



**УНИВЕРЗИТЕТ „КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО  
СКОПЈЕ**

**ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА - СКОПЈЕ**

**Љубица Божидар Рашиќ**

**ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЕХИНОКОКОЗАТА КАЈ ДОМАШНИТЕ  
ПРЕЖИВАРИ ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

**Докторски труд**

**Скопје, 2026**



УНИВЕРЗИТЕТ „КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО  
СКОПЈЕ



ФАКУЛТЕТ ЗА ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА - СКОПЈЕ

Љубица Божидар Рашиќ

ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЕХИНОКОКОЗАТА КАЈ ДОМАШНИТЕ  
ПРЕЖИВАРИ ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА

Докторски труд

Скопје, 2026

Докторанд:

**ЉУБИЦА БОЖИДАР РАШИЌ**

Тема:

**ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЕХИНОКОКОЗАТА КАЈ ДОМАШНИТЕ ПРЕЖИВАРИ  
ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА**

Ментор:

Проф. д-р ЈОВАНА СТЕФАНОВСКА

Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Комисија за одбрана:

Проф. д-р АЛЕКСАНДАР ЦВЕТКОВИЌ (претседател)

Факултет за ветеринарна медицина – Скопје

Проф. д-р ИГОР ЦАЦОВСКИ

Факултет за ветеринарна медицина – Скопје (член)

Проф. д-р КУРТЕШ ШЕРИФИ

Факултет за земјоделство и ветеринарство – Приштина, Р. Косово (член)

Проф. д-р МИРКО ПРОДАНОВ

Факултет за ветеринарна медицина – Скопје (член)

Научна област:

**ПАРАЗИТНИ БОЛЕСТИ**

Датум на одбрана:

**Љубица Божидар Рашиќ**

## ЕПИДЕМИОЛОГИЈА НА ЕХИНОКОКОЗАТА КАЈ ДОМАШНИТЕ ПРЕЖИВАРИ ВО РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА

-Апстракт -

Цистичната ехинококоза е значајна паразитна зооноза со ветеринарно, јавно- здравствено и економско значење. Целта на ова истражување беше епидемиолошка проценка на ехинококозата кај домашните преживари во Република Северна Македонија преку анализа на кланично-детектираната преваленца, факторите поврзани со инфекцијата, локализацијата и фертилноста на цистите и молекуларната идентификација на циркулирачките генотипови. Во периодот 2020–2022 година беа прегледани 1.344 животни (938 овци и 406 говеда) со потекло од сите осум статистички региони, заклани во регистрирани кланици. Фертилноста беше микроскопски проценета кај 294 цисти, а молекуларната карактеризација беше направена на 69 изолати со анализа на митохондрискиот ген *cox1*. Цистичната ехинококоза беше широко распространета во испитуваната кланична популација, со значително повисока преваленца кај овците (91,6%) отколку кај говедата (52,5%) и со изразена регионална и временска хетерогеност. Кај овците доминираше комбинирана локализација во црниот дроб и белите дробови, а фертилноста на цистите беше значително повисока во споредба со говедата (83,2% и 20,2%, соодветно). Молекуларната анализа покажа доминација на генотипот G1 (60,9%) во однос на G3 (39,1%) на *Echinococcus granulosus sensu stricto*, при што кај овците G1 беше почест (62,3%) од G3 (37,7%), додека кај говедата двата генотипа беа подеднакво застапени. Кај генотипот G3, 82,6% од изолатите од овци беа фертилни. Комбинацијата од висока преваленца, висока фертилност кај овците и G1/G3 профил укажува на активен и одржлив домашен циклус куче–преживар со зоонозно значење. Резултатите обезбедуваат научна основа за насочен ветеринарен надзор, контролирано постапување со инфицирани органи и интегрирани контролни мерки во рамки на пристапот Едно здравје.

**Клучни зборови:** цистична ехинококоза, овци, говеда, *cox1*, Едно здравје

**Ljubica Bozhidar Rashikj**

## **EPIDEMIOLOGY OF ECHINOCOCCOSIS IN DOMESTIC RUMINANTS IN THE REPUBLIC OF NORTH MACEDONIA**

-Abstract-

Cystic echinococcosis is an important parasitic zoonosis of veterinary, public health and economic significance. This study aimed to provide an epidemiological assessment of echinococcosis in domestic ruminants in the Republic of North Macedonia through analysis of abattoir-detected prevalence, factors associated with infection, cyst localization and fertility, and molecular identification of the circulating genotypes. During the period 2020–2022, a total of 1,344 animals, including 938 sheep and 406 cattle, originating from all eight statistical regions and slaughtered in registered abattoirs, were examined. Cyst fertility was assessed microscopically in 294 cysts, while molecular characterization was performed on 69 isolates by analysis of the mitochondrial *cox1* gene. Cystic echinococcosis was widely distributed in the examined abattoir population, with a significantly higher prevalence in sheep than in cattle, 91.6% and 52.5%, respectively, and with marked regional and temporal heterogeneity. In sheep, combined localization in the liver and lungs predominated, while cyst fertility was significantly higher than in cattle, 83.2% and 20.2%, respectively. Molecular analysis showed the predominance of genotype G1, 60.9%, over G3, 39.1%, within *Echinococcus granulosus sensu stricto*. In sheep, G1 was more frequent, 62.3%, than G3, 37.7%, whereas in cattle the two genotypes were equally represented. Among G3 isolates from sheep, 82.6% were fertile. The combination of high prevalence, high cyst fertility in sheep, and the G1/G3 profile indicates an active and sustainable domestic dog–ruminant cycle of zoonotic significance. The results provide a scientific basis for targeted veterinary surveillance, controlled management of infected organs, and integrated control measures within the One Health approach.

**Keywords:** cystic echinococcosis, sheep, cattle, *cox1*, One Health

Благодарност –

Изјавувам дека докторскиот труд е оригинален труд што го имам изработено самостојно.

Своерачен потпис на докторандот  
(на електронската верзија потпис и скратеницата с.р.)

(на електронската верзија на докторски труд)

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со  
отпечатениот докторски труд.

Потпис на авторот, с.р

## СОДРЖИНА

Апстракт.....	3
Abstract .....	4
Благодарност.....	5
ЛИСТА НА КРАТЕНКИ .....	9
ЛИСТА НА ТАБЕЛИ И СЛИКИ .....	10
Изјава за оригиналност на докторскиот труд.....	5
Изјава за идентичност на електронската и печатената верзија.....	5
1. Вовед.....	12
1.1. Научна и практична оправданост .....	12
1.2. Работни хипотези .....	13
1.3. Научен придонес на дисертацијата.....	13
2. Преглед на литература .....	13
2.1. Историја.....	13
2.2. Биологија и циклус на пренесување .....	14
2.3. Глобална и регионална епидемиологија.....	17
2.4. Фактори поврзани со преваленца .....	18
2.4.1. Вид на домаќин .....	18
2.4.2. Возраст .....	13
2.4.3. Географска распределба .....	19
2.4.4. Локализација на цистите по органи .....	19
2.4.5. Фертилноста на цистите .....	12
2.4.6. Епидемиолошки пристап во анализа на преваленцата .....	20
2.5. Генотипска структура и молекуларна епидемиологија .....	20
2.6. Контрола и превенција .....	21
2.7. Дијагностички пристапи во ветеринарно-епидемиолошки студии кај преживари.....	22
2.7.1. Кланична инспекција (постмортем) и методолошки импликации .....	22
2.7.2. Проценка на фертилноста/витаљност како епидемиолошки индикатор .....	22
2.7.3. Молекуларна потврда и генотипизација.....	23
2.7.4. Дијагностички пристап кај меѓудомаќини.....	23
3. Цел и задачи на истражувањето .....	23
3.1. Цел на истражувањето .....	23
3.2. Истражувачки задачи .....	24
4. Материјал и методи .....	24
4.1. Дизајн на студијата .....	24
4.2. Испитуван материјал .....	24
4.2.1. Испитувана популација и примерок .....	24
4.2.2. Паразитолошка анализа и проценка на фертилноста .....	26
4.2.3. Примероци за молекуларна анализа .....	31
4.2.4. Екстракција на ДНК .....	31
4.2.5. PCR амплификација.....	32
4.2.6. Гел – електрофореза и верификација на PCR резултатите .....	33
4.2.7. Прочистување и секвенционирање .....	33
4.2.8. Биоинформатичка и филогенетска анализа .....	34
4.2.9. Генотипска идентификација и применет протокол.....	35
4.3. Статистичка анализа.....	35
4.3.1. Подготовка на податоците .....	35

4.3.2. Дескриптивна статистика и проценка на преваленца .....	36
4.3.3. Анализа на временски тренд.....	36
4.3.4. Анализа на преваленца по региони.....	36
4.3.5. Анализа на локализацијата на цистите по органи .....	36
4.3.6. Анализа на бројноста на цистите .....	36
4.3.7. Анализа на фертилноста на цистите .....	36
4.3.8. Анализа на распределбата на генотипови .....	36
4.3.9. Мултиваријабилна анализа .....	37
4.3.10. Ниво на значајност и софтвер.....	37
4.3.11. Репрезентативност и ограничувања на примерокот.....	37
4.3.12. Големина на примерокот и статистичко оправдување .....	37
4.3.13. Етички аспекти .....	37
5. Резултати .....	13
5.1. Резултати од кланичниот преглед и паразитолошката анализа .....	38
5.1.1. Вкупна преваленца .....	36
5.1.2. Преваленца според старосни категории кај говедата.....	38
5.1.3. Преваленца по години (2020–2022) .....	39
5.1.4. Преваленца по региони .....	36
5.1.5. Локализација на цистите по органи .....	19
5.1.6. Бројност на цисти.....	41
5.1.7. Фертилност на цистите .....	12
5.1.8. Мултиваријабилна анализа кај говедата.....	41
5.2. Резултати од молекуларната анализа.....	42
5.2.1. Генотипска распределба (G1/G3) .....	42
5.2.2. Резултати од секвенционирањето (cox 1).....	43
5.2.3. Подредување на секвенците и BLAST потврда.....	43
5.2.4. Филогенетска анализа .....	34
5.2.5. Географска распределба на генотиповите .....	44
5.2.6. GenBank пристапни броеви .....	45
6. Дискусија.....	45
6.1. Општа епидемиолошка слика и позиционирање на наодите .....	45
6.2. Преваленца според видот на домаќинот: биолошка основа и споредливост .....	47
6.3. Просторна хетерогеност и интерпретација на регионалните разлики .....	48
6.4. Локализација и бројност на цистите по органи: епидемиолошка интерпретација.....	50
6.5. Фертилност на цистите како показател за потенцијалот за одржување на циклусот .....	51
6.6. Генотипска структура и епидемиолошко значење на G1/G3 профилот кај овци и говеда .....	52
6.7. Мултиваријабилна анализа кај говедата: значењето на возраста, периодот и регионот.....	55
6.8. Кучињата како дефинитивни домаќини: европски искуства и празнини во локалниот контекст .....	56
6.9. Домашното колење и управувањето со органи како критична точка во одржувањето на циклусот.....	57
6.10. Јавно здравје и Едно здравје: значењето на G1/G3-доминацијата кај животните.....	58
6.11. Економски импакт во сточарството и скриени загуби .....	59
6.12. Ограничувања на студијата.....	60

6.13. Синтеза на наодите и идни насоки .....	61
Заклучоци .....	54
Прилози .....	64
Прилог 1. Репрезентативен електроферограм по двонасочно секвенционирање на соx1 .....	64
Прилог 2. Повеќекратно подредување на соx1 секвенците со референтни секвенци за G1 и G3 .....	64
Прилог 3. GenBank пристапни броеви на депонираните секвенци .....	64
Користена литература.....	
.....	66

## ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

AUC – површина под ROC кривата

aOR – прилагоден odds ratio

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – базни парови

CI – интервал на доверба

cox1 – митохондриски ген за cytochrome c oxidase subunit 1

DNA – дезоксирибонуклеинска киселина

EURL-P – European Union Reference Laboratory for Parasites

GenBank – јавна база на нуклеотидни секвенци

MAFFT – Multiple Alignment using Fast Fourier Transform

MEGA X – Molecular Evolutionary Genetics Analysis, верзија X

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OR – odds ratio

PCR – polymerase chain reaction

ROC – receiver operating characteristic

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

WOAH – World Organisation for Animal Health

## ЛИСТА НА ТАБЕЛИ И СЛИКИ

### Листа на табели

Табела 1. Моментално признаени видови од родот <i>Echinococcus</i> со нивните домаќини и географска распространетост.....	14
Табела 2: Распределба на прегледаните овци и говеда според статистички региони во Република Северна Македонија.....	25
Табела 3. Распределба на животните вклучени во паразитолошката анализа според локализацијата на цистите и видот на животно (n = 294) .....	27
Табела 5: Користени прајмери .....	33
Табела 6: Начин на идентификација на генотипот во рамки на комплексот <i>Echinococcus granulosus</i> s.l. (EURL-P MI-05) .....	35
Табела 7: Нуклеотиден состав на кодон 2 за разграничување на генотиповите G6 и G7 ( <i>Echinococcus canadensis</i> ).....	35
Табела 8. Вкупна преваленца на цистична ехинококоза кај овци и говеда (2020–2022) .....	38
Табела 9. Преваленца на цистична ехинококоза кај говедата според старосни категории.....	38
Табела 10. Распределба на цистична ехинококоза кај овци по години (2020–2022).....	39
Табела 11. Распределба на цистична ехинококоза кај говеда по години (2020–2022)....	39
Табела 12. Распределба на цистична ехинококоза кај овци по региони (2020–2022) .....	39
Табела 13. Распределба на цистична ехинококоза кај говеда по региони (2020–2022) ..	40
Табела 14. Локализација на цистите по органи кај позитивни животни .....	40
Табела 15. Фертилноста на цистите кај овци и говеда .....	41
Табела 16. Бинарна логистичка регресија за присуство на цисти кај говеда (N = 396) Прикажани се прилагодени odds ratios (aOR), 95% интервали на доверба и p-вредности за значајните предиктори во моделот. Референтни категории: период 2020 и Скопски регион. ....	41
Табела 17. Распределба на генотипови (G1/G3) во однос на видот на домаќинот и статусот на фертилноста (n = 69).....	42

### Листа на слики

Сл. 1: Циклус на пренесување на видовите од родот <i>Echinococcus</i> .....	16
Сл. 2: Глобална распространетост и ендемичност на ехинококозата.....	18
Сл. 3: Преглед на органи во кланица.....	25

Сл. 4: Формулар за податоци на испитаните животни .....	26
Сл. 5: Црн дроб со детектирани цисти .....	27
Сл. 6: Бели дробови со детектирани цисти.....	28
Сл. 7: Аспирација на течност од ехинококова циста од бел дроб.....	28
Сл. 8: Аспирација на течност од ехинококова циста од црн дроб .....	29
Сл. 9: Протосколекси од фертилна ехинококова циста.....	29
Сл. 10: Герминативен слој на ехинококова циста.....	30
Сл. 11: Формулар за преглед на органи со ехинококови цисти.....	31
Сл. 12: Верификација на PCR продуктите (cox1) со агарозна гел-електрофореза (1,5%). Прикажани се тестирани примероци, позитивна контрола (C+) и негативна контрола (C-), со молекуларски маркер L100. ....	33
Сл. 13: Шематски приказ на работниот тек на молекуларната анализа (екстракција на ДНК, PCR амплификација на cox1, верификација со гел-електрофореза, прочистување на ампликони, секвенционирање и филогенетска/генотипска анализа).....	34
Сл.13. ROC крива за логистичкиот модел за присуство на цисти кај говедата. Прикажана е дискриминативната способност на моделот, со AUC = 0,697.....	42
Сл. 14. Филогенетско стебло на cox1 секвенци (neighbor-joining, Jukes–Cantor, 1000 bootstrap). Македонските изолати се групираат во два кластера што одговараат на генотиповите G1 и G3 на <i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i> . ....	44
Сл. 22. Географска распределба на идентификуваните генотипови G1 и G3 кај <i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i> (n = 69). Маркерите го прикажуваат потеклото на примероците по општина и статистички регион. ....	45

## 1. Вовед

Ехинококозата е значајна паразитарна зооноза со ветеринарно, јавно-здравствено и економско значење. Светската здравствена организација ја вбројува меѓу занемарените зоонозни заболувања, а цистичната и алвеоларната ехинококоза имаат најголемо значење за здравјето на луѓето и животните (1–4).

Цистичната ехинококоза, предизвикана главно од *Echinococcus granulosus sensu lato* (s.l.), се одржува преку хетероксен циклус во кој кучињата и другите каниди се крајни домаќини, а домашните преживари се најважни меѓудомаќини. Човекот е случаен домаќин и не учествува во одржувањето на циклусот на пренесување (5–7).

Во ендемични сточарски средини, одржувањето и интензитетот на пренесувањето зависат од пристапот на кучињата до инфицирани органи и од степенот на контаминација на средината со паразитни јајца, на кои се изложени домашните преживари како меѓудомаќини. Во домашниот циклус на пренесување, овците имаат клучна улога не само поради честата инфекција, туку и поради поголемата веројатност за присуство на фертилни цисти. Говедата можат да покажат значајна кланична преваленца, но имаат поинаква епидемиолошка улога која треба да се проценува во контекст на локализацијата, бројноста и фертилноста на цистите.

Современата епидемиолошка проценка на цистичната ехинококоза не се заснова само на кланични наоди. Молекуларната карактеризација овозможува попрецизна идентификација на циркулирачките таксони и генотипови и подобро разбирање на циклусите на пренесување, домаќинскиот спектар и зоонозниот потенцијал на паразитот. Во таа смисла, анализата на митохондриски маркери, особено *cox1*, има важно место во современата молекуларна епидемиологија (8,9).

Балканскиот регион се смета за ендемско подрачје за цистична ехинококоза, со варијабилна преваленца кај домашните преживари и со потврдена циркулација на генотиповите G1 и G3 во повеќе соседни земји (10). Во Република Северна Македонија, податоците за болеста долго време беа ограничени. Првата систематска кланична студија покажа висока преваленца кај домашните преживари и значајна фертилност на цистите кај овците (11). Подоцнежната молекуларна анализа овозможи прва идентификација на генотиповите G1 и G3 кај преживарите во земјата, без поширока интеграција на молекуларните, паразитолошките и епидемиолошките наоди (12).

Поради тоа, потребна е интегрирана епидемиолошка проценка на цистичната ехинококоза кај домашните преживари во Република Северна Македонија, која ќе ги поврзе преваленцата, локализацијата по органи, фертилноста на цистите и генотипската структура на паразитот, со цел попрецизно разбирање на локалната динамика на пренесување и на улогата на различните домаќини во одржувањето на паразитот, во рамки на пристапот Едно здравје.

### 1.1. Научна и практична оправданост

Оправданоста на ова истражување произлегува од ограничените систематски податоци за епидемиологијата на цистичната ехинококоза кај домашните преживари во Република Северна Македонија. Иако болеста е одамна позната и претходно документирана, достапните локални наоди остануваат ограничени во однос на нивниот обем, географска

покриеност и можност за интегрирана интерпретација на паразитолошките и молекуларните показатели.

Во таков контекст, оваа дисертација има научна и практична оправданост затоа што ги разгледува преваленцата, локализацијата по органи, фертилноста на цистите и генотипската структура на *Echinococcus granulosus* s.l. во единствена аналитичка рамка. Со интеграција на паразитолошките, молекуларните и статистичките наоди, се создава поцврста основа за проценка на распространетоста на инфекцијата и на механизмите на нејзиното одржување кај домашните преживари.

Наодите имаат не само научно, туку и практично значење, бидејќи можат да придонесат за унапредување на надзорот, попрецизно насочување на контролните мерки и подобро поврзување на ветеринарните и јавно-здравствените аспекти на заболувањето во рамки на пристапот Едно здравје.

## **1.2. Работни хипотези**

Во ова истражување беа поставени следните работни хипотези:

1. Преваленцата на цистичната ехинококоза се разликува меѓу испитуваните видови домашни преживари.
2. Возраста на животните е поврзана со присуството на цистична ехинококоза.
3. Постојат регионални разлики во преваленцата на цистичната ехинококоза.
4. Локализацијата на цистите по органи е поврзана со нивната фертилност.
5. Во испитуваните изолати доминира *Echinococcus granulosus sensu stricto*, со застапеност на генотиповите G1 и G3 и доминација на G1.

## **1.2. Научен придонес на дисертацијата**

Научниот придонес на ова истражување произлегува од тоа што цистичната ехинококоза кај домашните преживари во Република Северна Македонија е анализирана во интегрирана рамка што ги поврзува преваленцата утврдена со кланичен преглед, локализацијата на цистите по органи, нивната фертилност и молекуларната идентификација на циркулирачките генотипови. За разлика од претходните локални извештаи, кои беа ограничени главно на дескриптивни кланични наоди или на мали молекуларни примероци, оваа студија овозможи заедничка епидемиолошка, паразитолошка и молекуларна интерпретација на инфекцијата. Добиените резултати придонесуваат за попрецизно разбирање на распространетоста на инфекцијата и на улогата на овците и говедата во одржувањето на домашниот циклус на пренесување на *Echinococcus granulosus* s.l. во Република Северна Македонија.

## **2. Преглед на литература**

### **2.1 Историја**

Првите описи на хидатидните цисти потекнуваат од античкиот период, кога тие биле препознавани како патолошки формации исполнети со течност, без јасна претстава за нивната паразитска природа (13,14). Во 17. век започнало постепено напуштање на хуморалните толкувања. Francesco Redi укажал на паразитската природа на цистичните форми, а подоцнежните набљудувања на Hartmann и Tyson дополнително придонеле за нивно препознавање како паразитски структури (13,14).

Важна пресвртница претставува 1801 година, кога Karl Rudolphi го вовел терминот *Echinococcus* и ја поставил основата на понатамошната таксономска класификација на паразитот (14). Во текот на 19. век, експерименталните истражувања овозможиле разјаснување на врската меѓу возрасната и ларвената форма на паразитот, со што бил поставен темелот за современото разбирање на неговиот животен циклус. Во истиот период започнало и разграничувањето меѓу цистичната и алвеоларната ехинококоза како различни биолошки и клинички ентитети (14).

Историскиот развој на знаењата за ехинококозата ја формирал основата за современото разбирање на таксономијата, животниот циклус и епидемиологијата на болеста. Подоцнежниот развој на паразитологијата и молекуларните методи овозможил попрецизна диференцијација на видовите и генотиповите и појасно дефинирање на циклусите на пренесување, што има директно значење за современиот епидемиолошки надзор и контрола на ехинококозата.

## 2.2 Биологија и циклус на пренесување

Родот *Echinococcus* припаѓа на фамилијата *Taeniidae* и опфаќа повеќе видови со различна биолошка адаптација и домаќински спектар, што се одразува во нивното епидемиолошко значење (15–17). Посебен научен интерес претставува комплексот *Echinococcus granulosus* s.l., кој вклучува повеќе генотипови и видови поврзани со цистичната ехинококоза кај животните и човекот (17–22). Современата класификација на родот *Echinococcus*, со наведените крајни и меѓудомаќини и географската распространетост, е прикажана во Табела 1.

