

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET



Vladimir S. Ćirković

**Prisustvo i genetički diverzitet
Giardia intestinalis, *Cryptosporidium* spp. i
Toxoplasma gondii u površinskim vodama
Srbije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY



Vladimir S. Ćirković

**Occurrence and genetic diversity of
Giardia intestinalis, *Cryptosporidium* spp.
and *Toxoplasma gondii* in surface waters in
Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI

Dr Ivana Klun, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za medicinska istraživanja – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Dr Dragana Miličić, docent

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Vera Nikolić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Dr Nataša Miladinović-Tasić, vanredni profesor

Univerzitet u Nišu – Medicinski fakultet – Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Dr Jasmina Krpo-Ćetković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane:

Doktorska disertacija je u celosti urađena u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju – IMI UB. Eksperimentalni deo urađen je u okviru projekta III 41019 “**Kontrola infekcije apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije**” (2011-2019, oblast interdisciplinarnih integrativnih istraživanja, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – MPNTR), kojim je rukovodila dr Olgica Đurković-Đaković, naučni savetnik. Obuka doktoranda u metodima koji su originalno primenjeni u ovom istraživanju obavljena je kroz COST akciju FA1408 – A European Network for Foodborne Parasites (Euro-FBP). Istraživanja su delom finansirana i na osnovu ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada IMI UB sa MPNTR (br. 451-03-68/2020-14/200015, 451-03-9/2021-14/200015 i 451-03-68/2022-14/200015).

ZAHVALNICA

Iskrenu zahvalnost upućujem mojoj mentorki dr Ivani Klun, za svu pruženu podršku i neizmerno strpljenje i razumevanje tokom doktorskih studija kao i izrade teze. Zahvaljujem se mentorki sa Biološkog fakulteta, dr Dragani Miličić na dostupnosti i stalnoj spremnosti da mi pomogne.

Veliku zahvalnost dugujem dr Olgici Đurković-Đaković na pruženoj prilici i ukazanom poverenju da ovo istraživanje postane predmet moje disertacije, kao i na svim smernicama i savetima.

Posebno bih želeo da se zahvalim članovima komisije:

- prof. dr Veri Nikolić na podršci, i vremenu izdvojenom za čitanje ove disertacije;
- prof. dr Nataši Miladinović-Tasić, na konstruktivnim savetima; i,
- naročito bih se zahvalio prof. dr Jasmini Krpo-Ćetković, na uloženom trudu i više nego korisnim komentarima i sugestijama koji su doprineli finalnom izgledu teze.

Zahvaljujem se dr *Lucy J. Robertson* i dr *Kjersti Selstad Utaaker* sa Univerziteta u Oslu na gostoprimstvu i prenetom znanju i savetima.

Posebno sam zahvalan dr Aleksandri Uzelac na konstruktivnim savetima; bez njene pomoći u rasvetljavanju misterija molekularnih metodologija ovaj doktorat ne bi bio moguć.

Takođe bih se zahvalio svim kolegama kao i svojim prijateljima koji su bili uz mene i naravno, mojoj porodici na bezrezervnoj ljubavi i podršci.

Prisustvo i genetički diverzitet *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *Toxoplasma gondii* u površinskim vodama Srbije

Sažetak

Voda je neophodan resurs za ljudsko društvo, stoga je važno da ona bude i bezbedna za upotrebu. Usled rasta potrebe za vodom, često se pribegava i upotrebi vode koja nije hemijski i bakteriološki ispravna. Predmet ovog istraživanja jesu parazitske protozoe *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *Toxoplasma gondii* i detekcija njihovih životnih oblika u površinskim vodama u Srbiji. Da bi se utvrdilo prisustvo parazita u vodotokovima, kao i stepen kontaminacije, analizirana su vodna tela propisana programom mera Agencije za zaštitu životne sredine koja se nalaze u 19 okruga, uključujući i grad Beograd. Uzorkovanje vode započeto je krajem 2018. godine i trajalo je do jula 2021. godine, i tom prilikom je sakupljeno 48 uzoraka vode iz površinskih voda različite kategorije. Za detekciju (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. korišćena je metodologija US EPA 1623 dok je detekcija oocista *T. gondii* vršena PCR metodom uz prethodno koncentrisanje uzorka. Od ukupno 48 uzoraka, u 24 (50%, 24/48) detektovana je barem jedna od tri ispitivane protozoe. Rezultati testa imunofluorescencije (IFA) pokazali su prisustvo cista *G. intestinalis* u 14 uzoraka (29,2%, 14/48), prisustvo oocista *Cryptosporidium* spp. u pet (10,4%, 5/48), dok su ciste i oociste oba parazita detektovane u tri uzorka (6,25%, 3/48). PCR metodom amplifikacije β -*giardin* gena prisustvo gDNK *G. intestinalis* detektovano je u osam uzoraka (16,6%, 8/48), dok amplifikacija nijednog od četiri gena korišćena u detekciji *Cryptosporidium* spp. nije bila uspešna. U četiri uzorka (8,3%, 4/48) detektovana je gDNK *T. gondii*, pri čemu je u detekciji prvo korišćen 529 bp repetitivni fragment, nakon čega su za potvrdu korišćeni geni GRA6 i SAG2. Tipizacija asemblaža *G. intestinalis* bila je uspešna u tri uzorka. U jednom uzorku detektovana je asemblaža A, dok je u preostala dva uzorka detektovana asemblaža B. Statističkom obradom podataka o hidromorfološkom kvalitetu voda nije se ustanovila povezanost tih parametara i prisustva parazita u vodi. Takođe, korišćenjem qGIS softvera, lokacije na kojima je vršeno uzorkovanje, kao i njihov status u odnosu na detekciju parazita, prikazani su na mapi Republike Srbije. Na osnovu toga zapaženo je veće prisustvo protozoa u vodama u Mačvanskom i Sremskom okrugu u zapadnoj Srbiji, kao i Pomoravskom i Šumadijskom okrugu u centralnoj Srbiji.

Rezultati ove doktorske disertacije po prvi put u Srbiji ukazali su na postojanje kontaminacije vodotokova parazitskim protozoama *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii*. Podaci dobijeni ovim istraživanjem mogu se iskoristiti za pravljenje strategije za zaštitu zdravlja ljudi i životinja i sprečavanje hidričnih epidemija, a takođe predstavljaju uvod u dalja, opsežnija istraživanja u ovoj oblasti koja bi pomogla boljem razumevanju kontaminacije i distribucije parazitskih protozoa u površinskim vodama Srbije.

