „Tapeworm parasites *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in Estonia: phylogenetic relationships and occurrence in wild carnivores and ungulates “
2. Inga Jõgisalul valmib magistritöö „Uluksöraliste parasitofauna Eestis“

Projektiga seotud lepingud:

Uluksöraliste parasitofauna koosseis. Lepinguline töö (Inga Jõgisalu)

13. KOOSTÖÖ (lepingud, konverentside korraldamine, töötamine välisriikides jne): Rahvusvaheline koostöö paljude teadusgruppidega üle maailma: Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, Gonzalez LM, Ferrer E, Garate T, Rinaldi L, Maravilla P (nende teadusasutusi vt. lisa 3, artiklist Saarma jt. 2009)

14. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID: oleme antud projekti tulemuste põhjal avaldanud kaks publikatsiooni rahvusvaheliselt tunnustatud teadusajakirjas Parasitology (Cambridge University Press):

1) Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of “genotypes” G5-G10. Parasitology, 135: 647-654

2) Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, Gonzalez LM, Ferrer E, Garate T, Rinaldi L, Maravilla P. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus* based on nuclear data challenges relationships based on mitochondrial evidence. Vastu võetud avaldamiseks ajakirjas Parasitology 12.11.2008. MS ID: PAR-2008-0243.R2 (kaasas ka e-mail ajakirja Parasitology toimetaja R. Gasser'i kinnitusega, et artikkel on avaldamiseks vastu võetud)

Aruande juurde kuuluvad järgmised lisad:

1. Lisa 1 – Kokkuvõte 2007-2008 läbiviidud projekti kuludest

2. Lisa 2 – Projekti tulemuste põhjal valminud teaduspublikatsioon nr 1: Moks E, Jõgisalu I, Valdmann H, Saarma U. 2008. First report of *Echinococcus granulosus* G8 in Eurasia and a reappraisal of the phylogenetic relationships of “genotypes” G5-G10. Parasitology, 135: 647-654

3. Lisa 3 – Projekti tulemuste põhjal valminud teaduspublikatsioon nr 2: Saarma U, Jõgisalu I, Moks E, Varcasia A, Lavikainen A, Oksanen A, Simsek S, Andresiuk V, Denegri G, Gonzalez LM, Ferrer E, Garate T, Rinaldi L, Maravilla P. 2009. A novel phylogeny for the genus *Echinococcus* based on nuclear data challenges relationships based on mitochondrial evidence. Vastu võetud avaldamiseks ajakirjas Parasitology (MS ID: PAR-2008-0243.R2, kaasas ka e-mail ajakirja Parasitology toimetaja R. Gasser'i kinnitusega, et artikkel on avaldamiseks vastu võetud)

| | | |
|--|-----------------|-------------------------------|
| 15. Teema juht (ees- ja perekonnanimi): Urmas Saarma | Allkiri: | Kuupäev: 03.12.2008 |
| Tellijä esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (ees- ja perekonnanimi): Kristjan Haller | Allkiri: | Kuupäev: |

Täidab põllumajandusteaduste nõukogu

| | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| Nõukogu esimees: | Allkiri: | Kuupäev: |
|-------------------------|-----------------|-----------------|

Põllumajandusteaduste nõukogu hinnang tehtud tööle:

⁵ Projekti lõpparuande täitmise juhend on kättesaadav Põllumajandusministeeriumi koduleheküljel <http://www.agri.ee/>