**Табела 1.** Моментално признаени видови од родот *Echinococcus* со нивните домаќини и географска распространетост (17,23)

Вид	Крајни домаќини	Меѓудомаќини	Хумани случаи	Распространетост
<i>Echinococcus granulosus sensu stricto</i>	Домашно куче, волк, динго, чакал, други каниди	Овца, коза, говедо, свиња, камила, бивол, коњ, диви преживари, торбари итн.	Да	Космополитска
<i>Echinococcus canadensis</i>	Домашно куче, волк	Свиња, камила, елени (цервиди).	Да	Евроазија, Африка, Северна и Јужна Америка
<i>Echinococcus ortleppi</i>	Домашно куче	Говедо	Да	Евроазија, Африка

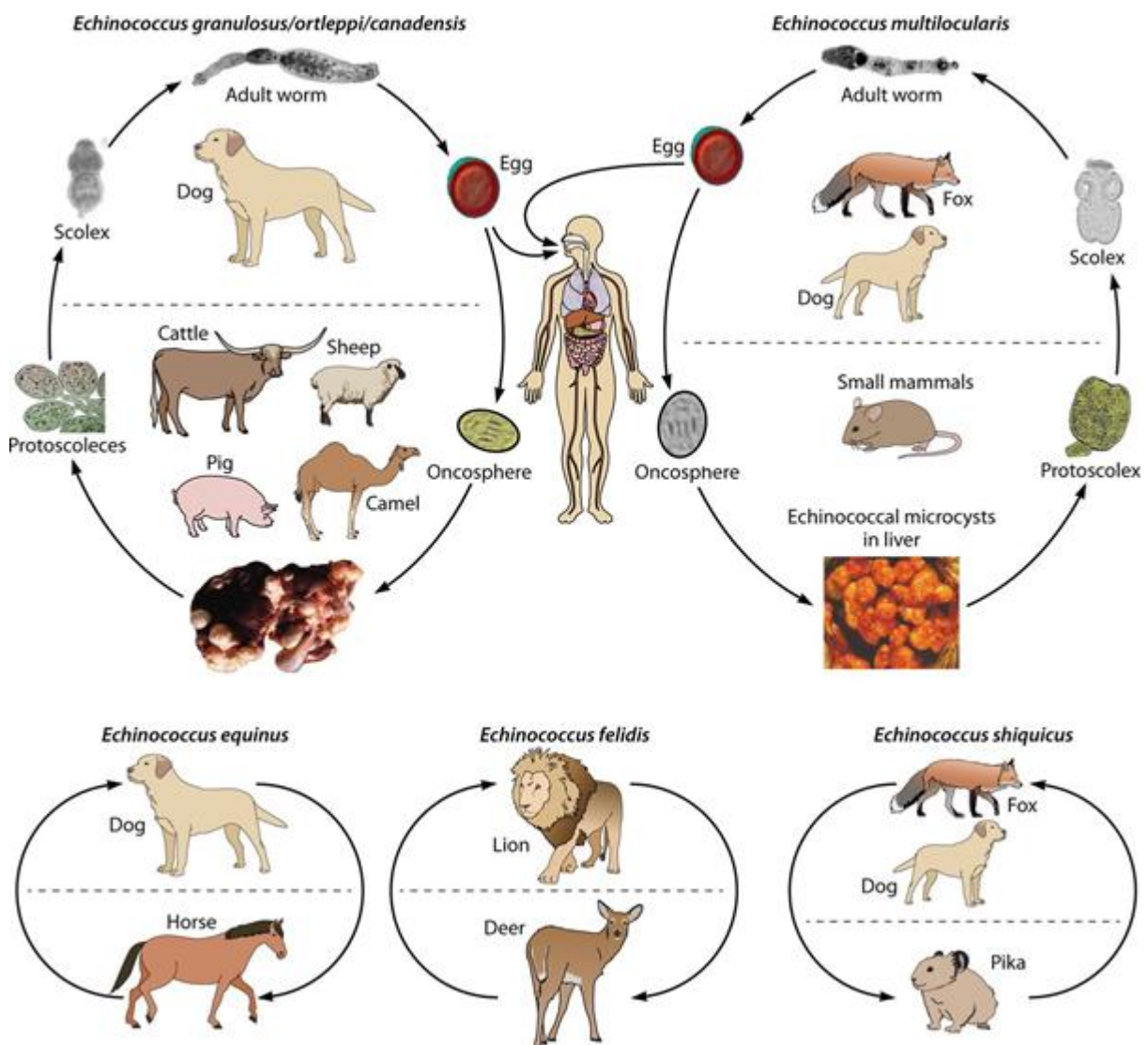
<i>Echinococcus felidis</i>	Лав	Хиена, дива свиња, зебра, гну, бивол, разни антилопи, жирафа, нилски коњ.	Не е пријавено	Африка
<i>Echinococcus equinus</i>	Домашно куче	Свиња, камила, елени (цервиди)	Не е пријавено	Евроазија, Африка
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Сите видови лисици, волк, домашно куче, мачка	глодари и мали тревојади цицачи, вклучувајќи зајаклики (на пр. пика); свињи, диви свињи, коњи, говеда, нутрии, примати и кучиња се случајни домаќини.	да	Евроазија, Северна Америка
<i>Echinococcus oligarthra</i>	Диви мачки	<i>Dasypsecta azarae</i> (агути), <i>Didelphis marsupialis</i> (опосум)	да	Централна и Јужна Америка
<i>Echinococcus vogeli</i>	Диво куче (bush dog), домашно куче	<i>Cuniculus paca</i> Linnaeus, 1766 (пака)	да	Централна и Јужна Америка
<i>Echinococcus shiquicus</i>	Тибетска лисица	<i>Ochotona curzoniae</i> (пика од Тибетската висорамнина)	Не е пријавено	Тибетска висорамнина

Циклусот на пренесување кај видовите од родот *Echinococcus* е хетероксен и вклучува краен домаќин и меѓудомаќин. Крајни домаќини најчесто се каниди, вклучувајќи домашни кучиња и диви месојади, во чие тенко црево се развива возрасната форма на паразитот. Меѓудомаќини се тревојадни и сештојадни животни, кај кои по ингестија на јајцата се развива ларвената, односно метацестодна форма, како хидатидна циста (24–27). Циклусот на пренесување се одржува кога крајниот домаќин внесува органи што содржат фертилни цисти, при што од протосколексите во неговото тенко црево се развиваат возрасни паразити и циклусот повторно се воспоставува. Шематскиот приказ на циклусот на пренесување е прикажан на Слика 1.

Кај *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) доминира домашниот циклус „куче–преживар“, кој има најголемо епидемиолошко значење во сточарските региони (15,28). По ослободувањето од јајцето, онкосферата ја пробива цревната мукоза и преку крвотокот најчесто се задржува во црниот дроб како прва, а во белите дробови како втора анатомска бариера. Поради тоа, токму овие два органа претставуваат најчести локализации на хидатидните цисти кај меѓудомаќините (27,29–37). Во нив постепено се развиваат цисти составени од надворешен ламиниран и внатрешен герминативен слој, при што герминативниот слој ја обезбедува биолошката активност на цистата и формирањето на капсули и протосколекси.

Фертилноста на цистите претставува клучен епидемиолошки параметар, бидејќи присуството на витални протосколекси овозможува продолжување на циклусот на пренесување по внесување на инфицирани органи од страна на крајниот домаќин.

Стерилните цисти, иако патолошки и дијагностички релевантни, немаат иста улога во одржувањето на пренесувањето (27,38). Фертилноста на цистите се користи како показател при проценка на улогата на различните меѓудомаќини во циклусот на пренесување. За разлика од *Echinococcus granulosus* s.s., кај *Echinococcus multilocularis* циклусот на пренесување најчесто се одвива во диви екосистеми, најчесто во релација лисица–глодар, а метацестодната форма се карактеризира со инфилтративен раст и поинакво патобиолошко однесување (28,39,40). Видовите од родот *Echinococcus* се разликуваат не само таксономски, туку и според домаќинскиот спектар, моделот на пренесување и значењето за здравјето на животните и човекот. Овие карактеристики се релевантни за епидемиолошката интерпретација и за планирање на контролните мерки (41–44).



Сл. 1: Циклус на пренесување на видовите од родот *Echinococcus* (25)

### 2.3. Глобална и регионална епидемиологија

Цистичната ехинококоза има космополитска распространетост и останува ендемска во бројни региони со традиционално сточарство, каде што е воспоставен функционален и континуиран домашен циклус на пренесување („куче–преживар“) (26,45,46). Во таков контекст, локалната епидемиолошка состојба е поврзана со одгледувачките практики, санитарно-хигиенските услови, капацитетот на ветеринарниот надзор и динамиката на популацијата на кучиња (44,47). На глобално ниво, *Echinococcus granulosus* s.s., особено генотипот G1, се опишува како доминантен причинител поврзан со човечката цистична ехинококоза во повеќе ендемични подрачја (48–50).

Интерпретацијата на глобалните податоци е ограничена од нееднаквоста во надзорот, дијагностичките капацитети и степенот на стандардизација на мониторингот кај животните. Достапните мапи и синтези документираат изразена географска варијабилност и празнини во пријавувањето, особено во средини со ограничена инфраструктура за дијагностика и систематско собирање на податоци (Сл. 2) (43). Во литературата се опишуваат и методолошки разлики што влијаат врз пријавената преваленца, вклучително варијабилни кланични практики и интензитет на инспекција, различна возраст и структура на испитуваните популации, неусогласени дефиниции за позитивен наод и разлики во временскиот опфат и географската покриеност на примероците (38,43).

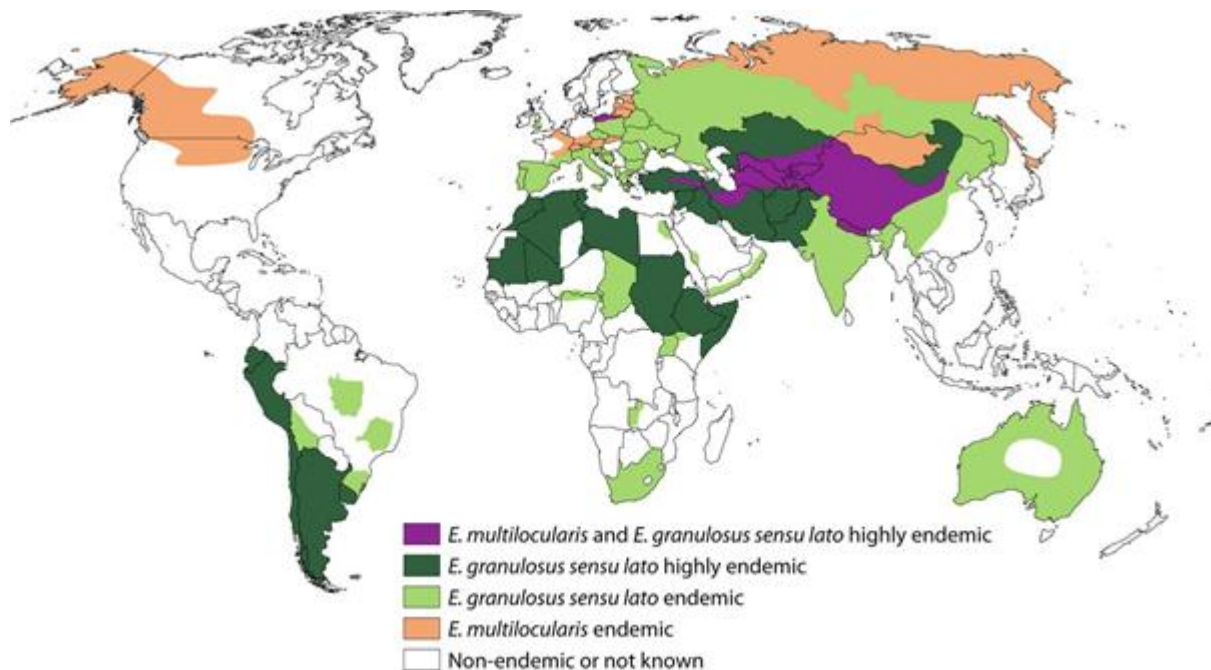
Во Европа, а особено во балканскиот и медитеранскиот регион, цистичната ехинококоза останува значаен, но просторно нерамномерно распределен проблем (23,51,52). Во литературата се пријавуваат широки варијации на преваленцата кај домашните преживари, кучињата и луѓето во поединечни земји и подрачја од регионот (53–58). Во медитеранско–балканскиот простор се опишуваат и разлики поврзани со сточарските практики, организацијата на колење, пристапот на кучињата до инфицирани органи и ветеринарно-санитарниот надзор (10,52,59).

Во европски контекст, молекуларните податоци дополнително ја документираат сложеноста на епидемиолошката слика. Систематскиот преглед за Европа за периодот 2000–2021 покажува дека човечката цистична ехинококоза најчесто е поврзана со таксони од комплексот *Echinococcus granulosus* s.l., но нивната распределба не е униформна во сите земји (17,23). Во медитеранскиот и балканскиот појас доминацијата на *Echinococcus granulosus* sensu stricto е поизразена, додека во некои други делови на Европа е регистрирано и присуство на други таксони (23,60). Различните видови и генотипови на *Echinococcus granulosus* s.l. се разликуваат според домаќинскиот спектар и моделот на пренесување (17,44).

Во сточарските системи од медитеранскиот и балканскиот регион, домашниот циклус куче–добиток останува клучен модел на пренесување (10,52,59). Податоците од ендемични подрачја ги опишуваат овците како главни меѓудомаќини во одржувањето на овој циклус, додека улогата на говедата е попроменива и зависи од локалниот контекст (54,61–63).

Во Република Северна Македонија постојат кланични и молекуларни податоци што потврдуваат присуство на болеста кај домашните преживари и циркулација на *Echinococcus granulosus* s.s. (11,12). Сепак, достапните наоди најчесто се ограничени по обем и географска покриеност, па останува потребата од поширок и методолошки споредлив надзор кај преживарите, вклучително според возраст, локализација по органи

и фертилност, како предуслов за стабилна основа за локални контролни програми и валидни регионални споредби (23,51)



Сл. 2: Глобална распространетост и ендемичност на ехинококозата (43)

## 2.4. Фактори поврзани со преваленца

Преваленцата на цистичната ехинококоза кај домашните преживари е поврзана со биолошките својства на паразитот, карактеристиките на домаќинот и условите на одгледување. Во литературата како најчесто анализирани фактори поврзани со варијации во преваленцата се наведуваат видот на домаќин, возраста, географскиот регион, локализацијата на цистите по органи и нивната фертилност (38,64).

### 2.4.1. Вид на домаќин

Разлики во преваленцата меѓу овци, говеда и други преживари се пријавени во бројни истражувања. Во литературата овците се опишуваат како најзначаен меѓудомаќин во домашниот циклус на *Echinococcus granulosus* s.l., особено за генотипот G1, поради високата подложност и повисоката фертилност на цистите (36,60,65). Кај говедата, и покрај честата детекција на цисти, во повеќе студии се пријавува поголема застапеност на стерилни цисти, поради што нивното епидемиолошко значење се смета за помало (37,66). Во литературата се наведува дека овие разлики можат да варираат зависно од возраста на животните, условите на одгледување и генотипската структура на паразитот.

Во епидемиолошките анализи, видот на домаќин се разгледува како релевантен фактор при проценка на преваленцата и одржувањето на циклусот на пренесување.

#### **2.4.2. Возраст**

Возраста е еден од најдоследно пријавуваните фактори поврзани со преваленцата на цистичната ехинококоза. Поради бавниот раст на хидатидните цисти и кумулативната изложеност на инфективни јајца, постарите животни обично имаат повисока преваленца на инфекцијата (38,43). Во литературата возраста се разгледува како показател за времетраењето на изложеноста на инфекција. Таа има значење и при интерпретацијата на кланичните податоци, бидејќи животните испратени на колење често не се рамномерно распределени по возраст. Во поединечни сточарски системи, повисоката возраст при колење се наведува како можен фактор поврзан со поголема веројатност за откривање цисти и со повисока фертилност кај одделни видови домаќини.

#### **2.4.3. Географска распределба**

Разликите во преваленцата меѓу регионите најчесто се поврзуваат со сточарските практики, густината на популацијата на кучиња, контролата на бездомните животни, хигиенските услови и степенот на ветеринарен надзор. Во рурални средини, особено каде што колењето се врши во домашни услови и инфицираните органи не се отстрануваат контролирано, во литературата се пријавува повисока веројатност за одржување на циклусот на пренесување (44,47,53). Регионалните разлики во преваленцата во литературата се поврзуваат и со локалните услови на одгледување и организацијата на ветеринарно-санитарниот надзор.

Регионалните разлики во преваленцата може да бидат под влијание и на методолошки фактори, како што се различниот интензитет на кланичната инспекција, репрезентативноста на примерокот и снабдувачката структура на кланиците (26,38). Во ендемични подрачја, регионалните разлики се опишуваат во контекст на заемното дејство на биолошки, организациски и социо-економски фактори.

#### **2.4.4. Локализација на цистите по органи**

Најчеста локализација на цистите кај преживарите се црниот дроб и белите дробови, што е во согласност со патот на хематогеното ширење на онкосферата преку порталната циркулација (27,67). Локализацијата по органи претставува важен дел од паразитолошката проценка и се разгледува како релевантен показател во епидемиолошката анализа.

Во повеќе студии, одделни локализации се поврзуваат со различна веројатност за фертилност на цистите, при што белодробната локализација, особено кај овци, почесто се пријавува заедно со повисока фертилност (37,66). Комбинираната локализација и зафатеноста на повеќе органи исто така се разгледуваат во однос на изложеноста на инфекција, а нивното толкување зависи од возраста на животните и од составот на испитуваниот примерок.

#### **2.4.5. Фертилност на цистите**

Фертилноста на цистите е еден од клучните епидемиолошки показатели, бидејќи само цистите со витални протосколекси можат да учествуваат во одржувањето на циклусот на пренесување. Разлики во фертилноста се опишани меѓу различни видови домаќини, локализации по органи и региони, што е релевантно за проценката на интензитетот на пренесување (36–38). Високата застапеност на стерилни цисти се поврзува со помал потенцијал за одржување на циклусот, дури и кога вкупната преваленца е висока (66). Фертилноста се разгледува како релевантен показател во епидемиолошката проценка на цистичната ехинококоза.

#### **2.4.6. Епидемиолошки пристап во анализа на преваленцата**

Во литературата се опишува дека епидемиолошката анализа на цистичната ехинококоза не се заснова само на прикажување на преваленцата, туку и на нејзино разгледување во просторен и домаќински контекст. Otero-Abad и Torgerson наведуваат дека епидемиолошките асоцијативни студии овозможуваат идентификација на факторите значајно поврзани со инфекцијата кај животните, додека Tamaozzi и соработниците укажуваат на изразена хетерогеност, нерамномерна географска покриеност и недоволно пријавување на инфекцијата во медитеранските и балканските земји кај луѓето и животните (10,38). Овие наоди ја поставуваат преваленцата како епидемиолошки показател што се анализира во поширок аналитички контекст.

#### **2.5. Генотипска структура и молекуларна епидемиологија**

Во литературата, молекуларната карактеризација на *Echinococcus granulosus* s.l. најчесто се заснова на PCR-базирани методи и анализа на митохондриски маркери, особено *cox1* и *nad1*. Митохондриската ДНК е погодна за вакви анализи поради повисокиот број копии во клетката и можноста за разграничување на блиски таксони и генотипови (17,22,68).

Во рамките на комплексот *Echinococcus granulosus* s.l., најголемо епидемиолошко значење има *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1–G3), кој најчесто се пријавува во рамки на домашниот циклус куче–добиток и како доминантен причинител на хумана цистична ехинококоза во светски рамки (17,60,69). Генотипот G1 е најраспространет и најчесто се поврзува со инфекции кај овци, додека G3 се пријавува како блиска варијанта во рамки на истиот таксон (65,70). G1/G3-профилот се пријавува најчесто во сточарските системи во кои овците се главен меѓудомаќин (23,69).

Во европски контекст, повеќето молекуларни студии потврдуваат доминација на G1, со варијабилно присуство на G3 и повремено детектирање на други генотипови (23,71). Во делови од централна и источна Европа, генотиповите поврзани со *Echinococcus canadensis* имаат поизразено присуство, додека во медитеранскиот и балканскиот појас доминацијата на *Echinococcus granulosus* s.s. е поизразена (72,73).

Во балкански контекст постојат молекуларни податоци за повеќе земји, но со варијабилна методологија и различна домаќинска и географска покриеност (54,57,58). Во Србија се пријавени G1 и G3 кај домашни животни, а во Босна и Херцеговина и присуство на G7 во одделни серии (54,58). Податоците од Италија кај овци, со доминација на G1 и присуство на G3, припаѓаат на истиот медитерански генотипски образец (71).

Поновите регионални и меѓународни истражувања пријавуваат циркулација на *Echinococcus granulosus* s.s., особено G1 и G3, и надвор од класичните медитерански ендемски подрачја. Податоци за G1/G3 се опишани кај животни во Романија, во Xinjiang и во САД, што укажува на широка распространетост на овој генотипски профил во домашниот циклус на цистична ехинококоза (63,74,75).

Од методолошки аспект, митохондриските маркери *cox1* и *nad1* остануваат широко користени во генотипизацијата поради можноста за разграничување на главните генотипски линии и споредливост со претходно објавени секвенци (23,74).

За Република Северна Македонија, објавената генотипизација кај преживари потврди присуство на G1 и G3, односно циркулација на *Echinococcus granulosus* s.s. (12). Достапните објавени податоци се однесуваат на ограничен број изолати и ограничена географска покриеност (51).

## 2.6. Контрола и превенција

Контролата на цистичната ехинококоза претставува долгорочен процес што бара истовремени мерки насочени кон дефинитивните домаќини, меѓудомаќините и постапувањето со инфицирани органи. Во литературата, контролата на ЦЕ се опишува како интегриран ветеринарно-јавно-здравствен пристап, затоа што пренесувањето се одржува во рамки на домашниот циклус куче-преживар и е поврзано со сточарските практики, домашното колење и пристапот на кучињата до кланичен отпад (44,76).

Класичните контролни мерки вклучуваат редовна дехелминтизација на кучињата со празиквантел, спречување на пристапот на кучињата до инфицирани органи, ветеринарен надзор при колење, безбедно отстранување на кланичниот отпад и здравствена едукација на населението (1,26). Прегледите на контролните програми наведуваат дека најдобри резултати се постигнуваат кога повеќе мерки се комбинираат и се спроведуваат континуирано, додека стратегиите со висока ефикасност во островски или географски ограничени системи не се пренесуваат едноставно во континентални рурални средини, каде контролата зависи и од теренската покриеност, организацијата на колење и структурата на кучешката популација (76).

Редовниот третман на кучињата со празиквантел останува централна мерка во контролата, но неговиот ефект зависи од интервалите на третман и од степенот на опфат на кучешката популација. Во литературата се опишува дека спроведувањето на оваа мерка е организациски и логистички сложено, особено во просторно обемни ендемични подрачја и во услови на присуство на кучиња кои слободно се движат и диви каниди (26,77).

Податоците од Мароко покажуваат дека четиримесечниот третман на кучиња со сопственик ја намалил позитивноста кај третираните животни, но не довел до јасно намалување на пренесувањето кон овците, во услови на присуство на нетретирани кучиња без сопственик и диви каниди (78).