Ključne reči: parazitske protozoe, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii*, detekcija, površinske vode, PCR, spoljašnja sredina, vodeni ekosistem

Naučna oblast: Ekologija

Uža naučna oblast: Hidroekologija; Protozoologija; Ekologija protista

Occurrence and genetic diversity of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii* in surface waters in Serbia

Abstract

Since water is such an important resource for human society, it must be safe to use. Due to the rising demand for water, it is becoming increasingly common to use water that is neither chemically nor bacteriologically suitable. This research focused on the parasitic protozoa *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Toxoplasma gondii*, and the detection of their life forms in surface waters in Serbia. Water bodies designated as economically or strategically significant for the country by the Serbian Environmental Protection Agency, in 19 administrative districts, were analysed to determine the occurrence of parasites as well as the degree of contamination. Water sampling began at the end of 2018 and continued through July 2021; during that time, 48 water samples were collected from various types of surface waters. The US EPA 1623 methodology was used to detect (oo)cysts of *G. intestinalis* and *Cryptosporidium* spp., while the detection of *T. gondii* was performed by PCR with prior concentration of the sample. According to the results of immunofluorescence assays, evidence of at least one of the three protozoa were found in 24 of the 48 samples (50%, 24/48). *G. intestinalis* cysts were found in 14 samples (29.2%, 14/48), *Cryptosporidium* spp. oocysts in five (10.4%, 5/48), while cysts and oocysts of both parasites were found in three samples (6.25%, 3/48). *G. intestinalis* β -giardin gene was detected by PCR amplification in eight (16.6%, 8/48) samples, but the attempts to amplify any of the four genes used to detect *Cryptosporidium* spp. remained unsuccessful. *T. gondii* gDNK was detected in four samples (8.3%, 4/48), firstly by amplification of the 529 bp repetitive fragment and then confirmed by detection of the GRA6 and SAG2 gene sequences. Typing of *G. intestinalis* assemblages was successful in three samples. Assemblage A was detected in one, and assemblage B in the remaining two samples. There was no association of hydro-morphological water quality with the presence of parasites in water. Also, using qGIS software, the locations where the sampling was performed as well as their status in relation to sample positivity were shown on the map of the Republic of Serbia. Based on that, a greater presence of protozoa was observed in the waters in the Mačva and Srem districts in Western Serbia, as well as in the Pomoravlje and Šumadija districts in Central Serbia.

Results of this Dissertation showed, for the first time in this country, that parasitic protozoa *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. and *T. gondii* contaminate Serbian watercourses. These findings could be used to establish a prevention and control strategy for protecting human and animal health, primarily by preventing waterborne epidemics. Also they laid a foundation for further research in this area that could improve the understanding of the scope and precise distribution of parasitic protozoa contamination in Serbian surface waters.

Keywords: parasitic protozoa, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., *Toxoplasma gondii*, detection, surface water, PCR, environment, aquatic ecosystem

Scientific field: Ecology

Scientific area: Hydroecology; Protozoology; Ecology of protists

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 .Značaj i dostupnost vode kao prirodnog resursa u Evropi.....	1
1.1.2. Voda kao rezervoar i medijum za transmisiju mikroorganizama.....	2
1.2. Patogene protozoe koje se prenose vodom	3
1.2.1. <i>Giardia intestinalis</i>	3
1.2.2. <i>Cryptosporidium</i> spp.	8
1.2.3. <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.3. Značaj <i>G. intestinalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. i <i>T. gondii</i> kao uzročnika hidričnih epidemija.....	14
1.4. Detekcija i monitoring.....	17
2. Ciljevi istraživanja	19
3. Materijal i metode	20
3.1. Plan istraživanja i uzorkovanja	20
3.1.1. Ispitivano područje i prikupljanje uzoraka	20
3.2. Provera efikasnosti koncentrisanja (oo)cista <i>G. intestinalis</i> i <i>Cryptosporidium</i> spp. iz vode filtracijom kroz membranski filter	21
3.3. Koncentrisanje uzorka filtracijom kroz membranski filter	21
3.4. Imunomagnetna separacija (IMS) (oo)cista <i>G. intestinalis</i> i <i>Cryptosporidium</i> spp..	24
3.5. Detekcija (oo)cista i/ili gDNK protozoa	25
3.5.1. Detekcija (oo)cista <i>G. intestinalis</i> i <i>Cryptosporidium</i> spp. imunofluorescijom.....	25
3.5.2. Detekcija gDNK <i>G. intestinalis</i> i <i>Cryptosporidium</i> spp. i tipizacija asemblaža <i>G. intestinalis</i>	26
3.5.2.1. Ekstrakcija gDNK.....	26
3.5.2.2. Koncentrisanje gDNK precipitacijom natrijum acetatom i etanolom.....	26
3.5.2.3. Detekcija gDNK <i>G. intestinalis</i> PCR amplifikacijom iz dva koraka	27
3.5.2.4. PCR-RFLP tipizacija asemblaža <i>G. intestinalis</i>	28
3.5.2.5. Detekcija gDNK <i>Cryptosporidium</i> spp. PCR amplifikacijom iz jednog ili dva koraka	28
3.5.3. Detekcija gDNK <i>T. gondii</i> PCR amplifikacijom iz jednog (529 bp) i dva koraka (SAG2, GRA6).....	30
3.6. Priprema baze za grafički prikaz rezultata pomoću geografskog informacionog sistema (GIS)	31
3.7. Statistička analiza.....	34

4. Rezultati	37
4.1. Tok uzorkovanja.....	37
4.1.1. Prikaz ispitivanih lokacija	37
4.1.2. Kvalitet uzoraka.....	37
4.2. Rezultati provere efikasnosti koncentrisanja (oo)cista – validacija rezultata istraživanja.....	37
4.3. Nalaz protozoa u površinskim vodama Srbije.....	38
4.3.1. Ukupni nalaz: kontaminiranost površinskih voda cistama i oocistama protozoa.....	38
4.3.2. Detekcija protozoa IFA metodom	41
4.3.3. Detekcija gDNK protozoa PCR metodom.....	47
4.3.3.1. PCR detekcija <i>G. intestinalis</i> u uzorcima vode	47
4.3.3.2. Standardizacija PCR metode za detekciju <i>Cryptosporidium</i> spp. u uzorcima vode.....	47
4.3.3.3. PCR detekcija <i>T. gondii</i> u uzorcima vode	49
4.3.4. PCR-RFLP tipizacija asemblaža <i>G. intestinalis</i>	52
4.4. Analiza uticaja najznačajnijih hidromorfoloških parametara površinskih voda na nalaz protozoa.....	56
5. Diskusija	60
6. Zaključci	70
Literatura	71
Prilozi	92

1. Uvod

1.1. Značaj i dostupnost vode kao prirodnog resursa u Evropi

Voda predstavlja jedan od najvažnijih obnovljivih resursa neophodnih za život na planeti Zemlji i pokriva oko 71% planete (Visbeck, 2018). Od ukupne količine vode na Zemlji, 97,5% je slana voda koja je deo okeana i mora, dok je samo 2,5% slatka voda. Najveći procenat slatke vode, oko 69% zarobljen je u polarnom ledu i leđnicima (Degefu et al., 2018), dok oko 30% čine podzemne vode (Oki et al., 2006; Hoekstra et al., 2012). Samo oko 0,4% ukupne zapremine vode na planeti nalazi se u površinskim slatkovodnim ekosistemima i atmosferi. Upravo taj mali procenat vode u površinskim ekosistemima jeste voda koja je najviše dostupna čoveku. Međutim, ni ova dostupnost nije ravnomerno raspoređena vremenski (tj. tokom sezona ili godišnjih doba), a ni prostorno (Gain et al., 2014; Degefu et al., 2018).

Voda je neophodan resurs za ljudsko društvo još od momenta njegovog formiranja. Pored toga što je apsolutno neophodna za život, predstavlja ključan deo ekonomije svake razvijene zemlje ili zemlje u razvoju a njen najveći deo koristi se za proizvodnju energije (struje), u privredi, a posebno u poljoprivredi, tj. proizvodnji hrane. Voda, iako obnovljiv resurs, ipak je ograničena količinski, a i u kvalitetu izuzetno varira. Stanovništvo Evrope, istorijski posmatrano, nikada nije imalo većih problema da obezbedi neophodne količine vode, međutim, kako je populacija na evropskom kontinentu rasla, tako su se povećavali i prohtevi za količinom i dostupnošću vode. Potreba za dovoljnom količinom ispravne vode naročito je izražena u južnim delovima Evrope (EEA, 2009). Neophodno je istaći negativan uticaj klimatskih promena, očitovanih u smanjenoj količini padavina, što je posebno doprinelo smanjenju količine vode na kontinentu. Nizak vodostaj reka, isušivanje močvara i nizak nivo podzemnih voda, veoma su uticali na čitave ekosisteme tj. i na biljni i na životinjski svet. Nedostatak ili smanjenje dostupnosti vode takođe su imali veliki uticaj na mnoge grane privrede a naročito na poljoprivredu, gde je dostupnost velikih količina ispravne vode za napajanje životinja i irigaciju od ključnog značaja (EEA, 2009; EEA, 2010a; Markland et al., 2017).

Prema podacima iz 2010. godine, na navodnjavanje useva i napajanje stoke u evropskim zemljama trošilo se u proseku oko 33% ukupne količine dostupne vode. U zemljama Južne Evrope količina vode koja se potroši na navodnjavanje useva kreće se i do 80% (EEA, 2012). Smatra se da će se, usled povećanja proizvodnje i još većeg razvoja industrije, potreba za vodom do 2050. godine uvećati za 55%, što bi moglo dodatno da ugrozi dostupnost ovog resursa neophodnog za poljoprivredu (OECD, 2008). U poslednjih 50 godina količina vode potrebna za poljoprivredu i navodnjavanje useva povećala se tri puta, tako da se smatra da se više od 70% vode troši na zalivanje useva (GA, 2016).

Osim drastičnog uticaja na dostupnost vode za navodnjavanje, klimatske promene utiču i na njen kvalitet. Naročito tokom letnjih meseci suša se sve češće javlja, što je posebno izraženo na jugu Evrope kao i na ostrvima u Mediteranu, i uslovljava smanjenje prinosa različitih biljnih kultura. Sam smanjeni kvantitet nije jedino što je zabrinjavajuće, pošto nedostatak vode direktno utiče na to da se ljudi okreću alternativnim izvorima vode za navodnjavanje koji vrlo često nisu hemijski ni mikrobiološki ispravni (EEA, 2010b). Kanalizacioni ispusti, industrijske otpadne vode, kao i spiranje obradivog zemljišta sa njiva prethodno tretiranih prirodnim đubrivom, može da dovede do zagađenja vode (Li et al., 2021). Ukoliko se kontaminirana voda, koja se prirodno vraća u cirkulaciju kroz površinske ili podzemne vode, ponovo koristi za navodnjavanje ili napajanje stoke, može doći do trovanja ili do epidemija i epizootija (Weller et al., 2015). Imajući u vidu navedene rizike po zdravlje ljudi i životinja i moguće načine da se oni eliminišu ili makar minimiziraju, razvoj tehnologija za prečišćavanje vode koja omogućava reciklažu već iskorišćene vode u tehničku vodu za irigaciju, pa

čak i pijaću, značajno je napredovao. Zahvaljujući finansijskim podsticajima Evropske Unije, kao što je na primer SUWANU projekat (2019[©] SUWANU), neke zemlje (Španija, Kipar, itd.) koriste upravo ovu obnovljenu (engl. *reclaimed*) vodu za irigaciju. Obnovljena voda nakon obrade postaje bistra, čista i nema miris. U Španiji se upotreba obnovljene vode kreće oko 10%, a u nekim regijama dostiže čak i 72%. Na žalost, uprkos finansijskoj podršci, tehnologija za prečišćavanje otpadnih voda izuzetno je skupa i nije dostupna mnogim zemljama koje su pogođene periodima suše koji traju od nekoliko meseci, pa čak do nekoliko godina. U centralnoj Evropi, sušni period tokom proleća ponavlja se poslednjih 14 godina (Ioanita et al., 2020).