Во литературата конзистентно се опишува дека домашното колење, неконтролираното отстранување на инфицирани органи, хранењето на кучињата со суров кланичен отпад и нередовната дехелминтизација на кучињата се поврзани со одржување на циклусот на пренесување (64). Поради тоа, здравствената едукација и промената на ризичните

практики се вклучуваат меѓу стандардните компоненти на контролните програми (52,64).

Во последните години, во литературата сè почесто се разгледуваат и вакцинални стратегии кај меѓудомаќините, особено кај овци. Вакцината EG95 се опишува како мерка со висока заштитна ефикасност против развој на цистична ехинококоза кај овци и се применува како дополнување на класичните контролни мерки (79). Во теренски услови, мароканската студија на Amagir и соработниците пријавува околу 97% редуција на бројот на витални цисти кај вакцинирани овци, додека четиримесечниот третман на сопственички кучиња самостојно не обезбедил споредлив ефект врз пренесувањето кон овците (78,80). Прегледите за EG95 наведуваат дека вакцината има место во интегрирани програми, но бара организирана примена, повторени дози и доволна покриеност на популацијата (80).

Цистичната ехинококоза во литературата се разгледува и во рамки на концептот Едно здравје (One Health), во кој ветеринарниот надзор, контролата на кучињата, санитарното постапување со кланичниот отпад, здравствената едукација и податоците за човечката болест се третираат како меѓусебно поврзани компоненти на ист епидемиолошки процес (81).

## **2.7. Дијагностички пристапи во ветеринарно-епидемиолошки студии кај преживари**

Во ветеринарно-епидемиолошките истражувања на цистичната ехинококоза кај домашни преживари, дијагностичкиот пристап е поврзан со проценката на преваленцата и со споредливоста на податоците меѓу различни студии. Кај меѓудомаќините, најчесто применуван метод е постмортем детекцијата во кланица, бидејќи овозможува преглед на голем број животни и увид во локализацијата на цистите по органи (27,38). Кај дефинитивните домаќини, во литературата се опишуваат копролошки, копроантигенски и молекуларни методи. Во епидемиолошките студии, дијагностичките методи се опишуваат според нивната чувствителност, специфичност и оперативна применливост.

### **2.7.1. Кланична инспекција (постмортем) и методолошки импликации**

Кланичната инспекција кај цистичната ехинококоза најчесто се заснова на макроскопска детекција на цисти во црниот дроб и белите дробови, со палпација и инцизија кога тоа е вклучено во протоколот. Овој пристап е најчесто применуван во ветеринарно-епидемиолошките студии кај преживари поради практичната применливост при преглед на голем број животни. При споредување на резултатите од различни студии, важно е да се земат предвид дизајнот на истражувањето, возраста на испитуваните животни и критериумите според кои е дефиниран позитивниот наод, на пример дали се бележи само присуство на циста или и нејзината фертилност (26,38,62). Покрај тоа, чувствителноста на кланичната инспекција може да варира зависно од обемот на прегледот, искуството на инспекторот и големината и развојниот стадиум на цистите, што дополнително влијае врз споредливоста на добиените резултати (82).

### **2.7.2. Проценка на фертилност/виталност како епидемиолошки индикатор**

Во литературата, фертилноста на цистите се опишува како важен епидемиолошки показател, бидејќи само цистите со витални протосколекси можат да учествуваат во одржувањето на циклусот на пренесување доколку инфицираните органи се достапни за кучиња (36,66). Проценката на фертилноста најчесто се заснова на микроскопско докажување на протосколекси или хидатиден песок, додека стерилните и дегенеративните цисти се опишуваат со отсуство на протосколекси и со морфолошки промени, вклучително и калцификација. Во литературата се опишуваат методолошки разлики во однос на начинот на земање на материјалот, микроскопската проценка на протосколексите и критериумите за дефинирање на виталноста на цистите (27,36,37).

### **2.7.3. Молекуларна потврда и генотипизација**

Во литературата се наведува дека морфологијата и локализацијата на цистите по органи не се доволни за прецизна идентификација на таксоните и генотиповите во рамки на *Echinococcus granulosus* s.l. Поради тоа, молекуларната потврда, најчесто со анализа на митохондриски маркери како *cox1* и *nad1*, се користи за генотипизација и за разграничување на главните генотипски линии (83). Употребата на овие маркери овозможува и споредливост со претходно објавени секвенци.

Во балкански контекст, молекуларните податоци се користат за утврдување на присутните таксони и генотипови, вклучително и доминацијата на *Echinococcus granulosus* s.s. (G1–G3) или присуството на други таксони во поединечни студии (23,54,58). Во епидемиолошките студии, генотипизацијата се применува при анализа на поврзаноста меѓу изолатите, домаќинскиот спектар и циклусот на пренесување.

### **2.7.4. Дијагностички пристап кај меѓудомаќини**

Бидејќи анализата е насочена кон меѓудомаќините, односно домашните преживари, дијагностичкиот пристап во оваа студија се заснова на постмортем детекција на цисти, нивната распределба по органи, проценка на фертилноста и молекуларна потврда на цистичниот материјал. Методите што се применуваат кај дефинитивните домаќини, како копролошки, копроантигенски и молекуларни методи, како и некропсијата, не се разгледуваат детално во ова подпоглавје и се наведуваат главно во контекст на контролните програми и пристапот Едно здравје (27,84).

## **3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО**

### **3.1. Цел на истражувањето**

Целта на оваа докторска дисертација беше да се изврши сеопфатна епидемиолошка проценка на цистичната ехинококоза кај домашните преживари во Република Северна Македонија, преку утврдување на преваленцата, анализа на факторите поврзани со присуството на инфекцијата, проценка на фертилноста на хидатидните цисти и молекуларна карактеризација на циркулирачките генотипови на *Echinococcus granulosus* s.l., за подобро разбирање на локалната динамика на пренесување и обезбедување научна основа за контрола и превенција на болеста.

### 3.2. Истражувачки задачи

Со цел реализација на поставената цел, беа дефинирани следните задачи:

1. Утврдување на преваленцата на цистичната ехинококоза кај овци и говеда во Република Северна Македонија.
2. Проценка на поврзаноста на инфекцијата со видот на домаќинот, возраста, географскиот регион и локализацијата на цистите по органи.
3. Анализа на фертилноста на хидатидните цисти и нејзината распределба според видот на домаќинот и локализацијата по органи.
4. Примена на соодветни униваријабилни и мултиваријабилни статистички методи за проценка на факторите поврзани со присуството на инфекција.
5. Молекуларна карактеризација на избрани изолати преку анализа на митохондрискиот ген *cox1* и утврдување на присутните генотипови на *Echinococcus granulosus* s.l.
6. Интеграција на паразитолошките, статистичките и молекуларните наоди во епидемиолошка рамка за разбирање на одржувањето и пренесувањето на инфекцијата во земјата.

## 4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

### 4.1 Дизајн на студијата

Истражувањето беше пресечна студија спроведена во периодот од јули 2020 до јули 2022 година. Дизајнот се засноваше на систематска постмортем инспекција на органи кај домашни преживари за време на Курбан бајрам, кога зголемениот обем на колење овозможува собирање доволен материјал во кратки временски интервали. Детектираните хидатидни цисти беа вклучени во понатамошна паразитолошка и молекуларна анализа.

### 4.2 Испитуван материјал

#### 4.2.1 Испитувана популација и примерок

Во рамки на истражувањето беа прегледани вкупно 1.344 животни, односно 938 овци и 406 говеда, закрани во пет регистрирани кланици во Република Северна Македонија (Џеза – Скопје, Гутас Мит ДООЕЛ – Прилеп, Серта – Кавадарци, ТД Кланица ДООЕЛ Ново Село и Шонте БС – Струмица). Животните потекнуваа од сите осум статистички региони (Табела 2), што овозможи просторна анализа на географската дистрибуција на инфекцијата. При постмортем инспекцијата беше извршен систематски макроскопски преглед на црниот дроб, белите дробови и на другите висцерални органи со цел детекција на хидатидни цисти (Сл. 3).

За секое прегледано животно беше пополнет стандарден формулар, специјално подготвен за ова истражување, во кој беа евидентирани податоци за идентификација, старост, бројот на хидатидни цисти и нивната локализација по органи (Сл. 4).

**Табела 2:** Распределба на прегледаните овци и говеда според статистички региони во Република Северна Македонија

Статистички регион	Вкупно овци	Вкупно говеда
Вардарски	40	123
Источен	228	6
Југозападен	33	12
Југоисточен	3	64
Пелагониски	200	15
Полошки	126	13
Североисточен	167	50
Скопски	141	123
Вкупно	938	406



**Сл. 3:** Преглед на органи во клиника



Број на ушна маркица / РБО: \_\_\_\_\_

Вид на животно:  Овца  Говедо

Старост:  Младо  Возрасно  Старо

Присуство на ехинококови цисти:  Бели дробови  Црн дроб  Друг орган:

\_\_\_\_\_

Број на цисти:  Една  Повеќе од една

Вкупно земени цисти: \_\_\_\_\_

Сл. 4: Формулар за податоци на испитаните животни

#### 4.2.2 Паразитолошка анализа и проценка на фертилноста

За паразитолошка обработка беа вклучени цисти од 294 животни, односно од 190 овци и 104 говеда, кај кои беше извршена микроскопска проценка на фертилноста. Распределбата на животните вклучени во паразитолошката анализа според локализацијата на цистите и видот на животно е прикажана во Табела 3. Обработката се изведуваше со примена на асептична техника, имајќи предвид дека истиот биолошки материјал беше наменет и за молекуларни анализи. Течноста од цистите беше аспирирана со стерилен шприц и игла и пренесувана во стерилна петриева плоча (Сл. 7 и 8). Од аспирираната течност се подготвуваше нативен препарат кој се испитуваше под светлосен микроскоп (10× и 40×) за детекција на протосколекси. Врз основа на микроскопскиот наод, цистите беа класифицирани како фертилни, при присуство на протосколекси, или стерилни, при нивно отсуство. По проценката, сидот на цистата се отвораше со стерилен скалпел и ножици, при што од фертилните цисти се изолираа протосколекси, а од стерилните цисти герминативен слој за молекуларна анализа (Сл. 9 и 10). Наодот се евидентираше во стандарден формулар за преглед на органи со ехинококови цисти (Сл. 11).

**Табела 3. Распределба на животните вклучени во паразитолошката анализа според локализацијата на цистите и видот на животно (n = 294)**

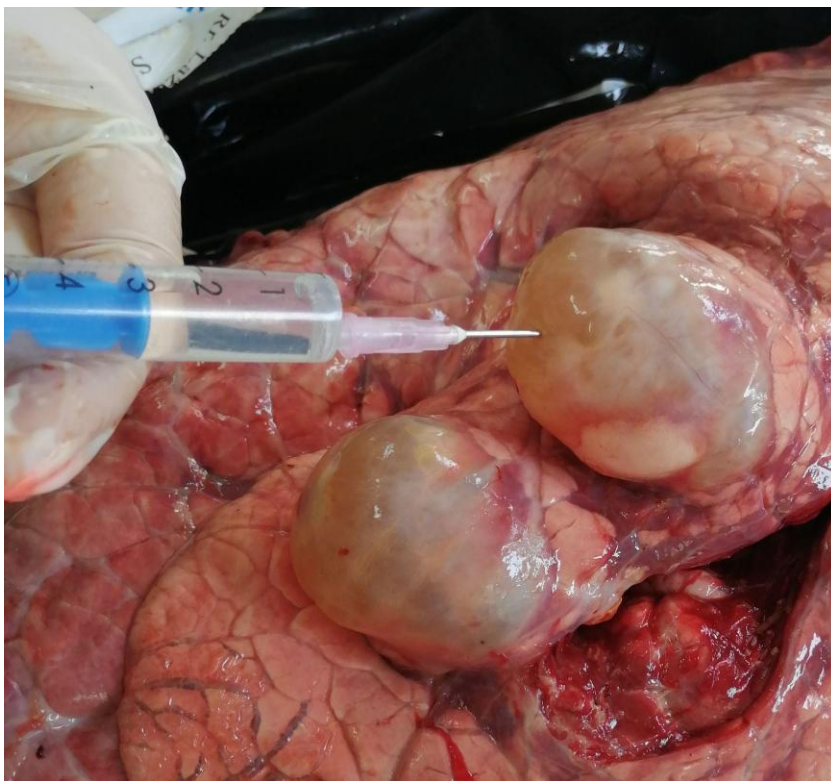
Локализација на цисти	Говеда	Овци
Само црн дроб	13	3
Само бели дробови	42	18
Комбинирано (бели дробови + црн дроб)	49	169
Други висцерални органи	0	0
Вкупно животни	104	190



**Сл. 5: Црн дроб со детектирани цисти**



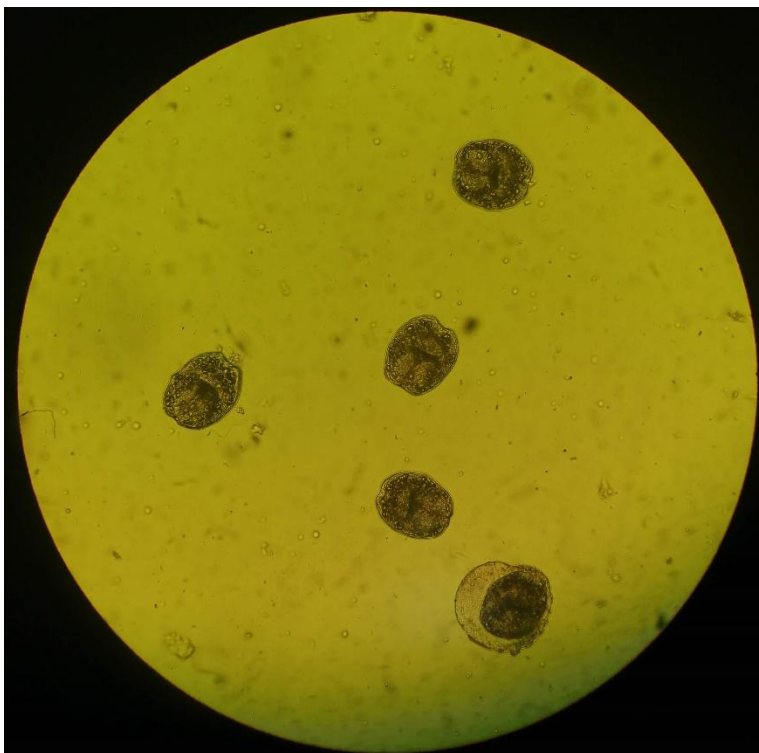
Сл. 6: Бели дробови со детектирани цисти



Сл. 7: Аспирација на течност од ехинококова циста од бел дроб



Сл. 8: Аспирација на течност од ехинококова циста од црн дроб



Сл. 9: Протосколекси од фертилна ехинококова циста



**Сл. 10:** Герминативен слој на ехинококова циста



## Формулар за преглед на органи со ехинококови цисти

Интерен идентификациски број: \_\_\_\_\_

Вид на орган:  Бели дробови  Црн дроб

Вид на животно:  Овца  Говедо

Фертилност на цисти:  Фертилни  Стерилни

Присуство на паразитни елементи:

- Протосколекси
- Герминативен слој

Земен материјал за молекуларно испитување:

- Да
- Не

Забелешки:

Сл. 11: Формулар за преглед на органи со ехинококови цисти

### 4.2.3 Примероци за молекуларна анализа

За молекуларна генотипизација беа селектирани 69 примероци, односно по една циста од секое животно, со доволна количина биолошки материјал за екстракција и амплификација. Од нив, 61 примерок беа од овци, а 8 од говеда. Од фертилните цисти беа изолирани протосколекси, а од стерилните цисти герминативен слој. Примероците беа обработувани индивидуално со асептична техника за минимизирање на ризикот од контаминација. По перење и центрифугирање, приближно 2 mL материјал беше складиран на  $-20^{\circ}\text{C}$  до екстракција на ДНК. Распределбата на примероците според општина, статистички регион и вид на животно е прикажана во Табела 4.

**Табела 4:** Број на примероци според општина, регион и вид на животно (молекуларни испитувања; n = 69)

Регион (статистички)	Општина	Вид на животно	Број на примероци
Источен	Виница	Овца	<b>18</b>
Источен	Штип	Овца	<b>7</b>
Вардарски	Свети Николе	Овца	<b>2</b>
Североисточен	Куманово	Овца	<b>8</b>
Скопски	Скопје	Овца	<b>1</b>
Скопски	Скопје	Говедо	<b>7</b>
Пелагониски	Крушево	Овца	<b>13</b>
Пелагониски	Прилеп	Овца	<b>9</b>
Југозападен	Кичево	Овца	<b>1</b>
Југозападен	Дебар	Овца	<b>1</b>
Полошки	Маврово	Говедо	<b>1</b>
Југоисточен	Богданци	Овца	<b>1</b>
<b>Вкупно (овци)</b>			<b>61</b>
<b>Вкупно (говедо)</b>			<b>8</b>
<b>ВКУПНО</b>			<b>69</b>

#### 4.2.4 Екстракција на ДНК

Екстракцијата на нуклеинска киселина беше извршена со автоматизиран систем KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), користејќи MagMax™ Core Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), согласно протоколот на производителот. По лизирање и автоматизирана обработка преку магнетни честички, ДНК беше елуирана во нуклеаза-слободна вода и складирана на – 20°C. Концентрацијата и чистотата на изолираната ДНК беа проценети со NanoDrop™ 2000 спектрофотометар (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.2.5 PCR амплификација

За амплификација беше таргетиран 460 bp фрагмент од митохондрискиот ген cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1), користејќи прајмери опишани во литературата (85) (Табела 5). PCR реакцијата беше изведена во вкупен волумен од 50 µL со AmpliTaq Gold 360 Mastermix (Applied Biosystems), 0,6 µM од секој прајмер и екстрахирана ДНК. Во секоја серија беа вклучени позитивна контрола за екстракција, позитивна контрола за

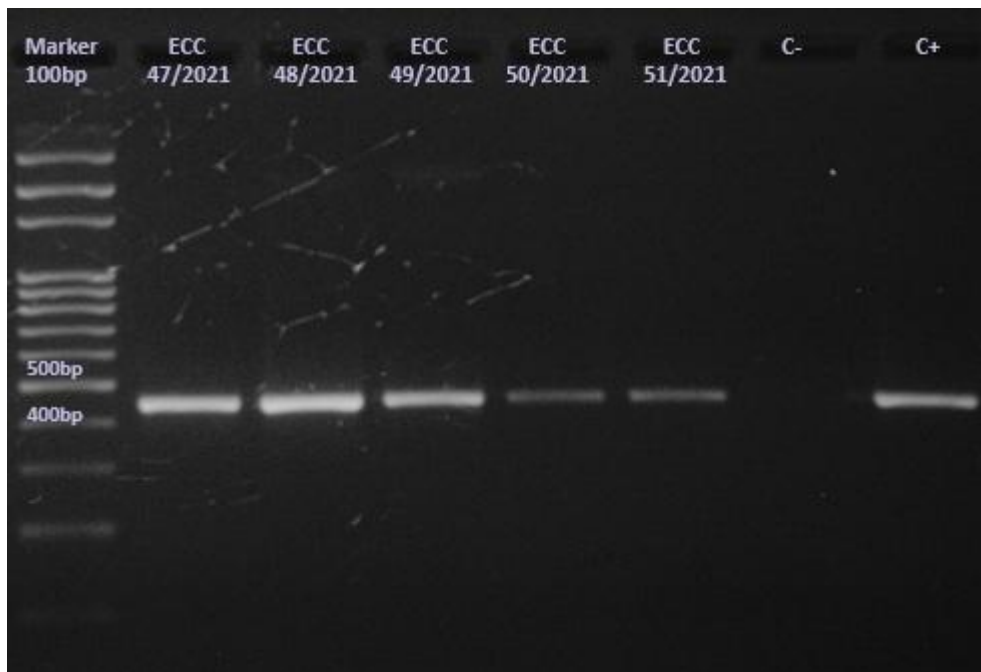
амплификација и негативна контрола (без ДНК шаблон). Амплификацијата беше изведена во SimpliAmp термоциклер (Applied Biosystems) со иницијална денатурација на 95°C/5 min, 40 циклуси (95°C/30 s; 55°C/30 s; 72°C/45 s) и завршна екстензија на 72°C/7 min.

**Табела 5:** Користени прајмери

Ознака	Секвенца (5'–3')
EGCO1.F	TTT TTT GGC CAT CCT GAG GTT TAT
EGCO1.R	TAA CGA CAT AAC ATA ATG AAA ATG

#### 4.2.6 Гел – електрофореза и верификација на PCR резултатите

PCR продуктите беа визуелизирани со 1,5% агарозна гел-електрофореза за верификација на очекуваната големина од 460 bp. Големината на амплификационите ленти се проценуваше со споредба со молекулски маркер (L100). Амплификацијата се сметаше за валидна доколку позитивните контроли (контрола за екстракција и контрола за амплификација) прикажуваа единечен бенд со очекувана должина (~460 bp), а негативната контрола не покажуваше амплификациски продукт, како што е прикажано на Сл. 12. Во случај на несоодветни контролни резултати, реакцијата се повторуваше со нов сет реагенси и/или со повторна подготовка на примерокот.



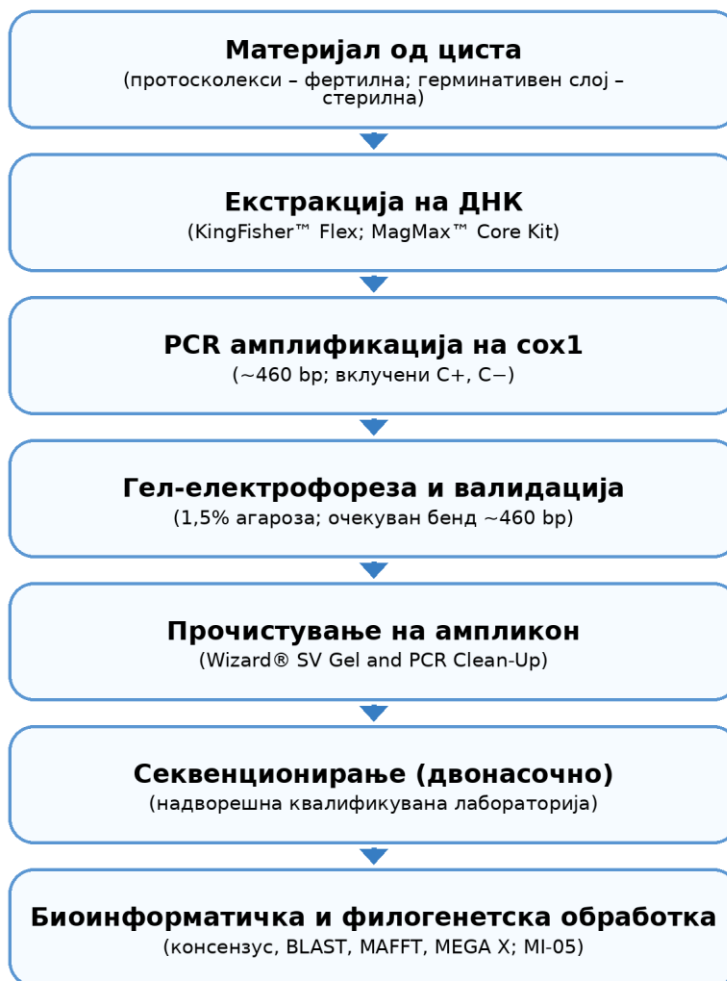
**Сл. 12:** Верификација на PCR продуктите (cox1) со агарозна гел-електрофореза (1,5%). Прикажани се тестирани примероци, позитивна контрола (C+) и негативна контрола (C-), со молекулски маркер L100.

#### 4.2.7 Прочистување и секвенционирање

PCR продуктите беа прочистени со Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) и испратени на секвенционирање во акредитирана лабораторија (LGS Genomics, Германија). Секвенционирањето беше изведено двонасочно (forward и reverse). Репрезентативен електроферограм по двонасочно секвенционирање на *cox1* е прикажан во Прилог 1.

#### 4.2.8 Биоинформатичка и филогенетска анализа

Консензус секвенците беа генерирани со Staden 2.0. Секвенците беа споредени со референтни секвенци од базата NCBI користејќи BLAST. Повеќекратното усогласување беше извршено со MAFFT v7, а филогенетската анализа беше спроведена со MEGA X (86) користејќи neighbor-joining метод (87) со 1000 bootstrap репликации (88). Еволутивните растојанија беа пресметани со Jukes–Cantor модел(89). Работниот тек на молекуларната анализа (од екстракција на ДНК до секвенционирање и филогенетска/генотипска обработка) е сумиран на Сл. 13.



Сл. 13: Шематски приказ на работниот тек на молекуларната анализа (екстракција на ДНК, PCR амплификација на *cox1*, верификација со гел-електрофореза, прочистување на ампликони, секвенционирање и филогенетска/генотипска анализа).

#### 4.2.9 Генотипска идентификација и применет протокол

Генотипската идентификација беше извршена согласно EURL-P MI-05 протоколот, врз основа на анализа на дефинирани нуклеотидни позиции/кодони во сох1 генот и споредба со референтни секвенци за генотиповите G1–G10 (Табела 6 и 7). Иако поновиот MI-15 протокол овозможува идентификација без секвенционирање, во ова истражување беше применет MI-05, за да се зачува директна споредливост со претходни европски и регионални студии и повисока резолуција во разграничувањето на генотиповите во рамки на *Echinococcus granulosus s.l.*

**Табела 6:** Начин на идентификација на генотипот во рамки на комплексот *Echinococcus granulosus s.l.* (EURL-P MI-05)

Генотип	Вид	Кодон 16	Кодон 18	Кодон 20	Кодон 84	Кодон 87
G1	<i>E. granulosus s.s.</i>	Ala [A]	Phe [F]	Ala [A]	Ser [S]	Val [V]
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. ortleppi</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]

**Табела 7:** Нуклеотиден состав на кодон 2 за разграничување на генотиповите G6 и G7 (*Echinococcus canadensis*)

Генотип	Вид	Кодон 2
G6	<i>E. canadensis</i>	CCT
G7	<i>E. canadensis</i>	CCC

#### 4.3 Статистичка анализа

Статистичката анализа беше спроведена за проценка на преваленцата на цистичната ехинококоза, нејзината просторна и временска распределба, локализацијата на цистите по органи, бројноста и фертилноста на цистите, распределбата на генотиповите на изолатите и факторите поврзани со присуството на инфекцијата. Вредностите кои недостасуваа беа исклучени само од анализите за кои беа релевантни, без да се исклучат записите од останатите статистички постапки.

##### 4.3.1 Подготовка на податоците

Пред статистичката анализа, базата на податоци беше проверена за конзистентност, унифицирање на категориите, отстранување на дупликати и идентификација на неконзистентни записи. Извршена беше логичка валидација помеѓу присуството на цисти и локализација по органи, како и проверка на усогласеноста меѓу паразитолошките

и молекуларните податоци кај подгрупата на генотипизирани примероци. Променливата „присуство на цисти“ беше кодирана бинарно (1 = има цисти; 0 = нема цисти). За сите пропорции беа пресметани 95% интервали на доверба со Wilson метод.

#### **4.3.2 Дескриптивна статистика и проценка на преваленца**

Преваленцата беше пресметана како пропорција на позитивни животни од вкупниот број испитани животни и беше прикажана како вкупна преваленца, како и стратифицирано по вид, регион и година. Дескриптивните резултати беа прикажани преку апсолутни фреквенции, релативни удели и 95% интервали на доверба. Разликите во преваленцата меѓу категориите беа анализирани со Pearson  $\chi^2$  тест, а кога очекуваните фреквенции беа мали, беше применет Fisher's exact тест. Големината на ефектот кај 2×2 споредбите беше изразена со odds ratio (OR) и 95% интервали на доверба.

#### **4.3.3 Анализа на временски тренд**

Трендот на преваленцата по години беше анализиран со Cochran–Armitage тест за тренд. Дополнително, годишните разлики беа проценети и со  $\chi^2$  тест, а големината на ефектот беше изразена со Cramér's V.

#### **4.3.4 Анализа на преваленца по региони**

Разликите во преваленцата меѓу регионите беа анализирани со  $\chi^2$  тест, односно со Fisher's exact тест кога бројот на набљудувања или очекуваните фреквенции беа ниски. Големината на ефектот беше изразена со Cramér's V.

#### **4.3.5 Анализа на локализацијата на цистите по органи**

Локализацијата на цистите беше категоризирана како: само во белите дробови, само во црниот дроб или комбинирано во двата органа. Разликите во распределбата на локализацијата меѓу видовите беа анализирани со  $\chi^2$  тест. Дополнително, кај позитивните животни во рамки на секој вид, споредбата на зафатеноста на белите дробови наспроти црниот дроб беше анализирана со McNemar тест, како тест за зависни бинарни податоци во рамки на исто животно.

#### **4.3.6 Анализа на бројноста на цистите**

Бројноста на цистите беше категоризирана како една циста наспроти повеќе од една циста. Разликите меѓу видовите беа анализирани со  $\chi^2$  тест или Fisher's exact тест, зависно од распределбата на податоците. Големината на ефектот беше изразена со OR и 95% интервали на доверба.

#### **4.3.7 Анализа на фертилноста на цистите**

Фертилноста на цистите беше анализирана кај цистите кај кои беше извршена микроскопска проценка. Исходот беше категоризиран бинарно како фертилна или стерилна циста. Разликите меѓу видовите беа оценети со  $\chi^2$  тест или Fisher's exact тест, а асоцијацијата беше изразена преку OR со 95% интервали на доверба.

#### **4.3.8 Анализа на распределбата на генотипови**

Распределбата на генотиповите беше прикажана преку апсолутни и релативни фреквенции по вид на животно. Поради малата бројност на генотипизираните примероци, особено кај говедата, споредбата меѓу видовите беше изведена со Fisher's exact test (двострано). Големината на ефектот беше изразена како OR со 95% интервали на доверба.

#### **4.3.9 Мултиваријабилна анализа**

За проценка на факторите поврзани со присуството на цисти беше применета бинарна логистичка регресија, со зависна променлива „присуство на цисти“ (1 = има; 0 = нема). Како независни променливи беа вклучени возраст, период и регион, при што Скопскиот регион беше користен како референтна категорија. Резултатите од моделот беа прикажани како прилагодени odds ratios (aOR) со 95% интервали на доверба. Калибрацијата на моделот беше оценета со Hosmer–Lemeshow тест, а дискриминацијата со ROC анализа и пресметка на површината под кривата (AUC). Возраста беше вклучена како континуирана променлива.

#### **4.3.10 Ниво на значајност и софтвер**

Сите статистички тестови беа двострани, а нивото на статистичка значајност беше поставено на  $p < 0,05$ . Анализите беа извршени со IBM SPSS Statistics и Python. Microsoft Excel беше користен за организација, визуелна проверка и уредување на табеларните прикази.

#### **4.3.11 Репрезентативност и ограничувања на примерокот**

Примерокот беше базиран на кланична популација и не претставуваше строго случаен избор од целата популација на преживари во земјата. Овој пристап овозможува практична и економски изводлива проценка на преваленцата, но може да биде под влијание на селекциски фактори, како што се возраста на животните испратени на колеџе и регионалната концентрација на кланици.

#### **4.3.12 Големина на примерокот и статистичко оправдување**

Големината на примерокот беше проценета според формулата на Thrusfield за пресметка на минимален примерок за преваленциски студии (90):

$$n = Z^2 \times P_{exp} \times (1 - P_{exp}) / d^2$$

каде  $n$  е минималниот потребен број животни,  $Z$  е вредноста за 95% ниво на доверба (1,96),  $P_{exp}$  е очекуваната преваленца, а  $d$  е саканата апсолутна прецизност. При претпоставена преваленца од 50% и прецизност од 5%, минималната големина на примерокот изнесуваше 384 животни. Реално вклучениот примерок беше поголем од овој минимум и кај овците и кај говедата.

#### **4.3.13 Етички аспекти**

Истражувањето беше спроведено во рамки на официјалниот ветеринарно-санитарен надзор при кланичен преглед и не вклучуваше дополнителна интервенција врз животните. Сите примероци беа собрани по колеџе. Молекуларната анализа беше извршена врз материјал добиен од веќе закрани животни, согласно националните

прописи за биосигурност и лабораториска работа и во согласност со важечките регулативи за ветеринарно-санитарен надзор и научно-истражувачка работа.

## 5. Резултати

### 5.1 Резултати од кланичниот преглед и паразитолошката анализа

#### 5.1.1 Вкупна преваленца

Во периодот 2020–2022 година беа испитани вкупно 1.344 животни, од кои 938 овци и 406 говеда. Преваленцата на цистична ехинококоза беше значително повисока кај овците отколку кај говедата (Табела 8). Разликата меѓу двата вида беше статистички значајна ( $\chi^2$  тест,  $p < 0,001$ ), при што odds ratio за позитивност кај овците во однос на говедата изнесуваше 9,86 (95% CI: 7,29–13,32).

Табела 8. Вкупна преваленца на цистична ехинококоза кај овци и говеда (2020–2022)

Вид	Вкупно испитани (n)	Позитивни (n)	Негативни (n)	Преваленца (%)	95% CI (Wilson)
Овци	938	859	79	91,6	89,6–93,2
Говеда	406	213	193	52,5	47,6–57,3

#### 5.1.2 Преваленца според старосни категории кај говедата

Старосни податоци беа достапни за 396 од 406 испитани говеда. Преваленцата на цистична ехинококоза се зголемуваше со возраста и беше најниска кај животните помлади од 2 години, а највисока кај животните постари од 5 години (Табела 9). Разликите меѓу старосните категории беа статистички значајни ( $\chi^2(2) = 13,33$ ;  $p = 0,001$ ;  $\text{Cramér's } V = 0,183$ ). Старосна стратификација не беше прикажана кај овците, бидејќи испитуваните животни беа возрасни.

Табела 9. Преваленца на цистична ехинококоза кај говедата според старосни категории

Старосна категорија	Вкупно (n)	Позитивни (n)	Негативни (n)	Преваленца (%)	95% CI (Wilson)
<2 години	10	2	8	20,0	5,7–51,0
2–5 години	201	92	109	45,8	39,0–52,7
>5 години	185	113	72	61,1	53,9–67,8

Забелешка: Старосни податоци беа достапни за 396 од 406 испитани говеда.

### 5.1.3 Преваленца по години (2020–2022)

Кај овците, преваленцата на цистична ехинококоза беше најниска во 2020 година, а повисока во 2021 и 2022 година (Табела 10). Разликите меѓу годините беа статистички значајни ( $\chi^2(2) = 233,53$ ;  $p < 0,001$ ; Cramér's  $V = 0,499$ ), а Cochran–Armitage тестот потврди статистички значаен тренд ( $Z = 14,75$ ;  $p < 0,001$ ).

Кај говедата, најниска преваленца беше утврдена во 2020 година, додека во 2021 и 2022 година беа забележани повисоки вредности (Табела 11). И кај овој вид разликите меѓу годините беа статистички значајни ( $\chi^2(2) = 21,13$ ;  $p < 0,001$ ; Cramér's  $V = 0,228$ ), а Cochran–Armitage тестот покажа статистички значаен тренд ( $Z = 4,10$ ;  $p < 0,001$ ).

Вредностите за 2022 година кај овците и за 2021–2022 година кај говедата се однесуваат на мал број испитани животни.

Табела 10. Распределба на цистична ехинококоза кај овци по години (2020–2022)

Година	Вкупно	Позитивни	Негативни	Преваленца (%)	95% CI
2020	98	50	48	51,0	41,3–60,7
2021	832	801	31	96,3	94,8–97,4
2022	8	8	0	100,0	67,6–100,0

Табела 11. Распределба на цистична ехинококоза кај говеда по години (2020–2022)

Година	Вкупно	Позитивни	Негативни	Преваленца (%)	95% CI
2020	377	186	191	49,3	44,3–54,4
2021	13	13	0	100,0	77,2–100,0
2022	16	14	2	87,5	64,0–96,5

### 5.1.4 Преваленца по региони

Кај овците, преваленцата на цистична ехинококоза значајно се разликуваше меѓу статистичките региони ( $\chi^2(7) = 76,53$ ;  $p < 0,001$ ; Cramér's  $V = 0,286$ ). Најниска преваленца беше утврдена во Источниот регион, додека во повеќето останати региони вредностите беа многу високи (Табела 12).

Кај говедата, регионалните разлики исто така беа статистички значајни ( $\chi^2(7) = 31,87$ ;  $p < 0,001$ ; Cramér's  $V = 0,280$ ). Најниска преваленца беше утврдена во Југозападниот регион, а највисока во Полошкиот регион (Табела 13).

Во одделни региони бројот на испитани животни беше мал, што треба да се има предвид при интерпретацијата на процентуалните вредности.

Табела 12. Распределба на цистична ехинококоза кај овци по региони (2020–2022)

Регион	N	Позитивни	Негативни	Преваленца (%)	95% CI
Југозападен	33	33	0	100,0	89,6–100,0
Југоисточен	3	3	0	100,0	43,8–100,0
Вардарски	40	39	1	97,5	87,1–99,6
Источен	228	178	50	78,1	72,3–83,0
Пелагониски	200	194	6	97,0	93,6–98,6
Полошки	126	123	3	97,6	93,3–99,1
Североисточен	167	160	7	95,8	91,5–98,0
Скопски	141	129	12	91,5	86,0–95,0

Табела 13. Распределба на цистична ехинококоза кај говеда по региони (2020–2022)

Регион	N	Позитивни	Негативни	Преваленца (%)	95% CI
Југозападен	12	0	12	0,0	0,0–24,2
Југоисточен	64	36	28	56,3	44,1–67,7
Вардарски	123	71	52	57,7	48,9–66,1
Источен	6	4	2	66,7	30,0–90,3
Пелагониски	15	11	4	73,3	48,1–89,1
Полошки	13	11	2	84,6	57,8–95,7
Североисточен	50	16	34	32,0	20,8–45,7
Скопски	123	64	59	52,0	43,3–60,6

### 5.1.5 Локализација на цистите по органи

Анализата на локализација на цистите по органи беше извршена кај позитивните животни, односно кај 859 овци и 213 говеда. Кај овците доминираше комбинираната локализација во белите дробови и црниот дроб, додека кај говедата распределбата беше порамномерна, со пониско учество на комбинираната локализација (Табела 14). Разликата во распределбата на локализациите меѓу видовите беше статистички значајна ( $\chi^2(2) = 204,36$ ;  $p < 0,001$ ; Cramér's  $V = 0,437$ ). Во рамки на секој вид, споредбата на зафатеноста на белите дробови наспроти црниот дроб кај позитивните животни беше статистички значајна (McNemar тест,  $p < 0,001$  кај овци и  $p < 0,001$  кај говеда).

Табела 14. Локализација на цистите по органи кај позитивни животни

Вид на животно	Позитивни животни (n)	Само бели дробови n (%)	95% CI	Само црн дроб n (%)	95% CI	Комбинирано n (%)	95% CI
Овци	859	126 (14,7)	12,5–17,2	4 (0,5)	0,2–1,2	729 (84,9)	82,3–87,1
Говеда	213	80 (37,6)	31,3–44,2	36 (16,9)	12,5–22,5	97 (45,5)	39,0–52,2

### 5.1.6 Бројност на цисти

Кај позитивните животни, повеќе од една циста беа утврдени кај 845/859 овци (98,4%) и кај 185/213 говеда (86,9%). Разликата меѓу видовите беше статистички значајна (Fisher's exact test,  $p < 0,001$ ; OR = 9,14; 95% CI: 4,72–17,69).

### 5.1.7 Фертилност на цистите

Фертилноста беше микроскопски оценета кај 294 примероци, од кои 190 потекнуваа од овци, а 104 од говеда. Фертилноста беше значително почеста кај примероците од овци отколку кај примероците од говеда (Табела 15). Разликата меѓу видовите беше статистички значајна (Fisher's exact test,  $p < 0,001$ ; OR = 19,51; 95% CI: 10,59–35,96).

Табела 15. Фертилност на цистите кај овци и говеда

Вид на животно	Испитани примероци (n)	Фертилни (n)	Стерилни (n)	Фертилност (%)	95% CI (Wilson)
Овци	190	158	32	83,2	77,2–87,8
Говеда	104	21	83	20,2	13,6–28,9

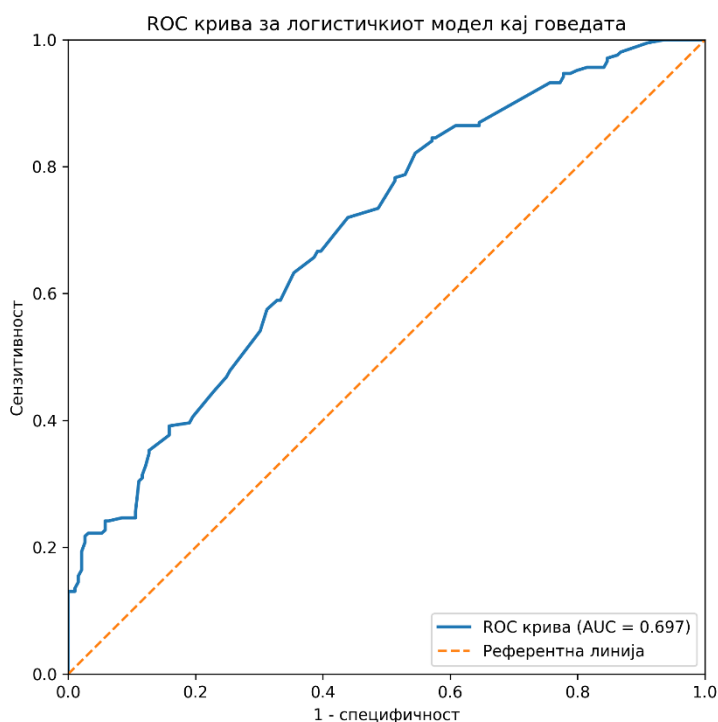
### 5.1.8 Мултиваријабилна анализа кај говедата

Кај говедата, бинарната логистичка регресија покажа дека возраста, периодот и регионот беа значајно поврзани со присуството на цисти (Табела 16). Со секоја дополнителна година старост се зголемуваа шансите за присуство на цисти (aOR = 1,09; 95% CI: 1,02–1,16;  $p = 0,007$ ). Периодот 2021–2022 беше поврзан со повисоки шанси за позитивност во споредба со 2020 година (aOR = 12,30; 95% CI: 2,77–54,57;  $p = 0,001$ ), додека Североисточниот регион имаше пониски шанси за присуство на цисти во споредба со Скопскиот регион (aOR = 0,37; 95% CI: 0,18–0,78;  $p = 0,009$ ). Дискриминацијата на моделот беше умерена (AUC = 0,697), а калибрацијата беше задоволителна (Hosmer–Lemeshow тест,  $p = 0,306$ ). ROC кривата на моделот е прикажана на Сл. 13.

Мултиваријабилна анализа не беше спроведена кај овците поради ограничениот број негативни животни.

Табела 16. Бинарна логистичка регресија за присуство на цисти кај говеда (N = 396) Прикажани се прилагодени odds ratios (aOR), 95% интервали на доверба и p-вредности за значајните предиктори во моделот. Референтни категории: период 2020 и Скопски регион.

Променлива	aOR	95% CI	P-вредност
Возраст (по 1 година)	1,09	1,02–1,16	0,007
Период 2021–2022 (реф.: 2020)	12,30	2,77–54,57	0,001
Североисточен регион (реф.: Скопски)	0,37	0,18–0,78	0,009



Сл.13. ROC крива за логистичкиот модел за присуство на цисти кај говедата. Прикажана е дискриминативната способност на моделот, со AUC = 0,697.

## 5.2 Резултати од молекуларната анализа

### 5.2.1 Генотипска распределба (G1/G3)

За молекуларна генотипизација беа анализирани 69 изолати, од кои 61 од овци и 8 од говеда. Кај овците доминираше генотипот G1 (62,3%), додека кај говедата распределбата на G1 и G3 беше еднаква (50,0% : 50,0%) (Табела 17). Споредбата на распределбата на генотиповите меѓу видовите не покажа статистички значајна разлика (Fisher's exact test,  $p = 0,702$ ).

Во вкупниот анализиран материјал ( $n = 69$ ), генотипот G1 беше застапен со 42 изолати (60,9%), додека G3 со 27 изолати (39,1%).

Анализата на фертилноста покажа дека кај овците 71,1% од G1 и 82,6% од G3 изолатите беа фертилни, додека кај говедата кај двата генотипа беше утврдена еднаква распределба на стерилни и фертилни цисти (50,0% : 50,0%) (Табела 17). Fisher's exact test покажа статистички значајна поврзаност помеѓу видот на домаќинот и статусот на фертилност ( $p < 0,001$ ), со поголем удел на фертилни цисти кај овците.

Табела 17. Распределба на генотипови (G1/G3) во однос на видот на домаќинот и статусот на фертилност ( $n = 69$ )

Вид на животно	Генотип	Стерилни n (%)	Фертилни n (%)	Вкупно	Застапеност на генотип (%)
Овци	G1	11 (28,9%)	27 (71,1%)	38	62,3%
	G3	4 (17,4%)	19 (82,6%)	23	37,7%
Говеда	G1	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4	50,0%
	G3	50,0%	50,0%	4	50,0%

### 5.2.2 Резултати од секвенционирањето (cox1)

За сите 69 анализирани изолати беа добиени валидни cox1 секвенци, при што беше анализирана по една циста од секое животно. Добиените секвенци беа соодветни за понатамошна генотипска идентификација и филогенетска анализа.