1.1.2. Voda kao rezervoar i medijum za transmisiju mikroorganizama

Vode u kojima postoji veća količina rastvorenih nutrijenata nazivaju se eutrofnim i one veoma često predstavljaju pogodan medijum za prenos, pa i razmnožavanje patogenih mikroorganizama. Do eutrofikacije vode može doći prirodnim putem u samom sistemu ili van njega, međutim, veoma često presudan uticaj imaju antropogeni faktori. Vodotokovi u većini zemalja predstavljaju recipijente za ispuštanje fekalnih materija, te je ovo dominantan način na koji u njih dospevaju patogeni mikroorganizmi koji se prenose vodom. Ljudi i životinje mogu da se inficiraju konzumiranjem higijenski neispravne vode, plivanjem, ili pak konzumiranjem hrane koja je pripremljena ili oprana vodom kontaminiranom patogenima (Magana-Arachchi et al., 2020). Upotreba kontaminirane vode dovela je do pojave mnogih hidričnih epidemija, što nije neobično s obzirom na to da je u svetu zabeležen veliki stepen kontaminacije površinskih voda različitim patogenima (Patel et al., 2016). Patogeni koji se prenose vodom mogu se podeliti na viruse, bakterije i parazite, s tim što će u okviru ovog istraživanja pažnja biti usmerena na parazitske protozoe, iako se putem vode mogu preneti i druge grupe parazita (Bridle, 2014).

Najmanji od patogena koji se prenose vodom jesu virusi čija se veličina kreće od 20-300 nm. Iako veliki broj virusa koji se prenose vodom imaju tropizam prvenstveno ka gastrointestinalnom traktu (GIT), neki virusi mogu da dovedu do infekcije i drugih sistema organa. Mada su uglavnom specifični za vrstu, virusi mogu da dovedu do oboljevanja i ljudi i životinja, tj. da budu uzročnici zoonoza. Pojedini virusi su veoma otporni u vodenoj sredini i mogu dugo da prežive čak i u bunarima za vodosnabdevanje koji se smatraju mikrobiološki ispravnima (Borchardt et al., 2007). Svetska zdravstvena organizacija (SZO) izdvojila je nekoliko virusa od posebnog značaja kao potencijalne uzročnike hidričnih epidemija : Adenovirus, Astrovirus, Enterovirus, Hepatitis virus A i E, Norovirus, Rotavirus i Sapovirus. Većina navedenih virusa uglavnom izazivaju oboljenja samo GIT-a a glavni put infekcije jeste *per os* (WHO, 2009).

Bakterije su veoma heterogena grupa mikroorganizama i naseljavaju sve ekosisteme na planeti Zemlji, pa i vodene. U svakom mililitru vode nalaze se milioni jedinki različitih vrsta bakterija, a samo jedan manji broj vrsta je patogen i predstavlja opasnost po zdravlje ljudi i životinja. Veličina bakterija se razlikuje u zavisnosti od vrste i obično iznosi od pola do nekoliko mikrometara, tj. znatno su veće od virusa, a nešto sitnije od parazitskih protozoa, mada ovo ne mora uvek da bude pravilo (Bridle, 2014). Najčešće bakterije uzročnici hidričnih epidemija, ujedno prepoznate od SZO kao posebno značajne jesu: *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *Escherichia coli* (enterohemoragični soj), *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* (WHO, 2011). Način infekcije je sličan kao i kod virusa odnosno dominantno *per os*, dok manji broj bakterija može da izazove bolest dospevanjem u organizam preko kože ili inhalacijom.

Paraziti u vodi do domaćina stižu na dva načina – aktivnim putem, odnosno plivajući (larve nekih nematoda), ili pasivno, nošeni strujom (jaja, ciste, oociste). Kako će se ovo istraživanje baviti parazitskim protozoama i detekcijom njihovih životnih oblika, cista i oocista, prilagođenih za

opstanak u spoljašnjoj sredini odnosno u vodi, biće istaknute neke njihove karakteristike. Protozoe su takođe mikroskopski sitni organizmi (veličine od 5 μm do 1 mm) ali su za razliku od bakterija eukarioti, i obuhvataju sporozoe (intracelularni paraziti), amebe (koriste pseudopodije, odnosno lažne nožice za kretanje), flagelate odn. bičare (poseduju bičeve za kretanje) i cilijate odn. trepljaše (po površini tela imaju veliki broj treplji koje koriste za kretanje, kao i prilikom ishrane) (Fenchel, 1987). Najveći broj vrsta protozoa jesu slobodnoživeće, sposobne da autonomno egzistiraju u svom okruženju, za razliku od parazitskih koje makar u jednom stadijumu svog životnog ciklusa zavise od domaćina. Parazitske protozoe koje su od posebnog značaja za zdravlje ljudi i životinja jesu: *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayentanensis*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp., i *Toxoplasma gondii* (Garcia et al., 2017; Hemphill et al., 2019).

1.2. Patogene protozoe koje se prenose vodom

U naredna tri potpoglavlja izložene su osnovne biološke karakteristike – životni ciklus, oblici i morfološke karakteristike – kao i putevi prenošenja, patogeneza i klinički značaj protozoa koje su predmet ovog istraživanja.