### 5.2.3 Подредување на секвенците и BLAST потврда

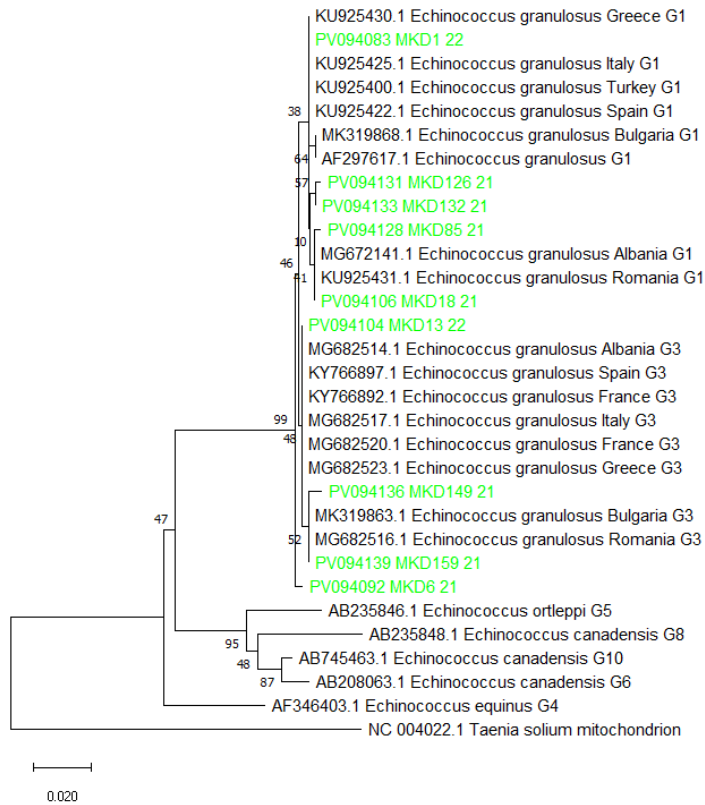
Консензус секвенците беа споредени со референтни секвенци од базата GenBank (NCBI) преку BLAST, при што сите изолати покажаа највисока нуклеотидна сличност со *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1–G3 комплекс) во рамки на анализираниот cox1 фрагмент. Повеќекратното подредување потврди усогласеност со референтните низи за G1 и G3. Во анализираниот сет не беа утврдени наоди што би упатувале на присуство на други таксони од комплексот *Echinococcus granulosus s.l.*, како *Echinococcus equinus*, *Echinococcus ortleppi* или *Echinococcus canadensis*. Репрезентативен приказ на повеќекратното подредување е даден во Прилог 2.

### 5.2.4 Филогенетска анализа

Филогенетската анализа на cox1 секвенците, изведена со neighbor-joining метод, Jukes–Cantor модел и 1000 bootstrap репликации, ги групираше македонските изолати во два јасно одвоени кластера кои соодветствуваа на генотиповите G1 и G3 на *Echinococcus granulosus sensu stricto* (Сл. 14). Раздвојувањето на двата главни кластера беше поддржано со висока bootstrap вредност (99). Македонските изолати се групираа заедно со референтни секвенци од европски земји без јасна географска сегрегација.

Во рамките на G1 кластерот беше утврден интрагенотипен варијабилитет, при што изолатите MKD126, MKD132 и MKD85 формираа посебен подкластер (bootstrap 57), додека останатите изолати беа распределени меѓу референтните секвенци (bootstrap 38–64).

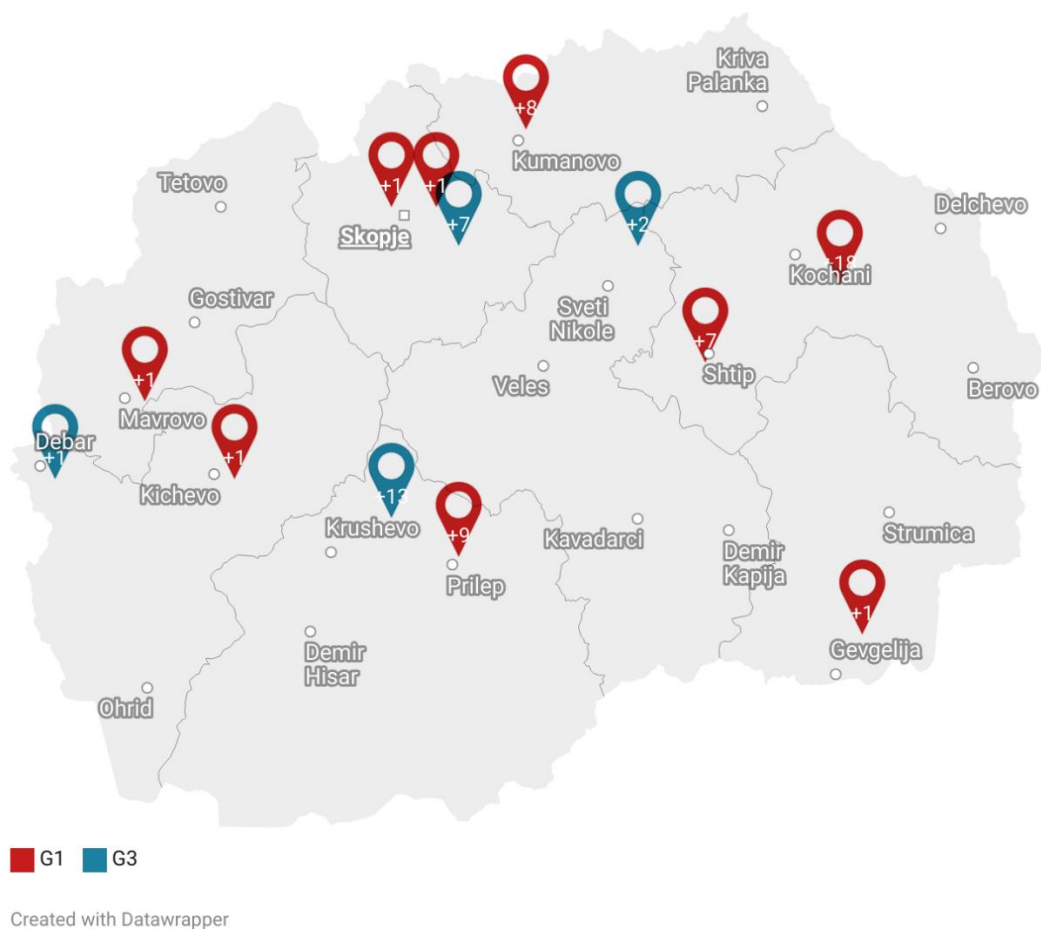
Во G3 кластерот, македонските изолати беа групирани со референтни секвенци од Албанија, Франција, Грција и Романија (bootstrap 52), при што изолатот MKD6 се издвојуваше со најизразена генетска дивергенција и беше позициониран на подолга гранка во однос на останатите G3 изолати. MKD6 потекнуваше од фертилна хидатидна циста изолирана од црн дроб на овца. Кај овците, 19 од 23 G3 изолати беа фертилни, додека кај говедата беше утврдена еднаква распределба на стерилни и фертилни цисти кај двата генотипа.



Сл. 14. Филогенетско стебло на *cox1* секвенци (neighbor-joining, Jukes–Cantor, 1000 bootstrap). Македонските изолати се групираат во два кластера што одговараат на генотиповите G1 и G3 на *Echinococcus granulosus* sensu stricto.

### 5.2.5 Географска распределба на генотиповите

Географскиот приказ на молекуларно типизираните изолати потврди присуство на генотиповите G1 и G3 во анализираниот материјал од повеќе општини и статистички региони. Прикажаната распределба го одразува потеклото на примероците вклучени во молекуларната анализа и не претставува проценка на популациската распространетост на генотиповите на ниво на државата.



Сл. 22. Географска распределба на идентификуваните генотипови G1 и G3 кај *Echinococcus granulosus sensu stricto* (n = 69). Маркерите го прикажуваат потеклото на примероците по општина и статистички регион.

### 5.2.6 GenBank пристапни броеви

Од анализираните секвенци, во GenBank беа депонирани 58 уникатни секвенци, со пристапни броеви PV094083–PV094140. Пристапните броеви на депонираните секвенци се прикажани во Прилог 3. При депонирањето беа вклучени само уникатните секвенци, додека целосно идентичните записи не беа повторно депонирани.

## 6. ДИСКУСИЈА

### 6.1 Општа епидемиолошка слика и позиционирање на наодите

Резултатите од ова истражување покажуваат дека цистичната ехинококоза кај домашните преживари во Република Северна Македонија претставува стабилно присутна и епидемиолошки значајна паразитоза. Вредноста на студијата не произлегува само од големината на кланичниот примерок, туку и од интегрираниот пристап, кој

вклучува епидемиолошка анализа на материјал собран од повеќе кланици, паразитолошка проценка на органската зафатеност и фертилноста на цистите, како и молекуларна карактеризација на изолатите. Разгледани заедно, овие показатели не упатуваат на изолирана или локално ограничена појава, туку на инфекција што е широко распространета и долготрајно одржувана кај домашните преживари. Во таа смисла, сегашните наоди претставуваат надградба на претходно објавените локални податоци, при што епидемиолошката слика на ендемичноста е дополнета со проценка на фертилноста и молекуларна потврда на циркулирачките генотипови (11,12).

Добиените наоди се вклопуваат во епидемиолошкиот профил на балканско-медитеранскиот простор, каде цистичната ехинококоза и натаму опстојува со изразена просторна и популациска хетерогеност. Сепак, споредбите со други земји се најинформативни кога се однесуваат на сличен сточарски, кланичен и ендемичен контекст. Оттука, поголема споредбена вредност имаат студиите од балканскиот и медитеранскиот регион отколку податоците што потекнуваат од значително различни сточарски и производни системи. Во Италија, цистичната ехинококоза кај овците и понатаму е присутна и покрај долгогодишниот надзор, при што се укажува дека болеста може значително да биде потценета во отсуство на унифициран систем за следење (62). Истовремено, молекуларните податоци од оваа земја ја потврдуваат доминацијата на *Echinococcus granulosus* s.s., со присуство на G1 и G3 како главни генотипови, што ја позиционира Северна Македонија во истиот поширок генотипски и епидемиолошки појас (71). Во Босна и Херцеговина, генетската анализа покажува доминација на *Echinococcus granulosus* s.s. со присуство на G1 и G3, но и дополнителна генетска сложеност, што потврдува дека балканскиот простор не е едноличен, туку се одликува со активна и варијабилна ендемичност (54). Поширокиот европски контекст дополнително ја поткрепува оваа интерпретација. Во систематската ревизија на Casulli и сор. која опфаќа молекуларно потврдени хумани случаи на цистична ехинококоза во Европа во периодот 2000–2021, *Echinococcus granulosus* s.s. претставува доминантен комплекс, со 460 од 599 молекуларно карактеризирани цисти (76,8%), при што како главно жариште се издвојуваат јужна и југоисточна Европа, односно медитеранските и балканските земји. Иако хуманите случаи не беа директен предмет на ова истражување, овие податоци се важни за интерпретација и регионално позиционирање на добиените наоди (23). Тие укажуваат дека молекуларниот профил утврден кај домашните преживари во Северна Македонија, особено присуството на G1 и G3 во рамките на *Echinococcus granulosus* s.s., соодветствува на пошироката јужно- и југоисточноевропска шема на доминација на овој комплекс, за разлика од централна и источна Европа, каде почесто се опишуваат генотипови од *Echinococcus canadensis* (52).

Во локален контекст, претходно објавениот труд од Северна Македонија покажа вкупна преваленца од 60% кај заклани говеда и овци, доминантна зафатеност на белите дробови и црниот дроб и значително повисока фертилност кај овците отколку кај говедата (11). Сегашната студија не ги поништува тие наоди, туку ги продлабочува. Поширокиот примерок, тригодишниот опфат и дополнителната генотипизација овозможуваат попрецизна стратификација по вид, време и простор, како и поцврста интерпретација на епидемиолошката улога на овците и говедата. Затоа, добиените резултати најсоодветно се читаат како поцелосна потврда на ендемичноста, а не како радикално нова слика што е во спротивност со претходното локално искуство (11,12).

Истовремено, интерпретацијата на овие наоди мора да остане критична. Бидејќи станува збор за кланично базирана студија, добиените вредности не треба автоматски да се изедначуваат со популациска преваленца кај сите домашни преживари во државата. Животните испратени на колење не претставуваат случаен примерок од целата популација, а кај овците е особено веројатно поголемо учество на постари, репродуктивно исцрпени или продуктивно отфрлени грла. Поради тоа, добиените вредности најверојатно ја одразуваат акумулираната инфекција во кланичната популација. Сепак, и покрај ова ограничување, исклучително високата позитивност кај овците тешко може да се објасни само со селекцискиот состав на примерокот. Поверојатно е дека наодот ја одразува комбинацијата од висока изложеност на инфекција и специфичниот состав на кланичниот материјал, во кој веројатно преовладувале животни со подолготрајна изложеност и поголема веројатност за развој на видливи лезии. Вклучувањето на овој критички аспект не го намалува значењето на студијата, туку придонесува за попрецизна методолошка интерпретација на резултатите (62).

## **6.2 Преваленца според видот на домаќинот: биолошка основа и споредливост**

Изразената разлика во преваленцата меѓу овците и говедата претставува еден од клучните наоди на истражувањето. Таквиот контраст има јасна биолошка и епидемиолошка основа и се вклопува во добро познатиот модел на цистична ехинококоза кај домашните преживари, според кој овците имаат поцентрална улога како меѓудомаќини, додека кај говедата, и покрај честата изложеност, почесто се развиваат стерилни, дегенеративни или калцифицирани лезии. Затоа, повисоката преваленца кај овците не треба да се толкува само како нумеричка разлика, туку и како показател дека токму овој вид има поистакната улога во одржувањето на паразитот во локалниот циклус на пренесување (11,63).

Сепак, вредноста добиена кај овците бара внимателна интерпретација. Таа е толку висока што оправдано го отвора прашањето колкав дел од резултатот произлегува од реално интензивно пренесување, а колкав дел од составот на примерокот. Најверојатно се присутни и двата механизма. Од една страна, преваленца од ваков обем, добиена во голем примерок, тешко може да се смета за чист статистички артефакт. Од друга страна, со кланичен дизајн не може целосно да се исклучи влијанието на возраста, производната историја и причините за испраќање на животните на колење. Поради тоа, овие вредности посоодветно е да се толкуваат како показател за многу висока акумулирана изложеност и долготрајно одржување на инфекцијата во овчата кланична популација, отколку како строга национална популациска проценка. Токму оваа нијанса е суштинска: резултатот останува силен, но неговото толкување останува методолошки дисциплинирано (11,62).

Кај говедата, умерено високата преваленца има поинакво, но исто така важно значење. Таа укажува дека контаминацијата на средината не е ограничена само на системи во кои овците ја носат главната тежина во одржувањето на циклусот, туку е доволно изразена за јасно да се регистрира и кај говедата како секундарен, но епидемиолошки релевантен домаќин. Сепак, таквиот наод не треба да се толкува како доказ за еднаква улога на двата вида во одржувањето на циклусот. Кога преваленцата кај говедата се разгледува заедно

со пониската фертилноста, поверојатно е дека тие животни го одразуваат интензитетот на изложеноста на инфекција, отколку што претставуваат подеднакво важен извор за продолжување на циклусот. Во таа смисла, говедата можат да се разгледуваат како добар биолошки показател за присуство и широчина на ендемичноста, но не и како домаќин со иста епидемиолошка улога како овците (11,54,63).

Во компаративна смисла, грчките податоци се особено корисни затоа што претставуваат медитерански ендемичен контекст со подетално опишана инфекциска динамика кај добитокот. Chaligiannis и сор. известуваат за 30,2% преваленца кај овците и ниска фертилноста на цистите, при што молекуларната анализа покажува доминација на *Echinococcus granulosus* s.s. (56). G1 и профил што авторите го поврзуваат со класичен овчарски циклус. Разликата во однос на резултатите од ова истражување не треба едноставно да се чита како повисока или пониска ендемичност, туку како одраз на различен сточарски систем, различна кланична структура и различен степен на контрола. Вредноста на оваа споредба е во тоа што покажува дека и во рамки на истиот медитеранско-балкански појас можат да постојат значајни разлики во интензитетот на инфекцијата и во биолошката активност на цистите (63).

Италијанските и сардинските студии се релевантни затоа што потекнуваат од медитерански подрачја со добро документирана и висока застапеност на *Echinococcus granulosus* s.s. Во анализата на Loi и сор. цистичната ехинококоза кај овците во Италија е прикажана како перзистентна и потценета поради неунифициран надзор, додека Bosco и сор. (82) опишуваат висока преваленца кај овци и кози во хиперендемично медитеранско подрачје, со доминација на зафатеност на црниот дроб и белите дробови и со G1–G3 профил кај изолатите. Овие студии не се важни затоа што бројките се идентични со македонските, туку затоа што покажуваат дека многу висока застапеност кај мали преживари е епидемиолошки разбирлива во системи со долготрајно одржуван циклус и континуиран контакт меѓу изворот на инфекција и сточарската средина (62,82).

Во таа рамка, споредбата на податоците од оваа теза со претходно објавените локални податоци добива дополнително значење. Претходно објавената анализа не покажа толку изразена разлика меѓу овци и говеда како сегашната студија, што најверојатно се должи на значително помалиот примерок и покусиот временски опфат. Овој наод укажува на важноста на големината и составот на примерокот за епидемиолошката интерпретација. Во сегашната анализа, со значително поголем број испитани животни и поширок опфат, контрастот меѓу видовите се издвојува појасно и со поголема статистичка стабилност. Затоа, добиените резултати не треба да се читаат како контрадикторни на претходно објавените локални податоци, туку како поцврста и појасно дефинирана проценка на улогата на домаќинот во истата ендемична средина (11).

### **6.3 Просторна хетерогеност и интерпретација на регионалните разлики**

Регионалните разлики во преваленцата кај овците и говедата беа статистички значајни, што укажува дека инфекцијата не е рамномерно распределена низ државата. Ваквиот наод е епидемиолошки очекуван кај цистичната ехинококоза, бидејќи нејзината просторна распределба ретко е хомогена. Наместо тоа, обично се формираат подрачја со различен интензитет на изложеност, зависно од типот на сточарство, движењето на животните, организацијата на колењето и локалните практики за постапување со

заразени органи. Во таа смисла, добиените резултати укажуваат дека во Северна Македонија не постои хомогена ендемичност, туку изразена просторна варијабилност меѓу регионите.

Сепак, статистичката значајност сама по себе не значи дека секој регион може сигурно да се рангира според ризикот. Дел од проценките, особено кај говедата, се темелат на релативно мал број животни, што ги прави почувствителни на случајна варијација. Поради тоа, регионалната анализа најсоодветно треба да се толкува како доказ дека ризикот не е униформен, но не и како дефинитивно картографирање на жаришта во строга епидемиолошка смисла. Просторниот сигнал е реален, но неговата прецизност не е иста во сите подгрупи.

Чилеанската студија на *Hombo* и сор. претставува добар пример дека широка распространетост на болеста не ја исклучува можноста за постоење локални жаришта со повисок ризик. Авторите покажуваат дека на ниво на целата испитувана област просторната распределба на цистичната ехинококоза кај добитокот не отстапувала значајно од хомогена распределба, иако на локално ниво биле идентификувани статистички значајни кластери со висок ризик. Оваа паралела е важна бидејќи покажува дека општата присутност на болеста во еден систем не ја исклучува можноста за локални просторни разлики во ризикот, туку двете појави често коегзистираат (91).

Слична слика е опишана и во јужна Италија. *Vosco* и сор. прикажуваат висока преваленца кај овци и кози, но со умерено просторно групирање на позитивните животни. Ова е релевантно за македонскиот контекст, бидејќи се работи за медитеранско подрачје со споредлив тип на ендемичност и со *Echinococcus granulosus* s.s. како доминантен генотипски профил. Вредноста на оваа споредба не е во идентичноста на бројките, туку во тоа што покажува дека просторното ширење на болеста може да биде нерамномерно и покрај нејзината широка распространетост во целиот систем (82).

Романските податоци кај говедата додаваат уште една важна перспектива. *Dăgăbuș* и сор. покажуваат дека и во систем со значително пониска вкупна преваленца сепак постои географска распределба на случаите, односно дека просторната хетерогеност не е ограничена само на хиперендемични средини. Ова е значајно за интерпретацијата на сегашните резултати, бидејќи покажува дека самото постоење на регионални разлики не ја прави македонската состојба исклучителна. Тежината на наодот произлегува од тоа што овие разлики се јавуваат во контекст на многу висока вкупна преваленца, особено кај овците (63).

Дополнителна методолошка нијанса внесува и египетската студија на *El-Dakhly* и сор. во која позитивните животни не биле рамномерно распределени меѓу кланиците, туку покажувале концентрација во одредени објекти и кај одделни видови. Иако таквиот наод не е директно споредлив со македонската регионална карта, неговото значење е јасно: просторната слика добиена преку кланични податоци не мора целосно да го одразува вистинскиот географски ризик, туку може делумно да биде условена и од организацијата на снабдување на кланиците. Во таа смисла, регионалните резултати од ова истражување најсоодветно треба да се интерпретираат како доказ за просторна нерамномерност на инфекцијата, но не и како дефинитивна епидемиолошка карта на ризикот во државата. Сегашното истражување обезбедува силен сигнал дека ризикот не е еднаков во сите

региони и дека постојат подрачја во кои инфекцијата е поизразена, но ограничувањата на примерокот налагаат претпазливост во дефинитивното рангирање на поединечни региони (92).

#### **6.4 Локализација и бројност на цистите по органи: епидемиолошка интерпретација**

Разликите во локализацијата на цистите по органи меѓу овците и говедата упатуваат на различна манифестација на инфекцијата кај двата вида. Кај овците доминираше комбинираната локализација во белите дробови и црниот дроб, додека кај говедата локализацијата беше порамномерна, со поголем удел на изолирани локализации, особено хепатални. Ваквиот распоред е во согласност со општата биологија на цистичната ехинококоза кај домашните преживари. Според WHO/OIE прирачникот, кај овците и говедата белите дробови и црниот дроб се најчесто засегнатите органи, додека зафатеноста на други органи е значително поретка (27). И претходно објавените податоци од Северна Македонија покажаа дека токму овие два органа се главни локализации на цистите кај говедата и овците, со висока застапеност на комбинирана инфекција и повеќекратни цисти (11).

Биолошката основа на оваа распределба е добро позната и се поврзува со т.н. хепатопулмонален „филтер“. По ингестијата на јајцата и ослободувањето на онкосферите, црниот дроб претставува прва анатомска бариера, а белите дробови втора, поради што токму овие два органа најчесто ја носат главната тежина на инфекцијата. Сепак, присуството на цисти во двата органа не треба да се сведува само на анатомска шема. Во ендемични системи, комбинираната локализација и повеќекратноста на цистите најчесто упатуваат и на повторувана изложеност низ времето, особено кај животни што подолго остануваат во контаминирана средина. Таква интерпретација е поддржана и од сардинската студија, каде кај овците беше документирана значајна зафатеност и на белите дробови и на црниот дроб, како и повеќекратна инфекција во двата органа, со тренд на зголемување на комбинираната локализација и масивната инфекција со возраста (93). Слично, во јужна Италија кај овци и кози белите дробови и црниот дроб биле најчесто засегнати, при што значителен дел од животните имале повеќе од еден инфициран орган (82).

Доминацијата на комбинираната локализација кај овците, за разлика од ретката изолирана хепатална зафатеност, најверојатно е поврзана со интензивна и долготрајна изложеност на инфекција. Бидејќи станува збор за кланичен материјал, не може со сигурност да се исклучи влијанието на возраста, времетраењето на инфекцијата и селекцијата на животните за колење. Почестата изолирана хепатална локализација и понискиот удел на комбинирана зафатеност кај говедата укажуваат дека инфекцијата кај овој вид има поинаква органска распределба и веројатно поинаква динамика на развој. Романската студија кај говеда покажа дека цистите главно биле локализирани во белите дробови и црниот дроб, но дека белодробната локализација доминирала, а голем дел од животните имале и зафатеност на двата органа (63). Во претходно објавените македонски податоци кај говеда, исто така, белите дробови биле најчеста локализација, следени од црниот дроб, при што половина од позитивните животни имале цисти во двата органа (11). Во таа смисла, и во исти локални услови може да постои варијабилност во органската распределба, што веројатно е под влијание на возраста на животните, времетраењето на инфекцијата, интензитетот на изложеноста и морфолошкиот развој на лезиите, бидејќи кај говедата цистите почесто се дегенеративни, калцифицирани и со ограничена паразитска активност (63).

И бројноста на цистите се движи во иста интерпретативна насока. Претходната локална студија покажа дека и кај говедата и кај овците повеќе од една циста се јавуваат значително почесто од единечни лезии, и во белите дробови и во црниот дроб (11). Податоците од Сардинија дополнително покажуваат дека кај овците не само што е честа повеќеорганска инфекција, туку кај дел од животните се среќава и масивна инфекција со повеќе од десет хидатиди, што авторите ја поврзуваат со долготрајна изложеност и повторна инфекција низ времето (93). Во јужна Италија, Bosco и сор. исто така опишуваат голем број цисти во белите дробови и црниот дроб, што укажува дека бројноста на цистите е тесно поврзана со хроничноста на процесот (82) .

Податоците од Египет дополнително потврдуваат дека доминантната органска локализација може да варира зависно од домаќинот и локалниот епидемиолошки контекст. El-Dakhly и сор. покажуваат дека кај овците во Египет црниот дроб бил почесто засегнат од белите дробови, додека кај камилите доминирала белодробната локализација. Овој наод укажува дека органската распределба не е апсолутно фиксна, туку може да варира зависно од видот на домаќинот, локалните услови и стадиумот на развој на лезиите. Поради тоа, разликите меѓу македонските и одделни странски наоди не треба да се толкуваат како противречност, туку како потврда дека органската локализација останува биолошки конзистентна во рамки на белодробно-хепаталниот профил, иако не е идентична во сите ендемични системи (92).

Практичната импликација на овие резултати е и методолошки важна. Во систем каде комбинираната локализација и повеќекратните цисти се чести, особено кај овците, ограничена инспекција насочена само кон еден орган би довела до потценување на инфекцијата. Токму затоа, систематскиот преглед на белите дробови и црниот дроб во ова истражување претставува јасна методолошка предност и ја зголемува веројатноста добиената преваленца и профилот на распределбата на цистите по органи да ја одразуваат реалната тежина на кланичниот наод.

## **6.5 Фертилноста на цистите како показател за потенцијалот за одржување на циклусот**

Фертилноста на цистите има централно значење во интерпретацијата на цистичната ехинококоза, бидејќи овозможува да се разграничи присуството на лезии од нивната реална паразитолошка активност. Додека преваленцата покажува колку често се детектира инфекцијата, фертилноста укажува колкав дел од таа инфекција има вистински потенцијал за продолжување на циклусот. Изразено повисоката фертилноста кај овците во однос на говедата укажува дека двата вида немаат иста улога во епидемиолошкото одржување на инфекцијата. Таквиот резултат е во согласност со претходно објавените локални податоци, каде исто така беше утврдено дека овците имаат значително повисок удел на фертилни цисти од говедата (11).

Разликата во фертилноста меѓу овците и говедата има јасна биолошка основа и е во согласност со познатите разлики во нивната улога како меѓудомаќини. Овците традиционално се сметаат за попродуктивен меѓудомаќин за *Echinococcus granulosus* s. s., бидејќи кај нив цистите почесто содржат протосколекси и задржуваат паразитолошка активност. Во локален контекст, оваа разлика е особено важна, затоа што овозможува преваленцата да не се чита само како показател за застапеност, туку и за биолошката активност на инфекцијата. Кога високата позитивност кај овците се комбинира со висок

удел на фертилни цисти, резултатот упатува не само на честа инфекција, туку и на висок потенцијал за одржување на локалниот циклус на пренесување.

Сепак, и овде е потребна претпазливост. Високата фертилност кај овците не значи дека сите позитивни животни имаат исто паразитолошко значење, ниту дека фертилноста претставува стабилна и непроменлива категорија. Студијата во Сардинија покажува пониска фертилност на ниво на животно отколку што е утврдена во ова истражување, но истовремено и разлики меѓу органите, со повисока фертилност на белодробните во однос на хепаталните цисти, како и зависност од возраста на животните (93). Ова укажува дека фертилноста може значително да варира според локализацијата, хроничноста на процесот, возраста на домаќинот и локалните епидемиолошки услови. Поради тоа, високата фертилност утврдена во ова истражување најсоодветно треба да се интерпретира како карактеристика на анализираниот кланичен материјал, а не како апсолутна особина на секоја инфекција кај овците во пошироката популација.

Компаративните податоци од други земји дополнително ја нагласуваат оваа варијабилност. Во грчката студија на Chaligiannis и сор. фертилноста кај овците била значително пониска од онаа утврдена во ова истражување, и покрај тоа што молекуларната анализа покажала доминација на *Echinococcus granulosus* s.s. G1. Тоа укажува дека и во рамки на медитеранско-балканскиот простор може да постојат значајни разлики во биолошката активност на цистите, што најверојатно е поврзано со разлики во домаќинот, возраста, органската локализација и локалниот епидемиолошки контекст (56). Египетските податоци на El-Dakhly и сор. исто така покажуваат пониска фертилност и повисок удел на дегенеративни и калцифицирани цисти, што дополнително потврдува дека фертилноста не е фиксна биолошка карактеристика, туку варијабилен параметар што зависи од повеќе фактори (91). Слично, студија во Пакистан покажува присуство на фертилни, стерилни и калцифицирани цисти кај различни видови домаќини, при што авторите нагласуваат дека споредбата меѓу студии мора да ја земе предвид и методологијата на класификација на цистите (94).

Наодите кај говедата бараат поинаква интерпретација. Иако фертилноста е значително пониска, тоа не значи дека говедата се без епидемиолошко значење. Попрецизно е да се каже дека нивната улога е ограничена во споредба со овците. Претходно објавените локални податоци и романската студија покажуваат дека и кај говедата можат да се сретнат фертилни цисти, но во многу помал удел од оној кај овците (11,63). Оттука, добиените резултати најсилно укажуваат дека овците претставуваат доминантен продуктивен меѓудомаќин, додека говедата првенствено ја одразуваат широчината на изложеноста на инфекција и носат ограничен, но не целосно занемарлив паразитолошки потенцијал.

Оттука, добиените резултати најсилно укажуваат дека овците претставуваат доминантен продуктивен меѓудомаќин, додека говедата првенствено ја одразуваат широчината на изложеноста на инфекција и носат ограничен, но не целосно занемарлив паразитолошки потенцијал.

## **6.6 Генотипска структура и епидемиолошко значење на G1/G3 профилот кај овци и говеда**

Молекуларните наоди во ова истражување имаат особено значење, бидејќи овозможуваат епидемиолошката слика добиена со кланичниот преглед и проценката на фертилноста да се поткрепи и на генотипско ниво. Потврдата на *Echinococcus granulosus* s. s., со присуство на G1 и G3, покажува дека во анализираниот материјал циркулираат генотипови типични за домашниот циклус на цистична ехинококоза во балканско-медитеранскиот простор. Во таа смисла, молекуларниот дел од студијата не претставува само дополнување на паразитолошките наоди, туку и нивна генотипска потврда, што ја вградува локалната кланична слика во пошироката регионална шема на циркулација (12).

Особено е важно што двата генотипа беа утврдени и кај овци и кај говеда. Овој наод упатува дека двата вида меѓудомаќини најверојатно биле изложени на заеднички или преклопувачки извор на инфекција, односно дека G1 и G3 циркулираат во истиот домашен циклус на пренесување. Најверојатното објаснување е инфекција на кучињата како дефинитивни домаќини преку пристап до инфицирани органи од овци и говеда, било преку кланичен отпад, домашно колење или мрши. Во такви услови, кучињата можат да се инфицираат со двата генотипови и потоа да ја контаминираат средината со јајца од G1 и G3, што создава можност за паралелна изложеност на различни видови добиток на заеднички пасишта. Ваквата слика е во согласност со согледувањата на Kinkar и sor., според кои во подрачја со висок интензитет на пренос пристапот на кучињата до мешан инфективен материјал може да овозможи размена на генетски варијанти меѓу G1 и G3 и да придонесе за одржување на релативно хомогена популациска структура (60,69).

Во исто време, добиените резултати укажуваат дека овците веројатно имаат поважна улога како функционални меѓудомаќини во одржувањето на циклусот на *Echinococcus granulosus* s.s. во испитуваниот епидемиолошки контекст. Особено значаен наод е високиот степен на фертилност кај овците инфицирани со генотипот G3, каде 82,6% од изолатите беа фертилни, за разлика од говедата, кај кои кај двата генотипа доминираа стерилни цисти. Оваа разлика во биолошкиот потенцијал беше статистички потврдена со Fisher's exact test ( $p < 0,001$ ) и укажува дека овците не се само пасивни носители на G3, туку домаќини кај кои овој генотип успешно го достигнува инфективниот метацестоден стадиум. Ваквиот наод е во согласност со Yanagida и sor. кои укажуваат дека биолошката адаптација на G3 може да варира меѓу различни ендемски подрачја (8). Во тој контекст, добиените резултати сугерираат дека овците имаат централна улога во одржувањето на трансмисијата, додека детекцијата на G1 и G3 кај овци и кај говеда укажува дека во македонските епидемиолошки услови овие генотипови не покажуваат строга поврзаност со еден домаќински вид.

Филогенетската анализа дополнително ја нагласува комплексноста на оваа слика. Забележаниот интрагенотипен варијабилитет во рамките на G1 и G3 укажува на генетска хетерогеност на македонските изолати на *Echinococcus granulosus* s.s. Во G1 кластерот, изолатите MKD126, MKD132 и MKD85 формираа посебен подкластер, додека во G3 кластерот изолатот MKD6 покажа најизразена генетска дивергенција. Тоа може да се поврзе со континуирана циркулација на паразитот во испитуваниот простор и со присуство на повеќе блиски, но неидентични варијанти во рамките на истите генотипови. Особено е интересно што MKD6 потекнува од фертилна циста од овца, што дополнително го нагласува епидемиолошкото значење на G3 кај овој домаќин. Во

интерпретативна смисла, овој наод е во согласност со теоретските поставки на Lymbery и сор. за генетска дивергенција кај *Echinococcus*, а присуството на микро-варијации може да се разгледува и во контекст на вкрстено оплодување овозможено преку истовремена инфекција на кучињата со протосколекси од различно потекло (95). Сепак, можната поврзаност помеѓу варијациите во *cox1* и биолошките својства на изолатите треба да се толкува претпазливо, имајќи ги предвид ограничениот број анализирани изолати и фактот дека интерпретацијата се заснова на еден митохондриски маркер.

Во европски и регионален контекст, добиениот генотипски профил се вклопува во пошироката слика на доминација на *Echinococcus granulosus* s.s. кај цистичната ехинококоза, особено во јужна и југоисточна Европа (23). Податоците од Босна и Херцеговина и Србија, каде исто така е потврдена коциркулација на G1 и G3 кај домашни животни, ја зајакнуваат проценката дека Северна Македонија припаѓа на истиот поширок балканско-медитерански генотипски појас (54,58). За разлика од тоа, централно- и источноевропските системи, како што покажуваат податоците од Полска и Украина, почесто вклучуваат поизразена улога на *Echinococcus canadensis* G7 и различна вклученост на домаќините (72,73). Во таа смисла, генотипската структура утврдена во ова истражување е поконзистентна со медитеранско-балканскиот модел на циркулација отколку со северните и источните европски модели.

Во поширока компаративна рамка, поновите молекуларни податоци дополнително ја зацврстуваат епидемиолошката важност на G1/G3 профилот. Податоците од Xinjiang покажуваат доминација на *Echinococcus granulosus sensu stricto* кај животни и луѓе, со што повторно се нагласува неговата централна улога во активниот домашен циклус на пренесување. Во иста насока се и поновите наоди од САД, каде G1 и G3 се идентификувани кај овци и говеда, што укажува дека овој генотипски профил не е ограничен само на класичните медитерански ендемични подрачја, туку има поширока циркулација. Значењето на овие студии не е во нивната директна споредливост со балканскиот контекст, туку во тоа што дополнително ја поддржуваат интерпретацијата дека детекцијата на G1 и G3 во ова истражување не претставува локална или атипична појава, туку дел од поширока и биолошки конзистентна циркулација на *Echinococcus granulosus sensu stricto*, во која G1/G3 останува доминантно поврзан со домашниот циклус на цистична ехинококоза (74,75).

Сепак, интерпретацијата на генотипската структура во ова истражување мора да остане критична. Бројот на генотипизирани изолати е доволен за да се потврди доминантниот профил, но не и за да се исклучи присуство на ретки генотипови или да се изведуваат посложени заклучоци за популациската структура на паразитот, особено поради отсуството на цисти од други видови животни и ограничениот број говедски изолати. Поради тоа, разликите меѓу овци и говеда на генотипско ниво не треба да се преинтерпретираат. Најсоодветно е да се заклучи дека ова истражување сигурно ја потврдува циркулацијата на *Echinococcus granulosus* s.s., со G1 и G3 како главни генотипови, и силно ја поддржува општата епидемиолошка и паразитолошка интерпретација, но не овозможува дефинитивни заклучоци за фината распределба на генотиповите по домаќин, регион или субпопулација, ниту детален популациско-генетски модел (12,60).

Кога овие молекуларни резултати се разгледуваат заедно со високата преваленца и високата фертилноста кај овците, добиената слика станува уште појасна. Не станува збор само за честа инфекција, туку за присуство на генотипски профил што е типичен за домашниот овчарски циклус на цистична ехинококоза. Токму затоа, генотипската структура утврдена во ова истражување има значење што го надминува чисто лабораторискиот опис: таа ја поврзува локалната кланична слика со пошироката молекуларна епидемиологија на болеста во регионот и дополнително ја зајакнува тезата дека овчарскиот циклус претставува клучен двигател на ехинококозата во земјата.

### **6.7 Мултиваријабилна анализа кај говедата: значењето на возраста, периодот и регионот**

Мултиваријабилната анализа кај говедата претставува важен аналитички дел од студијата, бидејќи овозможува ефектите на поединечните фактори да се разгледуваат во меѓусебна поврзаност, а не изолирано. Резултатите покажуваат дека возраста, периодот и регионот се значајно поврзани со присуството на инфекцијата, што укажува дека преваленцата кај говедата не е случајно распределена, туку е обликувана од комбинација на биолошки и епидемиолошки фактори. Во таа смисла, логистичкиот модел не претставува само статистичка потврда на веќе забележаните разлики, туку и поцврста рамка за интерпретација на факторите поврзани со присуството на цисти во анализираниот кланичен материјал.

Најконзистентен и биолошки најлогичен резултат е асоцијацијата со возраста. Овој наод е во согласност со хроничниот карактер на цистичната ехинококоза, при што веројатноста за детекција на цисти расте со времетраењето на изложеноста и со староста на животното. Сличен образец е документиран и во студијата од Алтајскиот регион на Xinjiang, каде возраста беше јасно поврзана со преваленцата кај добитокот, што авторите го интерпретираат како последица на акумулирана изложеност низ годините (96). И чилеанската студија на Hombo и сор. укажува дека постарите животни имаат повисок ризик од инфекција (91). Во тој контекст, наодот за возраста кај говедата во ова истражување е биолошки убедлив и веројатно претставува најстабилниот резултат на моделот.

Периодот, односно разликата меѓу 2020 и 2021–2022 година, бара повнимателна интерпретација. Иако статистичкиот ефект е изразен, тој не треба автоматски да се чита како доказ дека изложеноста на инфекцијата навистина се променила во тој период. Како што беше нагласено и при разгледувањето на распределбата по години, бројот на говеда во поновите години е значително помал, што ја зголемува чувствителноста на моделот на случајна варијација и на составот на примерокот. Во кланични студии, ваквите ефекти често можат да одразуваат и разлики во возраста на животните, нивното потекло, производната категорија или во начинот на кој животните стигнале до кланица. Италијанските податоци на Loi и сор. и грчките податоци на Chaligiannis и сор. покажуваат дека разликите меѓу периодите во кланичните серии не мора нужно да значат дека се променил и реалниот интензитет на пренесувањето, бидејќи врз нив можат да влијаат и начинот на надзор, методологијата и кланичната покриеност (56,62). Поради тоа, ефектот на периодот во ова истражување најсоодветно е да се разгледува како

показател за временска варијабилност во анализираниот примерок, а не како сигурен доказ за вистинска промена во интензитетот на пренесувањето.

Регионалниот ефект исто така е значаен, но и тука е потребна претпазливост. Фактот што одреден регион останува значаен и по прилагодување за возраст и период укажува дека постојат локални разлики што не се објаснуваат само со составот на примерокот. Тоа е епидемиолошки очекувано, бидејќи и просторната распространетост на цистичната ехинококоза во други земји покажува регионална нерамномерност. Чилеанската студија на *Hombo* и сор. и јужноиталијанската студија на *Bosco* и сор. прикажуваат слична појава на локални разлики во ризикот, дури и кога болеста е широко распространета (82,91). Во таа смисла, регионалниот ефект кај говедата во ова истражување најверојатно упатува на реална просторна нерамномерност, но не е доволен сам по себе за да се извлечат цврсти заклучоци за причините за таа разлика.

Токму тука се појавува и главното ограничување на моделот. Возраста, периодот и регионот се значајни, но тие претставуваат посредни, а не директни показатели на изложеноста. Во моделот не беа вклучени податоци за фармските услови, начинот на одгледување, контактот со кучиња, домашното колење или локалните практики за постапување со отпад. Поради тоа, иако моделот покажува кои фактори се статистички поврзани со инфекцијата, тој не може целосно да одговори зошто овие асоцијации постојат на теренско ниво. Кај паразитози со хроничен тек и повеќефакторска изложеност, варијабилноста ретко може целосно да се објасни само со неколку демографски и просторни променливи. Поважно е што моделот издвојува биолошки и епидемиолошки смислени асоцијации, особено ефектот на возраста, и покажува дека кај говедата инфекцијата не е случајна, туку следи препознатливи обрасци. Оттука, мултиваријабилната анализа не треба да се чита како обид за целосно моделирање на инфекцијата, туку како поцврст аналитички чекор кон разбирање на факторите што најконзистентно се поврзани со присуството на цисти во кланичниот материјал.

Мултиваријабилната анализа беше спроведена само кај говедата, бидејќи кај овците исклучително високата преваленца и малиот број негативни животни не овозможуваа доволно стабилна проценка на независните асоцијации. Овој пристап не значи дека возраста, периодот и регионот немаат епидемиолошко значење и кај овците, туку дека во рамки на достапниот кланичен материјал нивниот независен ефект не можеше методолошки уверливо да се издвојува со ист степен на статистичка сигурност.

## **6.8 Кучињата како дефинитивни домаќини: европски искуства и празнини во локалниот контекст**

Во епидемиологијата на цистичната ехинококоза, дефинитивните домаќини претставуваат клучна алка во одржувањето на циклусот, бидејќи присуството на возрасни тени кај кучињата и другите каниди директно ја одредува контаминацијата на средината со јајца. Поради тоа, интервенциите насочени кон кучињата имаат потенцијал најбрзо да влијаат врз динамиката на пренесувањето. Европскиот систематски преглед за медитеранско-балканскиот регион покажува дека преваленцата кај кучињата може значително да варира зависно од подрачјето, типот на кучешка популација и применетата методологија, што укажува дека кучешкиот дел од циклусот е силно чувствителен на локалниот епидемиолошки и организациски контекст (10). Оттука, дури и умерена

застапеност кај кучињата може да биде доволна за одржување на висока инфекција кај овците, особено во услови на континуирана пасишна изложеност и долготрајна опстојливост на јајцата во средината.

Надзорот кај кучињата, сепак, претставува методолошки предизвик. Класичната копролошка анализа има ограничувања поради интермитентно исфрлање на јајца и недоволна специфичност, поради што во контролните програми често се користат копроантиген ELISA и/или копро-PCR како посоодветни алатки за мониторинг и евалуација (97–99). Европските искуства покажуваат дека ваквиот пристап е и методолошки и логистички применлив. Во Кипар, на пример, копроантиген ELISA бил користен во рамки на надзор на големи популации кучиња, што покажува дека ваквиот модел не е ограничен само на експериментални услови, туку може да биде дел и од практичен програмски пристап (100). Турските податоци се особено релевантни за споредба со балканско-медитеранскиот контекст, бидејќи укажуваат дека нетретираниите кучиња и кучињата кои се движат слободно имаат значително повисок ризик и дека без систематски надзор кај дефинитивните домаќини тешко може да се разбере зошто инфекцијата останува висока кај овците (101).

Во локален контекст, токму тука се наоѓа една од најважните празнини на сегашната епидемиолошка слика. Иако резултатите кај овците и говедата силно упатуваат на активен домашен циклус, недостига систематски надзор кај дефинитивните домаќини, вклучително домашните кучиња, овчарските кучиња и кучињата кои се движат слободно. Ова ограничување не е споредно, бидејќи без податоци од кучешката популација е тешко да се процени реалниот интензитет на контаминацијата, да се идентификуваат стабилни жаришта и да се следи ефектот од евентуалните контролни мерки. Поради тоа, научно оправдана следна насока би била воведување двостепен надзор, со попречен скрининг преку копроантиген ELISA во подрачја со висока кланична преваленца и потврда со копро-PCR во подгрупи, паралелно со собирање податоци за сопственоста, третманот и движењето на кучињата. Таквиот пристап би овозможил кланичните наоди кај преживарите да се поврзат со клучната, но засега недоволно осветлена, кучешка алка во циклусот (10,47,64).

Сепак, истовременото присуство на G1 и G3 кај овците и говедата индиректно укажува дека кучињата како дефинитивни домаќини најверојатно се вклучени во одржувањето на заеднички локален циклус на пренесување. Иако теоретски симултаната инфекција на кучињата со различни генотипови може да создаде услови за поголема генетска разновидност на паразитот (8,60,95), во локален контекст клучниот проблем останува отсуството на директни податоци од кучешката популација. Поради тоа, систематскиот надзор кај домашни, овчарски и кучиња без сопственик претставува неопходен следен чекор за појаснување на нивната реална улога во одржувањето на инфекцијата.

## **6.9 Домашното колење и управувањето со органи како критична точка во одржувањето на циклусот**

Една од најконзистентно опишаните ризични практики во ендемични подрачја е домашното, односно неконтролираното колење, проследено со пристап на кучињата до

инфицирани органи. Систематските анализи на факторите на ризик покажуваат дека слободното движење на кучињата, пристапот до кланичен отпад и домашното колење се поврзани со одржувањето на циклусот на цистична ехинококоза (64). Во медитеранските и балканските услови, дури и кога постои формален кланичен систем, неговиот ефект врз контролата може да биде ограничен ако значаен дел од колењето останува надвор од организиран надзор или ако управувањето со отпадот е неефикасно (44). Поради тоа, домашното колење не треба да се разгледува како периферна околност, туку како една од клучните точки во епидемиолошката логика на болеста.