1.2.1. *Giardia intestinalis*

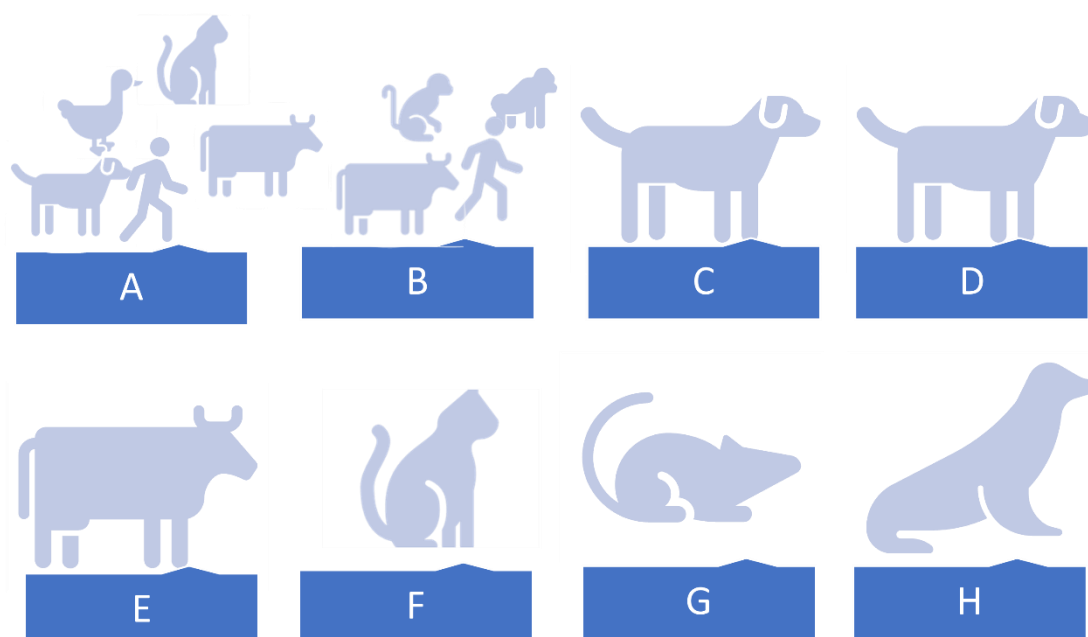
Giardia intestinalis je jednoćelijski eukariotski organizam, odnosno parazitska protozoa, koja od kada je otkrivena još u 17. veku, intrigira parazitologe zbog svojih neobičnih karakteristika (Thompson & Ash, 2019; Adam, 2001). Ova protozoa uzročnik je oboljenja đardioze (lamblijaze, đardijaze), i ima dve forme, trofozoit koji je metabolički aktivna forma i koja se nalazi u crevima domaćina (velikog broja kičmenjaka uključujući i čoveka), i formu ciste koja predstavlja infektivni oblik a ujedno je veoma otporna na uslove spoljašnje sredine. *G. intestinalis* ima dva diploidna jedra i oba su uključena u procese transkripcije; nedostaju joj neke organele poput peroksizoma i mitohondrija; s druge strane poseduje druge organele poput ventralnog adherentnog diska koji omogućava parazitu prijanjanje za enterocite domaćina (Thompson & Monis, 2004; Morrison et al., 2007). Prevalencija đardioze kod ljudi u razvijenim zemljama iznosi između 2 i 7% (Dixon, 2021), a zoonotski potencijal *G. intestinalis* stavlja je u fokus istraživanja parazitologa i svrstava je među važne parazite koji se prenose hranom i vodom. U nerazvijenim zemljama prevalencija đardioze je višestruko veća i kreće se u rasponu 20-40% (Feng & Xiao, 2011). Takođe, u nerazvijenim zemljama najviša stopa infekcije je kod dece mlađe od 5 godina; pored *G. intestinalis* koja se nalazi na trećem mestu po učestalosti, dijareju kod dece još izazivaju i *Cryptosporidium* spp. i rotavirus, ali sa daleko ozbiljnijom kliničkom slikom i posledicama (Lanata et al., 2013).

Prema staroj sistematici koja se zasnivala samo na morfološkim karakteristikama, *G. intestinalis* je pripadala filumu Sarcomastigophora, red Diplomonadida, porodici Hexamitidae. Međutim, prema novijoj sistematici koja se zasniva na savremenim molekularno-genetičkim i biohemijskim pristupima, *G. intestinalis* svrstana je u filum Metamonada, subfilum Trichozoa, natklasu Eopharyngia, klasu Trepomonadea, potklasu Diplozoa, red Giardia i porodicu Giardiae (Cox, 2002; Cavalier-Smith, 2003; Thompson & Monis, 2012).

Sistematika i taksonomski status vrsta u rodu *Giardia*, koje su različiti autori prihvatili kao validne, značajno se menjala tokom prethodnih decenija, u zavisnosti od dostupnih metoda proučavanja, ali i razlika u konceptima i kriterijumima koji su uzimani u obzir. Na osnovu morfoloških kriterijuma (na bazi svetlosne i elektronske mikroskopije), kao i procena specifičnosti u odnosu na domaćina, različiti autori izdvajali su od tri do sedam vrsta tokom druge polovine XX veka (prema Thompson & Monis, 2004; Ryan et al., 2021). Uvođenjem novih, molekularno-genetičkih

metoda, broj vrsta koje autori prihvataju početkom XXI veka varira od šest (Plutzer et al., 2010) do jedanaest (Thompson & Monis, 2004). Do razlike dolazi pre svega zbog različite interpretacije značaja genetičke varijabilnosti unutar pojedinih prihvaćenih vrsta, tako što autori tretiraju pojedine genetičke komplekse kao nezavisne vrste. Uz značajne promene usled otkrića ili revalidacije dodatnih taksonomskih entiteta, postoji i nomenklaturni problem: *G. intestinalis* predstavlja najviše proučavanu vrstu, koja se u literaturi navodi pod još dva imena – *Giardia duodenalis* i *Giardia lamblia*, sa statusom sinonima. Po nomenklaturnim pravilima, *G. duodenalis* predstavlja najkorektnije rešenje (Thompson & Monis, 2004), ali oko toga još nije postignut dovoljan konsenzus među mnogobrojnim istraživačima i praktičarima (Adam, 2001; Ryan et al., 2021). U ovom doktoratu primenjena je nomenklaturna varijanta koja se koristi od strane referentnih baza Universal Protein Resource (UniProt: <https://www.uniprot.org/taxonomy/5741>) i National Center for Biotechnology Information (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/5740/>).

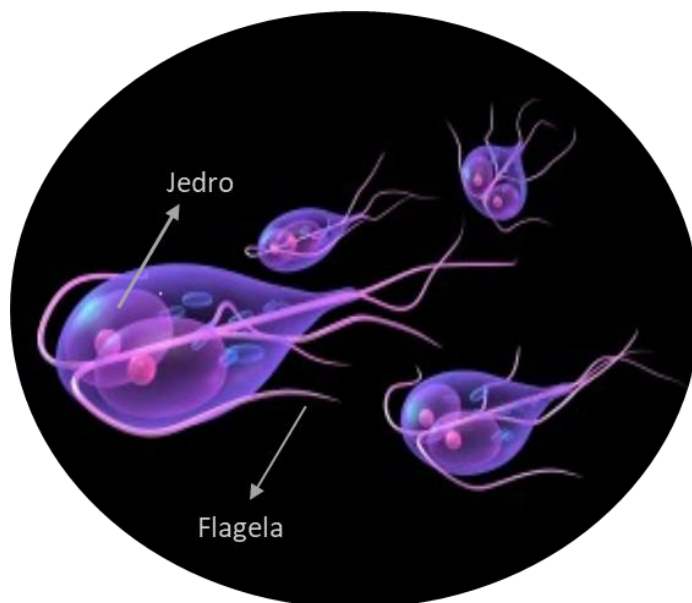
Giardia intestinalis se naziva još i multispecijskim kompleksom što je i potvrđeno analizom antigena, kao i analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) (Feng & Xiao, 2011). Ove analize su omogućile da se kompleks *G. intestinalis* podeli na nekoliko grupa koje su kasnije dobile naziv asemblaže i kojih je ukupno osam. Asemblaže su označene slovima A-H (Morgan et al., 1993). Asemblaže A i B poseduju najveći zoonotski potencijal jer su najmanje specifične za domaćina, asemblaže C i D su uglavnom karakteristične za pse, asemblaža E za goveda i druge papkare, F asemblaža izaziva đardiozu mačaka dok G parazitira uglavnom kod pacova (Mayrhofer et al., 1995). Poslednja otkrivena je asemblaža H koja se javlja kod foka i drugih perajara i kod torbara (Lasek-Nesselquist et al., 2010; Ryan et al., 2021) (Slika 1.1). Najnovija istraživanja ustanovila su da je vrsta *G. microti*, poput *G. intestinalis*, takođe multispecijski kompleks, u okviru koga se nalaze još tri asemblaže koje parazitiraju kod glodara, međutim, na osnovu genetičke specifičnosti i razlika, termin asemblaža je ovom slučaju zamenjen terminom vrsta (van Keulen et al., 2002; Hillman et al., 2016; Lyu et al., 2018). Na osnovu poslednjih istraživanja konačan broj vrsta u okviru roda *Giardia* iznosi devet, s tim što u okviru vrste *G. intestinalis* postoji navedenih osam asemblaža (Ryan et al., 2021).