Овој аспект е директно важен и за интерпретацијата на сегашните резултати. Високата фертилноста кај овците и доминацијата на G1/G3 профилот во рамките на *Echinococcus granulosus* s.s. упатуваат дека, кога инфицираните органи од овците се достапни за кучињата, циклусот на пренесување може лесно да се одржува. Во такви услови, овците со фертилни цисти претставуваат извор на инфекција за кучињата, а кучињата, преку контаминација на средината со јајца, овозможуваат нова изложеност на овците. Ваквата епидемиолошка логика е во согласност со високата преваленца, комбинираната локализација и честата повеќекратност на цистите утврдени во ова истражување. Оттука, домашното колење и начинот на постапување со органите најверојатно претставуваат една од клучните точки преку кои се одржува локалната ендемичност (1,64).

Иако ова истражување не вклучуваше директно испитување на кучињата како дефинитивни домаќини, ниту формално следење на патиштата на отстранување на инфицираните органи, добиените наоди имаат јасни импликации за домашниот циклус на пренесување. Особено високата преваленца кај овците, присуството на фертилни цисти и идентификацијата на G1/G3 профилот укажуваат дека условите за одржување на паразитот во домашната средина се реални и епидемиолошки значајни.

## **6.10 Јавно здравје и Едно здравје: значењето на G1/G3-доминацијата кај животните**

Од јавно-здравствен аспект, доминацијата на *Echinococcus granulosus* s.s., со присуство на G1 и G3, претставува најважен молекуларен сигнал добиен во ова истражување. Светската здравствена организација нагласува дека ехинококозата има значителен глобален товар и долг, често асимптоматски клинички тек, поради што болеста може долго да остане препознаена (1). Европските молекуларни податоци дополнително покажуваат дека токму *Echinococcus granulosus* s.s., а особено G1/G3 комплексот, доминира кај молекуларно карактеризираните хумани случаи во Европа, што ја прави ветеринарната циркулација на овие генотипови релевантна и во поширока рамка на Едно здравје (102). Во таа смисла, молекуларниот профил утврден кај домашните преживари во Северна Македонија не треба да се разгледува само како локален лабораториски наод, туку како показател дека циркулира генотипски комплекс со јасно зоонозно значење во регионот.

Практичната вредност на перспективата Едно здравје лежи во поврзувањето на различните извори на податоци. Подобра интеграција на кланичните наоди со здравствените регистри, хируршките и радиолошките извори на информации, каде што тоа е изводливо, би овозможила попрецизна проценка на пошироката состојба. Истовремено, без податоци за инфекцијата кај кучињата, останува тешко да се процени

интензитетот на циркуацијата во микросредините, односно постоењето на “ hot –spots”. Поради тоа, значењето Едно здравје на ова истражување е јасно, но неговата целосна примена бара надзор што ќе ги поврзе меѓудомаќините, дефинитивните домаќини и, каде што е можно, хуманите податоци. Таквиот пристап е во согласност со концептот Едно здравје, кој ја разгледува здравствената состојба на луѓето, животните и екосистемите како меѓусебно зависна и бара координиран, мултисекторски надзор и контрола (102).

Во тој контекст, резултатите од ова истражување добиваат пошироко значење, бидејќи покажуваат дека ветеринарните наоди не можат да се разгледуваат изолирано од ризикот за кучињата и, посредно, за човекот. Иако хуманите случаи не беа предмет на ова истражување, утврдената циркулација кај добитокот, заедно со фертилноста на дел од цистите и доминацијата на G1/G3, укажува дека станува збор за епидемиолошки активен систем со јасни ветеринарни и јавно-здравствени импликации.

### **6.11 Економски импакт во сточарството и скриени загуби**

Економскиот товар на цистичната ехинококоза се состои од директни и индиректни компоненти. Највидливите директни загуби во сточарството се поврзани со конфискацијата и отфрлањето на засегнатите органи, намалувањето на комерцијалната вредност на трупот, дополнителните трошоци за инспекција и постапување со отпадот, како и организациските трошоци поврзани со биосигурно уништување на инфицираниот материјал. Индиректните загуби се потешко мерливи, но не се помалку значајни. Во нив спаѓаат намалената продуктивност, понискиот прираст, можните репродуктивни последици и намалениот квалитет на производите, односно ефекти што често не се евидентираат во рутинските кланични системи, но можат кумулативно да создадат значителен економски товар (28,103).

Европските анализи покажуваат дека и во услови на поразвиен надзор вкупниот товар на болеста може да остане висок, особено кога ќе се вклучат и хуманите трошоци за дијагностика, лекување и следење. Во анализата за Шпанија, Benner и сор. покажуваат дека трошоците поврзани со хуманата болест доминираат во вкупниот економски биланс, додека загубите во сточарството, иако помали, имаат траен и континуиран карактер (104). За интерпретацијата на сегашните наоди ова е важно, бидејќи потсетува дека видливите кланични загуби претставуваат само еден дел од поширокиот товар на болеста.

Во македонски услови, каде недостига систематска национална економска проценка на цистичната ехинококоза, добиените резултати индиректно упатуваат на веројатно значаен товар на болеста. Високата преваленца кај овците сугерира честа зафатеност на органите и веројатни директни загуби во кланичниот систем. Истовремено, високата фертилност на цистите кај овците укажува дека инфекцијата не е само широко распространета, туку и биолошки способна да го одржува циклусот на пренесување, со што се создава основа за долгорочни економски последици. Поради тоа, основано е да се претпостави постоење на скриен економски товар, кој не се одразува целосно во официјалните извештаи. Неговото идно квантифицирање, преку модели што би ги интегрирале кланичните конфискации, проценетите загуби по грло и индиректните производствени трошоци, претставува важна насока за понатамошни истражувања.

Иако економските последици не беа директно мерени во рамки на оваа студија, добиените наоди оправдано упатуваат на нивно постоење. Високата позитивност, зафатеноста на економски значајни органи и присуството на фертилни цисти кај дел од животните укажуваат дека цистичната ехинококоза не е само биолошки и ветеринарен, туку и економски релевантен проблем. Притоа, најлесно видливите загуби, како конфискацијата на црн дроб и бели дробови, претставуваат само дел од вкупниот ефект. Кога болеста е широко распространета, и кланичните загуби добиваат кумулативно значење на ниво на кланица, регион и сектор. Реалниот економски товар притоа може да биде и потценет, бидејќи дел од цистичните промени можат да останат недетектирани во рутински услови, а индиректните последици врз продуктивноста и управувањето со стадата обично не се мерат во кланичните бази на податоци. Оттука, економската важност на ехинококозата не треба да се сведува само на бројот на отфрлени органи, туку да се разгледува како дел од поширок ветеринарно-економски проблем што ја оправдува превенцијата, особено во средини со активен домашен циклус на пренесување.

## 6.12 Ограничувања на студијата

Иако ова истражување обезбедува обемна и аналитички повеќеслојна слика за цистичната ехинококоза кај домашните преживари, неговата интерпретација мора да ги земе предвид и методолошките ограничувања. Студијата се заснова на кланичен надзор, што претставува практично релевантен и епидемиолошки вреден пристап, бидејќи овозможува директен увид во органската локализација, бројноста и делумно во биолошките карактеристики на цистите. Сепак, ваквиот дизајн не ја опфаќа целата инфицирана популација во средината, туку само животните што влегуваат во системот на колење, при што испитаните животни не претставуваат строго случаен пресек од целата популација. Животните што се носат на колење често се разликуваат според возраста, производната намена и здравствениот статус, а токму овие фактори можат да влијаат врз веројатноста за детекција на цисти. Дополнително, чувствителноста на рутинската инспекција може да варира зависно од големината, локализацијата и морфолошките карактеристики на цистите, како и од оперативните услови во кланицата, така што дел од инфекциите можат да останат недетектирани. Поради тоа, добиените проценки најсоодветно треба да се толкуваат како преваленца утврдена во кланичната популација, а не како целосно прецизна популациска слика за сите домашни преживари во државата. Во таа смисла, наодите од оваа студија поверојатно претставуваат потценета отколку преценета проценка на оптовареноста со инфекција. Ова ограничување не ја намалува вредноста на резултатите; напротив, високата застапеност утврдена и во ваков дизајн дополнително ја нагласува епидемиолошката релевантност на болеста во локалниот контекст. Слични ограничувања се наведуваат и во други кланично базирани студии од регионот, каде возраста, нерамномерната распределба на примерокот и типот на производната категорија се препознаваат како важни извори на варијација (10,63).

Годишните разлики во преваленцата беа статистички значајни кај двата вида, но нивната епидемиолошка интерпретација треба да биде внимателна. Во одделни години бројот на испитани животни беше мал, особено кај овците во 2022 година и кај говедата во 2021 и 2022 година, што ја ограничува стабилноста на оценките. Поради тоа, овие разлики посоодветно се разгледуваат како варијабилност во кланичниот примерок отколку како сигурен показател за национален временски тренд на инфекцијата (74)

Молекуларната анализа обезбеди доволно јасни и конзистентни податоци за сигурно потврдување на доминантниот G1/G3 профил во рамки на *E. granulosus* s.s., што претставува еден од важните наоди на ова истражување. Иако бројот на анализирани изолати и употребата на еден митохондриски маркер не овозможуваат подетална популациско-генетска резолуција, сигурно исклучување на ретки линии или прецизна реконструкција на микроепидемиолошката дисперзија, тоа не ја намалува вредноста на добиените резултати во однос на главното прашање на студијата. Напротив, молекуларниот дел цврсто ја поддржува општата слика за доминантниот паразитски профил и неговата епидемиолошка релевантност во Северна Македонија, додека понатамошната генетска доработка останува важна насока за идни истражувања (54,58,71).

Мултиваријабилната анализа беше ограничена на говедата, бидејќи распределбата на присуството на цисти кај овците, поради исклучително високата преваленца, не овозможуваше доволно стабилно моделирање на независните асоцијации. Поради тоа, кај овците влијанието на возраста, периодот и регионот може да се разгледува главно на униваријабилно и интерпретативно ниво, но не и со иста аналитичка сигурност како кај говедата.

Дополнително, во рамки на ова истражување не беа директно испитувани ни практиките што го одржуваат домашниот циклус на пренесување, како домашното колење, постапувањето со органите, дехелминтизацијата и движењето на кучињата. Поради тоа, заклучоците за механизмите на пренесување се темелат главно на паразитолошки и молекуларни показатели, а не на директно документирани ризични практики во локалниот контекст. Токму затоа, идните истражувања би имале особена вредност доколку, покрај биолошките индикатори, систематски ги опфатат и практиките поврзани со домашното колење, управувањето со органите и контролата на кучињата.

Конечно, иако студијата опфаќа значајни елементи од епидемиолошката слика кај меѓудомаќините, таа не ги вклучуваше дефинитивните домаќини ниту хуманата популација. Поради тоа, пошироките заклучоци за циклусот на пренесување мора да останат внимателно ограничени на наодите кај домашните преживари, а не на директни податоци за инфекцијата кај кучињата или кај луѓето. Ова ограничување не ја намалува научната вредност на студијата, туку ја поставува нејзината реална граница: резултатите претставуваат силен и добро поткрепен показател за ендемичност и биолошка активност на инфекцијата кај меѓудомаќините, но не и целосен опис на сите сегменти од циклусот (10,23).

### **6.13 Синтеза на наодите и идни насоки**

Кога сите линии на доказ се разгледуваат заедно, се добива кохерентна епидемиолошка слика: цистичната ехинококоза во Северна Македонија најверојатно се одржува во активен домашен циклус, со доминантна улога на овците. Таквата интерпретација е поткрепена со високата преваленца кај овците, високата фертилност на цистите, доминацијата на G1/G3 профилот во рамки на *Echinococcus granulosus* s.s. и просторната хетерогеност, која упатува на постоење на локални двигатели на ризик. Во таа смисла, студијата не само што ја потврдува ендемичноста на инфекцијата, туку овозможува и попрецизно разбирање на најверојатниот биолошки механизам преку кој се одржува циклусот.

Од научна и практична перспектива, особено релевантен е надзорот кај кучињата, со примена на копроантиген ELISA како скрининг-алатка во подрачја со стабилно висока преваленца кај овците, а каде што е изводливо и со потврда преку копро-PCR во подгрупи. Еднакво важна е и насоченоста кон кланичниот отпад и домашното колење како критични точки во пренесувањето, бидејќи токму тука високата фертилност на цистите кај овците добива директно практично значење. Понатаму, корисно би било подобро поврзување на ветеринарните наоди со јавно-здравствените извори на информации, онаму каде што тоа е возможно, за да се процени поширокото значење на локалниот G1/G3 профил. Идните истражувања би имале особена вредност доколку ја продлабочат молекуларната епидемиологија преку анализи со повисока резолуција, што би овозможило попрецизно разгледување на распределбата на генетските линии и нивната микроепидемиолошка циркулација.

Европските и медитеранските искуства покажуваат дека долгорочното намалување на цистичната ехинококоза ретко е резултат на една единствена интервенција, туку најчесто на комбинација од мерки насочени кон истата критична точка: контактот на кучињата со инфицирани органи и последователната контаминација на средината (26,105). Во таа смисла, резултатите од ова истражување не само што опишуваат ендемична состојба, туку овозможуваат и формулирање на јасна епидемиолошка рамка за контрола. Високата застапеност кај овците, повисоката фертилност на овците цисти и доминацијата на G1/G3 профилот упатуваат дека овците имаат централна улога во одржувањето на домашниот циклус на пренесување. Во таков систем, клучната оперативна точка не е само детекцијата на инфекцијата кај меѓудомаќините, туку прекинувањето на пристапот на кучињата до инфицирани органи. Оттука, најрационален модел за национална контрола би вклучувал таргетиран надзор кај кучињата, стандардизирано и биосигурно управување со кланичниот отпад и органите од домашно колење, периодична антихелминтска програма за ризични кучешки популации и подобра интеграција на ветеринарните и хуманите податоци. Вредноста на оваа студија е токму во тоа што обезбедува почетна научна основа за таков пристап, односно не само опис на постојната состојба, туку и аналитичка подлога за идни интервенции.

Во однос на поставените истражувачки хипотези, добиените резултати потврдуваат дека цистичната ехинококоза е широко присутна кај испитуваните домашни преживари, но со јасно изразени разлики меѓу видовите, органската локализација и биолошката активност на цистите. Возраста, регионот и временскиот период покажаа различна аналитичка тежина зависно од видот домаќин, што укажува дека епидемиолошката слика не е еднослојна, туку е обликувана од повеќе меѓусебно поврзани фактори. Молекуларните наоди дополнително ја поддржаа хипотезата дека во испитуваната средина доминира профил типичен за домашниот циклус на пренесување.

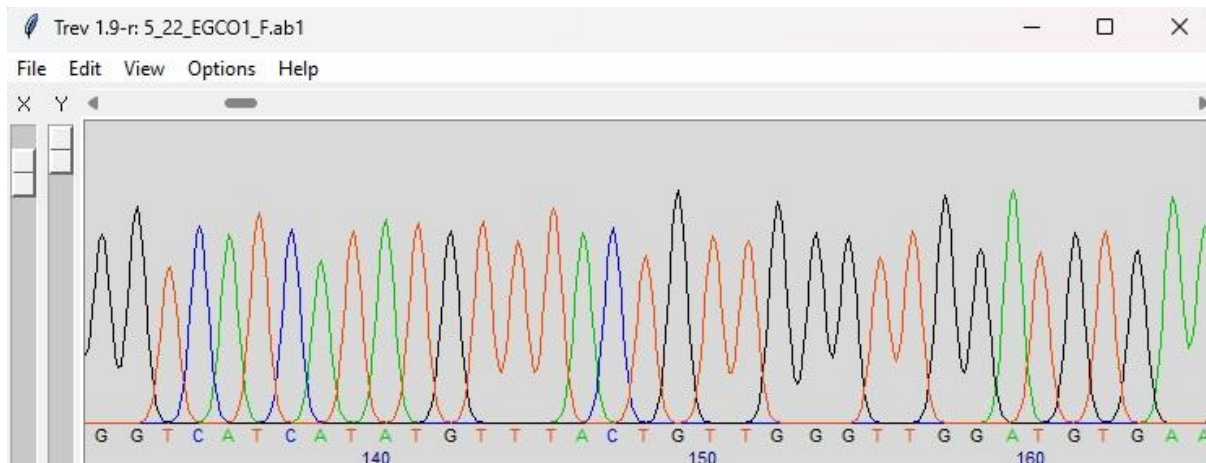
## **ЗАКЛУЧОЦИ**

1. Цистичната ехинококоза е ендемски широко распространета кај домашните преживари во Република Северна Македонија во периодот 2020–2022 година, со висока вкупна преваленца во испитаната кланична популација.
2. Преваленцата е значајно повисока кај овците во споредба со говедата, што укажува на видот на домаќин како клучен фактор поврзан со присуството и интензитетот на инфекцијата.

3. Забележана е статистички значајна просторна/регионална и временска хетерогеност на преваленцата, што укажува на локални разлики во ризикот и варијабилност во кланичниот примерок низ испитуваните региони.
4. Кај овците доминира комбинирана локализација на цистите во црниот дроб и белите дробови, додека кај говедата е забележана порамномерна органска распределба.
5. Фертилноста на цистите е значајно повисока кај овците во споредба со говедата (Fisher's exact test,  $p < 0,001$ ), што укажува дека овците претставуваат поефикасни меѓудомаќини со клучна улога во одржувањето на инфективниот циклус.
6. Молекуларната идентификација потврди симултана циркулација на генотиповите G1 и G3 кај двата вида преживари. Иако не беше утврдена статистички значајна разлика во нивната дистрибуција по домаќин ( $p = 0,702$ ), регистриран е изразен интрагенотипен диверзитет.
7. Високата фертилност на генотипот G3 кај овците (82,6%), заедно со присуството на специфични микроваријанти (пр. изолатот MKD6), сугерира потенцијална еволутивна адаптација на овој генотип кон овцата како важен меѓудомаќин во македонскиот екосистем.
8. Комбинацијата од висока преваленца, висока фертилност кај овците и доминација на генотипот G1 укажува на активен и епидемиолошки одржлив трансмисионен циклус со значајно зоонозно потенцијално значење.
9. Резултатите од ова истражување ја редефинираат улогата на овците во македонската епидемиолошка средина, не само како примарен резервоар за G1, туку и како главен биолошки катализатор за ширење и адаптација на генотипот G3. Овој феномен на 'бришење' на специфичноста кон домаќинот бара итна примена на интегрирани контролни стратегии (Едно здравје), со посебен акцент на строг ветеринарен надзор врз управувањето со кланичниот отпад како клучна алка за прекинување на инфективниот синџир.

## ПРИЛОЗИ

**Прилог 1.** Репрезентативен електроферограм по двонасочно секвенционирање на *cox1*.



**Прилог 2.** Повеќекратно подредување на *cox1* секвенците со референтни секвенци за G1 и G3.



**Прилог 3.** GenBank пристапни броеви на депонираните секвенци.

Колона 1	Колона 2	Колона 3	Колона 4
PV094083	PV094084	PV094085	PV094086
PV094087	PV094088	PV094089	PV094090
PV094091	PV094092	PV094093	PV094094
PV094095	PV094096	PV094097	PV094098
PV094099	PV094100	PV094101	PV094102

<b>Колона 1</b>	<b>Колона 2</b>	<b>Колона 3</b>	<b>Колона 4</b>
PV094103	PV094104	PV094105	PV094106
PV094107	PV094108	PV094109	PV094110
PV094111	PV094112	PV094113	PV094114
PV094115	PV094116	PV094117	PV094118
PV094119	PV094120	PV094121	PV094122
PV094123	PV094124	PV094125	PV094126
PV094127	PV094128	PV094129	PV094130
PV094131	PV094132	PV094133	PV094134
PV094135	PV094136	PV094137	PV094138
PV094139	PV094140		

## КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА:

1. Organization WH. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases [Internet]. World Health Organization; 2010. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564090>
2. Budke CM, Casulli A, Kern P, Vuitton DA. Cystic and alveolar echinococcosis: Successes and continuing challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(4):10–3. doi:10.1371/journal.pntd.0005477 PubMed PMID: 28426657.
3. Iván AHN, Enrico B, Cindy M. Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol*. 2016 Feb 25;54(3):518–23. doi:10.1128/jcm.02420-15
4. Torgerson PR, Macpherson CNL. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Vet Parasitol*. 2011;182(1):79–95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.017>
5. Thompson RCA. Chapter Two - Biology and Systematics of Echinococcus. In: Thompson RCA, Deplazes P, Lymbery AJ, editors. *Advances in Parasitology* [Internet]. Academic Press; 2017. p. 65–109. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X16300732> doi:<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.07.001>
6. Johannes E, Peter D. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Jan 1;17(1):107–35. doi:10.1128/cmr.17.1.107-135.2004
7. Alvarez Rojas CA, Mathis A, Deplazes P. Assessing the Contamination of Food and the Environment With Taenia and Echinococcus Eggs and Their Zoonotic Transmission. *Current Clinical Microbiology Reports*. Springer; 2018. p. 154–63. doi:10.1007/s40588-018-0091-0
8. Yanagida T, Mohammadzadeh T, Kamhawi S, Nakao M, Sadjjadi SM, Hijjawi N, et al. Genetic polymorphisms of Echinococcus granulosus sensu stricto in the Middle East. *Parasitol Int*. 2012;61(4):599–603. doi:<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.05.014>
9. Parsa F, Haghpanah B, Pestechian N, Salehi M. Molecular epidemiology of Echinococcus granulosus strains in domestic herbivores of Lorestan, Iran. *Jundishapur J Microbiol* [Internet]. 2011. Available from: [www.SID.ir](http://www.SID.ir)
10. Tamarozzi F, Legnardi M, Fittipaldo A, Drigo M, Cassini R. Epidemiological distribution of Echinococcus granulosus s.l. infection in human and domestic animal hosts in European Mediterranean and Balkan countries: A systematic review. Torgerson PR, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Aug 10;14(8):e0008519. doi:10.1371/journal.pntd.0008519
11. Rashikj L, Cvetkovikj A, Nikolovski M, Cvetkovikj I, Stefanovska J. Cystic Echinococcosis in Slaughtered Cattle and Sheep from North Macedonia. *Maced Vet Rev*. 2022;45(1):35–41. doi:10.2478/macvetrev-2022-0011
12. Rashikj L, Stefanovska J, Djadjovski I, Hristovska ZP, Xhekaj B, Trajchovski A, et al. Genetic characterisation of Echinococcus granulosus sensu lato infecting ruminants in the Republic of

- North Macedonia. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. 2025 Dec 18;76(4):10012–20. doi:10.12681/jhvms.40892
13. Wilkinson L, David I, Grove, A history of human helminthology, Wallingford, Oxon, C.A.B. International, 1990, pp.viii, 848, £55.00, \$104.50 (0-85198-689-7). Med Hist. 2012/08/16. 1992;36(1):100–1. doi:DOI: 10.1017/S0025727300054715
  14. Eckert J, Thompson RCA. Historical Aspects of Echinococcosis. Adv Parasitol. 2017 Jan 1;95:1–64. doi:10.1016/BS.APAR.2016.07.003 PubMed PMID: 28131361.
  15. Šnábel V. Current aspects of the taxonomy and phylogeny of the genus Echinococcus Rudolphi, 1801. Ann Parasitol [Internet]. 2023 Oct 9;69(Supplement 1):s30-32. Available from: <https://annals-parasitology.eu/index.php/AoP/article/view/110>
  16. Vuitton DA, McManus DP, Rogan MT, Romig T, Gottstein B, Naidich A, et al. International consensus on terminology to be used in the field of echinococcoses. Parasite [Internet]. 2020;27. Available from: <https://doi.org/10.1051/parasite/2020024>
  17. Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of Echinococcus granulosus sensu lato. Vet Parasitol. 2015;213(3–4):76–84. doi:10.1016/j.vetpar.2015.07.035
  18. McMANUS DP. Current status of the genetics and molecular taxonomy of Echinococcus species. Parasitology. 2013/06/11. 2013;140(13):1617–23. doi:DOI: 10.1017/S0031182013000802
  19. Thompson RCA. The taxonomy, phylogeny and transmission of Echinococcus. Exp Parasitol. 2008 Aug 1;119(4):439–46. doi:10.1016/J.EXPPARA.2008.04.016 PubMed PMID: 18539274.
  20. Nakao M, Lavikainen A, Yanagida T, Ito A. Phylogenetic systematics of the genus Echinococcus (Cestoda: Taeniidae). Int J Parasitol. 2013;43(12–13):1017–29. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.002
  21. Lymbery AJ, Jenkins EJ, Schurer JM, Thompson RCA. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What’s in a name? Trends Parasitol. 2015 Jan 1;31(1):23–9. doi:10.1016/j.pt.2014.11.003
  22. Casulli A, Siles-Lucas M, Tamarozzi F. *Echinococcus granulosus sensu lato*. Trends Parasitol. 2019 Aug 1;35(8):663–4. doi:10.1016/j.pt.2019.05.006
  23. Casulli A, Massolo A, Saarma U, Umhang G, Santolamazza F, Santoro A. Species and genotypes belonging to *Echinococcus granulosus sensu lato* complex causing human cystic echinococcosis in Europe (2000–2021): a systematic review. Parasit Vectors. 2022;15(1):109. doi:10.1186/s13071-022-05197-8
  24. Khan SN, Ali R, Khan S, Norin S, Rooman M, Akbar NU, et al. Cystic echinococcosis: an emerging zoonosis in southern regions of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. BMC Vet Res. 2021;17(1):139. doi:10.1186/s12917-021-02830-z
  25. Hao W, Lucine V, Tuerhongjiang T, Jun L, A VD, Wenbao Z, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century. Clin Microbiol Rev. 2019 Feb 13;32(2):10.1128/cmr.00075-18. doi:10.1128/cmr.00075-18
  26. Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, et al. Ecology and Life Cycle Patterns of Echinococcus Species. Advances in Parasitology [Internet]. Elsevier Ltd; 2017. 213–

314 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2016.11.002>  
doi:10.1016/bs.apar.2016.11.002 PubMed PMID: 28131364.

27. Eckert J, Gemmell MA, Meslin FX, Pawlowski ZS, Organization WH. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health; 2001.
28. Kern P, Menezes da Silva A, Akhan O, Müllhaupt B, Vizcaychipi KA, Budke C, et al. The Echinococcoses: Diagnosis, Clinical Management and Burden of Disease. *Adv Parasitol*. 2017 Jan 1;96:259–369. doi:10.1016/BS.APAR.2016.09.006 PubMed PMID: 28212790.
29. Pal M, Alemu H, Megersa L, Garedo D, Bodena E. Cystic Echinococcosis: A Comprehensive Review on Life Cycle, Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Spectrum, Diagnosis, Public Health and Economic Implications, Treatment, and Control. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine Research*. 2022 Mar 22;6. doi:10.26855/ijcemr.2022.04.005
30. Kapel CMO, Torgerson PR, Thompson RCA, Deplazes P. Reproductive potential of *Echinococcus multilocularis* in experimentally infected foxes, dogs, raccoon dogs and cats. *Int J Parasitol*. 2006 Jan 1;36(1):79–86. doi:10.1016/J.IJPARA.2005.08.012 PubMed PMID: 16199043.
31. THOMPSON RCA, KAPEL CMO, HOBBS RP, DEPLAZES P. Comparative development of *Echinococcus multilocularis* in its definitive hosts. *Parasitology*. 2006/01/19. 2006;132(5):709–16. doi:DOI: 10.1017/S0031182005009625
32. Holcman B, Heath DD. The early stages of *Echinococcus granulosus* development. *Acta Trop*. 1997 Apr 1;64(1–2):5–17. doi:10.1016/S0001-706X(96)00636-5 PubMed PMID: 9095285.
33. JABBAR A, JENKINS DJ, CRAWFORD S, WALDUCK AK, GAUCI CG, LIGHTOWLERS MW. Oncospheral penetration glands are the source of the EG95 vaccine antigen against cystic hydatid disease. *Parasitology*. 2010/07/21. 2011;138(1):89–99. doi:DOI: 10.1017/S0031182010001034
34. Manterola C, Rivadeneira J, Pogue SD, Rojas C. Morphology of *Echinococcus granulosus* Protoscolex. *International Journal of Morphology*. 2023;41:646–53.
35. Herrador Z, Siles-Lucas M, Aparicio P, Lopez-Velez R, Gherasim A, Garate T, et al. Cystic Echinococcosis Epidemiology in Spain Based on Hospitalization Records, 1997-2012. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Aug 22;10(8):e0004942-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004942>
36. Daryani A, Sharif M, Amouei A, Nasrolahei M. Fertility and viability rates of hydatid cysts in slaughtered animals in the Mazandaran Province, Northern Iran. *Trop Anim Health Prod*. 2009;41(8):1701–5. doi:10.1007/s11250-009-9368-x
37. Kouidri FB, Benchaib Khoudja F, Boulkaboul A, Selles M. Prevalence, fertility and viability of cystic echinococcosis in sheep and cattle of Algeria. *Bulg J Vet Med*. 2012;15(3):191–7.
38. Otero-Abad B, Torgerson PR. A Systematic Review of the Epidemiology of Echinococcosis in Domestic and Wild Animals. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6). doi:10.1371/journal.pntd.0002249 PubMed PMID: 23755310.

39. Eckert J, Thompson RCA, Mehlhorn H. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1983;69(6):737–48. doi:10.1007/BF00927423
40. Conraths FJ, Deplazes P. *Echinococcus multilocularis*: Epidemiology, surveillance and state-of-the-art diagnostics from a veterinary public health perspective. *Vet Parasitol*. 2015 Oct 30;213(3–4):149–61. doi:10.1016/J.VETPAR.2015.07.027 PubMed PMID: 26298509.
41. Thompson RCA. Growth, segmentation and maturation of the British horse and sheep strains of *Echinococcus granulosus* in dogs. *Int J Parasitol*. 1977 Aug 1;7(4):281–5. doi:10.1016/0020-7519(77)90036-4 PubMed PMID: 924713.
42. Smyth JD. Studies on tapeworm physiology: XI. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage. *Parasitology*. 2009/04/06. 1967;57(1):111–33. doi:DOI: 10.1017/S0031182000071936
43. Deplazes P, Rinaldi L, Alvarez Rojas CA, Torgerson PR, Harandi MF, Romig T, et al. Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Adv Parasitol*. 2017 Jan 1;95:315–493. doi:10.1016/BS.APAR.2016.11.001 PubMed PMID: 28131365.
44. Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM, et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jun 1;7(6):385–94. doi:10.1016/S1473-3099(07)70134-2
45. Alvarez Rojas CA, Romig T, Lightowlers MW. *Echinococcus granulosus sensu lato* genotypes infecting humans – review of current knowledge. *Int J Parasitol*. 2014;44(1):9–18. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.08.008
46. Espinoza S, Salas AM, Vargas A, Freire V, Diaz E, Sánchez G, et al. Detection of the G3 genotype of *Echinococcus granulosus* from hydatid cysts of Chilean cattle using COX1 and ND1 mitochondrial markers. *Parasitol Res*. 2014 Jan;113(1):139–47. doi:10.1007/s00436-013-3636-4 PubMed PMID: 24158646.
47. Weng X, Mu Z, Wei X, Wang X, Zuo Q, Ma S, et al. The effects of dog management on *Echinococcus* spp. prevalence in villages on the eastern Tibetan Plateau, China. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):1–12. doi:10.1186/s13071-020-04082-6 PubMed PMID: 32317015.
48. Mitrea IL, Ionita M, Wassermann M, Solcan G, Romig T. Cystic Echinococcosis in Romania: An Epidemiological Survey of Livestock Demonstrates the Persistence of Hyperendemicity. *Foodborne Pathog Dis*. 2012 Oct 17;9(11):980–5. doi:10.1089/fpd.2012.1237
49. Grosso G, Gruttadauria S, Biondi A, Marventano S, Mistretta A. Worldwide epidemiology of liver hydatidosis including the Mediterranean area. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(13):1425.
50. Casulli A, Massolo A, Saarma U, Umhang G, Santolamazza F, Santoro A. Species and genotypes belonging to *Echinococcus granulosus sensu lato* complex causing human cystic echinococcosis in Europe (2000–2021): a systematic review. *Parasit Vectors*. 2022;15(1):109. doi:10.1186/s13071-022-05197-8
51. Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. *Parasitol Int*. 2006 Jan 1;55(SUPPL.):S187–91. doi:10.1016/J.PARINT.2005.11.028 PubMed PMID: 16352465.

52. Entezami M, Nocerino M, Widdicombe J, Bosco A, Cringoli G, Casulli A, et al. The spatial distribution of cystic echinococcosis in Italian ruminant farms from routine surveillance data. *Frontiers in Tropical Diseases*. 2022;Volume 3-2022. doi:10.3389/fitd.2022.1034572
53. ALISHANI M, SHERIFI K, REXHEPI A, HAMIDI A, ARMUA-FERNANDEZ MT, GRIMM F, et al. The impact of socio-cultural factors on transmission of *Taenia* spp. and *Echinococcus granulosus* in Kosovo. *Parasitology*. 2017/08/11. 2017;144(13):1736–42. doi:DOI: 10.1017/S0031182017000750
54. Hodžić A, Alić A, Spahić A, Harl J, Beck R. Genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu lato from animals and humans in Bosnia and Herzegovina. *Parasit Vectors*. 2022;15(1):457. doi:10.1186/s13071-022-05598-9
55. Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postoli R, Rinaldi L, et al. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitol Res*. 2011;108(2):341–53. doi:10.1007/s00436-010-2067-8
56. Chaligiannis I, Maillard S, Boubaker G, Spiliotis M, Saratsis A, Gottstein B, et al. *Echinococcus granulosus* infection dynamics in livestock of Greece. *Acta Trop*. 2015 Oct 1;150:64–70. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2015.06.021 PubMed PMID: 26123192.
57. Breyer I, Georgieva D, Kurdova R, Gottstein B. *Echinococcus granulosus* strain typing in Bulgaria: the G1 genotype is predominant in intermediate and definitive wild hosts. *Parasitol Res*. 2004;93(2):127–30. doi:10.1007/s00436-004-1116-6
58. Debeljak Z, Boufana B, Interisano M, Vidanovic D, Kulisic Z, Casulli A. First insights into the genetic diversity of *Echinococcus granulosus* sensu stricto (ss) in Serbia. *Vet Parasitol*. 2016;223:57–62.
59. Hogeia MO, Ciomaga BF, Muntean MM, Muntean AA, Popa MI, Popa GL. Cystic echinococcosis in the early 2020s: a review. *Trop Med Infect Dis*. 2024;9(2):36.
60. Kinkar L, Laurimäe T, Acosta-Jamett G, Andresiuk V, Balkaya I, Casulli A, et al. Global phylogeography and genetic diversity of the zoonotic tapeworm *Echinococcus granulosus* sensu stricto genotype G1. *Int J Parasitol*. 2018;48(9):729–42. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.03.006
61. Sotiraki S, Chaligiannis I. Cystic echinococcosis in Greece. Past and present. *Parasite*. 2010;17(3):205–10. doi:10.1051/parasite/2010173205
62. Loi F, Berchialla P, Masu G, Masala G, Scaramozzino P, Carvelli A, et al. Prevalence estimation of Italian ovine cystic echinococcosis in slaughterhouses: A retrospective Bayesian data analysis, 2010–2015. *PLoS One*. 2019;14(4):2010–5. doi:10.1371/journal.pone.0214224 PubMed PMID: 30934010.
63. Dărăbuș G, Bușe A, Oprescu I, Morariu S, Mederle N, Ilie M, et al. Investigation on Descriptive Epidemiology, Geographical Distribution, and Genotyping of *Echinococcus granulosus* s.l. in Bovine from Romania. *Vet Sci*. 2022;9(12). doi:10.3390/vetsci9120685
64. Possenti A, Manzano-Román R, Sánchez-Ovejero C, Boufana B, La Torre G, Siles-Lucas M, et al. Potential Risk Factors Associated with Human Cystic Echinococcosis: Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(11):1–15. doi:10.1371/journal.pntd.0005114

65. Romig T, Ebi D, Wassermann M. Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *Vet Parasitol.* 2015;213(3):76–84.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.035>
66. Roostaei M, Fallah M, Maghsood AH, Saidijam M, Matini M. Prevalence and Fertility Survey of Hydatid Cyst in Slaughtered Livestock in Hamadan Abattoir, Western Iran, 2015 - 2016. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection.* 2017;4(2):43361–43361.  
doi:10.5812/ajcmi.43361
67. Daryani A, R.Alaei, R.Arab, M S, H.Deaghan, H.Ziaei. Prevalence of Hydatid Cyst in Slaughtered Animals in Northwest Iran. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2006. p. 330–4.
68. Kinkar L, Laurimäe T, Acosta-Jamett G, Andresiuk V, Balkaya I, Casulli A, et al. Distinguishing *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotypes G1 and G3 with confidence: A practical guide. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018;64:178–84.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.026>
69. Kinkar L, Laurimäe T, Balkaya I, Casulli A, Zait H, Irshadullah M, et al. Genetic diversity and phylogeography of the elusive, but epidemiologically important *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotype G3. *Parasitology.* 2018/04/17. 2018;145(12):1613–22. doi:DOI: 10.1017/S0031182018000549
70. Casulli A, Interisano M, Sreter T, Chitimia L, Kirkova Z, La Rosa G, et al. Genetic variability of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Europe inferred by mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012;12(2):377–83. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.014
71. Bonelli P, Serra E, Dei Giudici S, Peruzzo A, Crotti S, Danesi P, et al. Molecular phylogenetic analysis of *Echinococcus granulosus sensu lato* infecting sheep in Italy. *Acta Trop.* 2024 Apr 1;252:107151. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2024.107151 PubMed PMID: 38367944.
72. Sałamatin R, Kowal J, Nosal P, Kornaś S, Cielecka D, Jańczak D, et al. Cystic echinococcosis in Poland: genetic variability and the first record of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1 genotype) in the country. *Parasitol Res.* 2017 Nov 1;116(11):3077–85. doi:10.1007/s00436-017-5618-4 PubMed PMID: 28975403.
73. Šnábel V, Kuzmina TA, Antipov AA, Yemets OM, Cavallero S, Miterpáková M, et al. Molecular Study of *Echinococcus granulosus* Cestodes in Ukraine and the First Genetic Identification of *Echinococcus granulosus Sensu Stricto* (G1 Genotype) in the Country. *Acta Parasitol.* 2022;67(1):244–54. doi:10.1007/s11686-021-00450-z
74. Guo B, Zhao L, Zhao L, Mi R, Zhang X, Wang B, et al. Survey and Molecular Characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* from Livestock and Humans in the Altai Region of Xinjiang, China. *Pathogens.* 2023 Jan 1;12(1). doi:10.3390/pathogens12010134
75. Jesudoss Chelladurai JRJ, Quintana TA, Johnson WL, Schmidt C, Righter D, Howey E. Cystic echinococcosis in cattle and sheep caused by *Echinococcus granulosus sensu stricto* genotypes G1 and G3 in the USA. *Parasit Vectors.* 2024;17(1):128. doi:10.1186/s13071-024-06192-x
76. Larriue E, Gavidia CM, Lightowers MW. Control of cystic echinococcosis: Background and prospects. *Zoonoses Public Health.* 2019 Dec 1;66(8):889–99.  
doi:<https://doi.org/10.1111/zph.12649>

77. Organization WH. Echinococcosis. Geneva: World Health Organization; 2020.
78. Amarir F, Rhalem A, Sadak A, Raes M, Oukessou M, Saadi A, et al. Control of cystic echinococcosis in the Middle Atlas, Morocco: Field evaluation of the EG95 vaccine in sheep and cesticide treatment in dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(3):e0009253.
79. Lightowlers MW. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: Foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int.* 2006;55:S39–43.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.005>
80. Larrieu E, Mujica G, Araya D, Labanchi JL, Arezo M, Herrero E, et al. Pilot field trial of the EG95 vaccine against ovine cystic echinococcosis in Rio Negro, Argentina: 8 years of work. *Acta Trop.* 2019 Mar 1;191:1–7. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2018.12.025 PubMed PMID: 30576624.
81. Gharbi M, Giraudoux P. Cystic echinococcosis (*Echinococcus granulosus sensu lato* infection) in Tunisia, a One Health perspective for a future control programme. *Parasite.* 2024 Jun 13;31:30. doi:10.1051/parasite/2024029
82. Bosco A, Alves LC, Cociancic P, Amadesi A, Pepe P, Morgoglione ME, et al. Epidemiology and spatial distribution of *Echinococcus granulosus* in sheep and goats slaughtered in a hyperendemic European Mediterranean area. *Parasit Vectors.* 2021;14(1):421.  
doi:10.1186/s13071-021-04934-9
83. Andrew Thompson RC. The molecular epidemiology of echinococcus infections. *Pathogens.* MDPI AG; 2020. p. 1–9. doi:10.3390/pathogens9060453
84. Barnes TS, Deplazes P, Gottstein B, Jenkins DJ, Mathis A, Siles-Lucas M, et al. Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. *Acta Trop.* 2012 Jul 1;123(1):1–7.  
doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2012.02.066 PubMed PMID: 22410539.
85. Bart JM, Morariu S, Knapp J, Ilie MS, Pitulescu M, Anghel A, et al. Genetic typing of *Echinococcus granulosus* in Romania. *Parasitol Res.* 2006;98(2):130–7. doi:10.1007/s00436-005-0015-9
86. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547–9.  
doi:10.1093/molbev/msy096 PubMed PMID: 29722887.
87. Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees' [Internet]. Available from:  
<https://academic.oup.com/mbe/article/4/4/406/1029664>
88. Felsenstein J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution (N Y).* 1985 Jul;39(4):783–91. doi:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x PubMed PMID: 28561359.
89. JUKES TH, CANTOR CR. Evolution of Protein Molecules. In: *Mammalian Protein Metabolism* [Internet]. Elsevier; 1969. p. 21–132. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483232119500097> doi:10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7
90. Thrusfield M V. *Veterinary Epidemiology*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2007. 0–626 p.

91. Hombo H, Oyarzo M, Álvarez C, Cuadros N, Hernández F, Ward MP, et al. Spatial epidemiology of cystic echinococcosis in livestock from a hyper-endemic region in southern Chile. *Vet Parasitol.* 2020;287(April). doi:10.1016/j.vetpar.2020.109258 PubMed PMID: 33075729.
92. El-Dakhly KM, Arafa WM, El-Nahass ESN, Shokier KAM, Noaman AF. The current prevalence and diversity of cystic echinococcosis in slaughtered animals in Egypt. *Journal of Parasitic Diseases.* 2019;43(4):711–7. doi:10.1007/s12639-019-01151-1
93. Bonelli P, Dei Giudici S, Peruzzu A, Piseddu T, Santucci C, Masu G, et al. Genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in Sardinia (Italy). *Parasitol Int.* 2020 Aug 1;77:102120. doi:10.1016/J.PARINT.2020.102120 PubMed PMID: 32259586.
94. Khan A, Ahmed H, Simsek S, Afzal MS, Cao J. Spread of Cystic Echinococcosis in Pakistan Due to Stray Dogs and Livestock Slaughtering Habits: Research Priorities and Public Health Importance. *Front Public Health.* 2020;7(January):1–6. doi:10.3389/fpubh.2019.00412
95. Ito A. Review of “Echinococcus and Echinococcosis, Part A.” edited by RC Andrew Thompson, Alan J. Lymbery and Peter Deplazes. Springer; 2017.
96. Kamali W, Wang SY, Luo WD, Liu S, Zhao L, Pan XY, et al. Epidemiology and genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* in the East Tianshan Mountains, Xinjiang, China. *Parasitol Res.* 2024;123(11):388. doi:10.1007/s00436-024-08394-9
97. Abu-Helu R, Kokaly G, Nojourn S, Matouk I, Ibrahim M, Abbasi I. Molecular Identification of *Echinococcus* spp. and other Taeniid Tapeworms Using Next Generation Sequence Analysis of PCR Amplified 18s rRNA gene. *bioRxiv.* 2024 Jan 1;2024.04.02.587684. doi:10.1101/2024.04.02.587684
98. Shao G, Zhu X, Hua R, Chen Y, Yang G. Development of a Copro-RPA-CRISPR/Cas12a assay to detect *Echinococcus granulosus* nucleic acids isolated from canine feces using NaOH-based DNA extraction method. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 2024 Dec 12;18(12):e0012753-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012753>
99. Kartal Varol P, Özdal N, Oğuz B. Detection of *Echinococcus* spp. Coproantigens in Dogs in Van Province Using the ELISA Method. *Van Veterinary Journal.* 2025;36(2):115–20. doi:10.36483/vanvetj.1656770
100. Christofi G, Deplazes P, Christofi N, Tanner I, Economides P, Eckert J. Screening of dogs for *Echinococcus granulosus* coproantigen in a low endemic situation in Cyprus. *Vet Parasitol.* 2002;104(4):299–306. doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00637-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00637-9)
101. Guzel M, Yaman M, Koltas IS, Demirkazik M, Aktas H. Detection of *Echinococcus granulosus* coproantigens in dogs from Antakya Province, Turkey. *Helminthologia.* 2008;45(3):150–3. doi:10.2478/s11687-008-0030-3
102. Tamarozzi F, Deplazes P, Casulli A. Reinventing the Wheel of *Echinococcus granulosus sensu lato* Transmission to Humans. *Trends Parasitol.* 2020 May 1;36(5):427–34. doi:10.1016/j.pt.2020.02.004
103. Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis – an international public health challenge. *Res Vet Sci.* 2003;74(3):191–202. doi:[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00006-7)
104. Carabin H, Balsera-Rodríguez FJ, Rebollar-Sáenz J, Benner CT, Benito A, Fernández-Crespo JC, et al. Cystic echinococcosis in the province of Álava, North Spain: The monetary burden of a

disease no longer under surveillance. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(8).  
doi:10.1371/journal.pntd.0003069 PubMed PMID: 25102173.

105. Seimenis A. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop.* 2003;85(2):191–5. doi:[https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00272-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00272-3)