Slika 1.1. Asemblaže *G. intestinalis* i domaćini u kojima najčešće parazitiraju

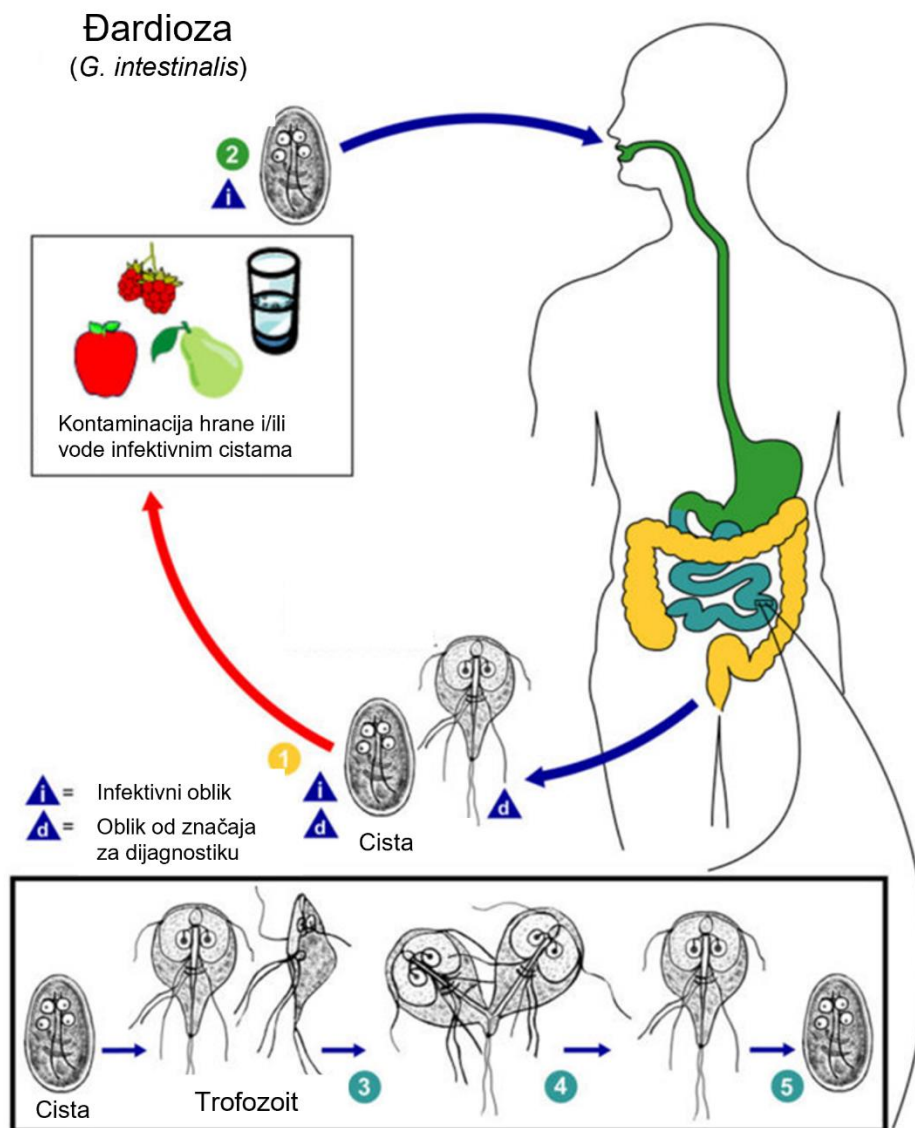
Do infekcije protozooom *Giardia* spp. dolazi nakon ingestije vijabilne i infektivne ciste putem hrane ili vode ili direktnim kontaktom odnosno prenosom sa obolele na zdravu jedinku. Kao što je pomenuto, cista je dosta robusna pa tako neoštećena prolazi kroz želudac i želudačna kiselina je ne inaktivira. Ekskistacija se odigrava u gornjim partijama tankog creva, najčešće u dvanaestopalačnom, gde se nekoliko sati nakon ingestije oslobađaju dva trofozoita koji se pomoću ventralnog diska pripajaju za enterocite. Trofozoiti se umnožavaju binarnom deobom pri čemu jedan broj ostaje u lumenu creva, dok se manji broj parazita incistira i fecesom izbacuje u spoljašnju sredinu. Kontinuitet eliminacije i količina ekskretovanih cista mogu da osciluju u zavisnosti od vrste domaćina i parazita (Adam, 2001).

Kako je *Giardia* spp. jedna od najprimitivnijih eukariota, neki evolucionari smatraju da predstavlja prelaz tj. vezu između prokariotskih i eukariotskih organizama. *Giardia* spp. nema sve organele koje inače poseduju drugi jednoćelijski eukariotski organizmi, tako da to dodatno potvrđuje ovu teoriju (Sogin et al., 1991; Sulaiman & Cama, 2006). Vegetativna forma ili trofozoit, u zavisnosti od vrste, duga je između 12 i 15 μm a široka od 5 do 9 μm , karakterističnog oblika suze ili kruške (Slika 1.2). Trofozoit je bilateralno simetričan i poseduje dva jedra koja su simetrično postavljena, tako da trofozoit posmatran pod mikroskopom deluje kao da poseduje oči. Vegetativni oblik ima četiri para flagela pomoću kojih se vrlo brzo kreće i one su, prema mestu gde se nalaze, podeljene na prednje, zadnje, ventralne i kaudalne. U osnovi svake flagele nalazi se bazalno telo. Trofozoit poseduje ribosome i lizosome dok se Goldžijev kompleks ne vidi prilikom mikroskopiranja; prelaskom parazita u formu ciste, međutim, Goldžijev kompleks postaje uočljiv. Trofozoiti se uglavnom nalaze u srednjem delu jejunuma, ventralnim diskom zalepljeni za površinu creva, što sprečava da iz organizma domaćina budu izbačeni peristaltičkim pokretima (Adam, 2001). Ventralni disk je veoma bitan deo trofozoita za preživljavanje i zauzima skoro ceo donji (ventralni) deo parazita. Zato je i dejstvo većine antiparazitika usmereno baš na ventralni disk, sprečavajući njegovo normalno funkcionisanje i adheriranje parazita za enterocite (Holberton, 1973). Još jedna morfološka karakteristika trofozoita *Giardia* spp. je medijalno telo. Ova tvorevina je deo citoskeleta, prolazi kroz sredinu tela parazita i izgrađena je od mikrofilamenata. Medijalno telo je specifično za svaku vrstu *Giardia* spp. pa se može koristiti i za njihovu diferencijalnu identifikaciju (Meng et al., 1996).



Slika 1.2. Trofozoiti *Giardia* spp. Preuzeto i licencirano pod: [CC BY-SA-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Incistacija nastaje spontano i još uvek se ne zna tačan razlog zašto i kada dolazi do prelaska iz forme trofozoita u formu ciste. Veličina ciste zavisi od vrste *Giardia* spp. i kreće se od 5 µm do oko 15 µm. Trofozoit prelazi u formu ciste nakon završene deobe jedara ali pre završetka deobe citoplazme. Ovo znači da svaka formirana cista poseduje četiri jedra. Cista ima zid (omotač) koji se sastoji iz dve membrane, spoljašnje mrežaste i unutrašnje dvoslojne (Erlandsen et al., 1990). Kao što je već pomenuto, omotač ciste pruža odličnu zaštitu od spoljnih faktora, fizičkih, hemijskih i mehaničkih. Iako se cista smatra metabolički neaktivnom formom *Giardia* spp., metabolički procesi se unutar ciste ipak odvijaju i to na nivou od oko 10% metabolizma kod trofozoita (Paget et al., 1989). Po izbacivanju putem fecesa iz tela domaćina, cista *Giardia* spp. je odmah infektivna.



Slika 1.3. Životni ciklus *G. intestinalis*. Preuzeto i izmenjeno sa: Centers for Disease Control and Prevention. DPDx: *G. intestinalis* (<http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>)

Infekcija ljudi protozomom *G. intestinalis* i to uglavnom asemblažama A i B, nastaje nakon ingestije ciste, bilo putem kontaminirane hrane, vode, ili pak direktnim kontaktom (Slika 1.3). Na osnovu obrade oko 2.800 uzoraka prikupljenih širom sveta, utvrđeno je da je asemblaža B dominantnija kod ljudi i da prevalencija iznosi 58%, dok prevalencija asemblaže A u ljudskoj

populaciji iznosi 37% (Ryan & Cacciò, 2013). U razvijenim zemljama đardioza se najčešće javlja kod ljudi koji često putuju u zemlje gde je ovaj parazit više zastupljen (endemska područja), zatim u centrima za smeštaj većeg broja ljudi (prihvatilišta, obdaništa), kao i kod male dece (Eckmann, 2003; Thompson & Monis, 2004). Prvi simptomi javljaju se između 7. i 12. dana po infekciji i uglavnom je to dijareja sa malapsorpcijom, povraćanje, mučnina i nadutost (Bartelt & Sartor, 2015). Kako će se bolest dalje razvijati jeste individualno tj. izvestan broj obolelih ima blage, skoro neprimetne digestivne smetnje koje brzo prolaze, dok jedan manji broj ljudi ima dugoročne probleme i smetnje u varenju koje perzistiraju čak i nakon primene terapije. Kod ovakvih pacijenata, kod kojih đardioza poprima hroničan tok, progredijentno su zabeležene bolesti poput sindroma iritabilnog kolona, alergije na hranu, artritis, itd. (Bartelt & Sartor, 2015). Interesantno je da su, uprkos nizu problema koje može izazvati, naročito kod dece ili imunosupriminiranih pacijenata (Stark et al., 2009), nedavna istraživanja pokazala da infekcija protozooom *G. intestinalis* donekle ima i protektivni efekat. Naime, utvrđeno je da *G. intestinalis* ispoljava antiinflamatorna svojstva kod ljudi koji već imaju hroničnu dijareju uzrokovanu nekim drugim agensima (virusima ili drugim parazitima) (Cotton et al., 2015; Einarsson et al., 2016).

Vrsta *G. intestinalis* je veoma čest parazit domaćih životinja širom sveta, naročito goveda, kao i divljih životinja (Feng & Xiao, 2011). Prevalencija đardioze zavisi od vrste i od starosti ispitivanih životinja (Santin, 2020); istraživanja su potvrdila da su mladunci podložniji oboljevanju od adultnih jedinki. Prevalencija infekcije *Giardia* spp. naročito je visoka kod goveda, a postoje značajne razlike u prevalenciji u zavisnosti od starosti životinja i načina uzgoja, kao i kod svinja, koza i drugih vrsta (Feng & Xiao, 2011). Kod domaćih, odnosno farmskih životinja, đardioza uglavnom prolazi asimptomatski, međutim, nije neobično da se kod obolelih jedinki javi dijareja koja može biti toliko obilna da čak dovede do uginuća. Čak i kao asimptomatska, kod goveda na primer, đardioza može da izazove značajan pad produktivnosti a posledično i velike ekonomske gubitke (Santin, 2020).

Prevalencija đardioze kod kućnih ljubimaca, naročito kod pasa i mačaka, može da bude prilično visoka i takođe veoma osciluje u zavisnosti od vrste, rase, pola, itd. (Bouزيد et al., 2015). Kod odraslih jedinki obe vrste, infekcija protozooom *Giardia* spp. uglavnom prolazi bez simptoma. Kod mlađih, osetljivijih jedinki dolazi do pojave dijareje sa elementima maldigestije i malasorpcije (Siwila, 2017). Istraživanja sprovedena u evropskim zemljama u poslednjih nekoliko godina pokazala su da je prevalencija kod pasa od 0,8% do 42%, a kod mačaka od 5,9% do 20,5% (Piekara-Stępińska et al., 2021). Međutim, i u slučaju visoke prevalencije, i uprkos bliskom kontaktu ovih vrsta sa ljudima, sa kojima dele prostor i hranu, rizik od transmisije parazita sa životinje na čoveka nije visok. Većina asemblaža koje su karakteristične za pse i mačke ne izazivaju bolest kod čoveka ili se bolest javlja sa veoma blagim simptomima, međutim svakako je poželjno biti oprezan i u slučaju pozitivnog nalaza kod kućnog ljubimca treba odrediti asemblažu izolata (Bouزيد et al., 2015).

U spoljašnjoj sredini, kao npr. u zemljištu, lotičkim i lentičkim vodama kao i vodozahvatima, ciste *Giardia* spp. mogu se naći praktično svuda. Kontaminacija zemljišta najčešće nastaje direktno, dok kontaminacija vode može da nastane direktno, kanalizacionim ispustima, i indirektno, spiranjem zemljišta kontaminiranog cistama. U mnogim zemljama postoje strogi pravilnici za monitoring stepena kontaminacije vodotokova ovom protozooom, ali i pored toga epidemije se javljaju kao posledica velike sposobnosti cista *Giardia* spp. da ostanu vijabilne u različitim uslovima spoljašnje sredine. Istraživanja koja su se bavila određivanjem prisustva cista ove protozoe u kanalizacionim i otpadnim vodama širom sveta pokazala su prisustvo *Giardia* spp. u skoro 100% od ukupnog broja uzoraka neprerađene kanalizacione vode koja se ispušta u vodotokove. Ovi podaci nisu se mnogo razlikovali ni u razvijenim kao ni u zemljama u razvoju (Cacciò et al., 2003; Harwood et al., 2005; Hachich et al., 2013; Kitajima et al., 2014). S druge strane, iako sistemi za prečišćavanje kanalizacionih voda smanjuju količinu organskih materija koje se ispuštaju u vodotokove, izvestan broj istraživanja je pokazao da je broj cista *Giardia* spp. zapravo veći u prečišćenim otpadnim vodama

nego neprečišćenim, a pretpostavlja se kao posledica koncentracije. Međutim, to može da bude i posledica neadekvatnog uzorkovanja, lakše detekcije parazita u čistijem uzorku, nejednakoj distribuciji cista u neprečišćenoj kanalizacionoj vodi i sl. (McBride et al., 2013). Kontaminacija zemljišta cistama može da dovede i do kontaminacije vode ukoliko dođe do njegovog spiranja usled padavina, a posebno je značajno to što ciste ostaju infektivne mesecima nakon dospevanja u spoljašnju sredinu, ukoliko su uslovi adekvatni. Istraživanja rađena u Skandinaviji ipak su pokazala da ciste gube vijabilnost nakon nekoliko ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, što se i događa tokom tamnošnjih zima. Ovo je kasnije potvrđeno i u laboratoriji tako da je otklonjena bojazan da zemljište kontaminirano cistama tokom jedne godine može da predstavlja opasnost i sledeće (Robertson & Gjerde, 2004). Međutim, u drugim delovima sveta i Evrope, gde temperature zimi nisu ekstremno niske, ciste mogu da prežive i budu infektivne čak i nakon zime (Plutzer et al., 2010).

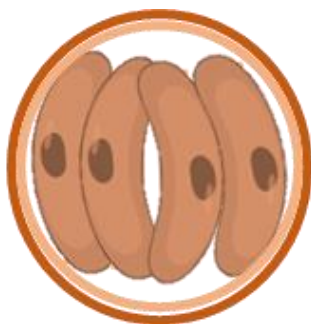
1.2.2. *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium spp. je ubikvitarni intracelularni, a ekstracitoplazmatski parazit, koji je sposoban da veoma dugo preživi u spoljašnjoj sredini jer dobro toleriše uticaj meteoroloških i drugih faktora. Ova sitna gregarina ima zoonotski karakter tj. sposobna je da izazove ozbiljna oboljenja ljudi i životinja, ne tako retko i sa smrtnim ishodom (Thompson et al., 2016). Prva otkrivena iz ove grupe organizama bila je *Cryptosporidium muris* koju je identifikovao Tyzzer, a dve godine kasnije, 1912., otkrivena je i *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer, 1910; Tyzzer, 1912; Tzipori & Widmer, 2008). Organizmi iz roda *Cryptosporidium* pripadaju filumu Apicomplexa zajedno sa još nekim parazitima od velikog značaja za zdravlje ljudi, međutim, molekularna istraživanja su pokazala da su ovi organizmi sličniji gregarinama nego kokcidijskim što bi moglo da objasni neke njihove specifičnosti (Carreno et al., 1999; Cavalier-Smith, 2014). Na primer, organizmi iz roda *Cryptosporidium* su, za razliku od kokcidijskih, otporni na kokcidiostatike, a unutar domaćina formiraju dva tipa oocista, sa debelim i sa tankim omotačem, pri čemu su sitnije od oocista kokcidijskih (Ryan et al., 2003). Takođe, kod vrsta *C. andersoni* i *C. parvum* primećene su faze ekstracelularnog razmnožavanja koje podseća na razmnožavanje gregarina (Ryan & Hijjawi, 2015). Ovo je potvrđeno i eksperimentalno kada su se ovi organizmi razmnožavali u medijumu bez prisustva životinjskih ili ljudskih ćelijskih linija (Ryan et al., 2016). Dakle, iako je donedavno rod *Cryptosporidium* pripadao filumu Apicomplexa, klasi Coccidiomorpha (Doflein, 1901), potklasi Coccidia (Leuckart, 1879), premešten je u novu potklasu – Cryptogregaria, u okviru klase Gregarinomorpha (Cavalier-Smith, 2014). Do sada je otkriveno 38 vrsta roda *Cryptosporidium* i ovaj broj se konstantno uvećava. Pored identifikovanih vrsta, postoji i više od 50 genotipova koji još uvek nemaju svoje ime već se nazivaju po vrstama životinja iz kojih su izolovani (Ryan et al., 2016; Xiao & Cama, 2018; Feng et al., 2018).

Cryptosporidium spp. je „idealni“ parazit, jer se oociste ekskretom obolelih jedinki u velikom broju eliminišu u spoljašnju sredinu gde dugo ostaju infektivne, zahvaljujući velikoj rezistentnosti na različite uslove; takođe, teoretski je dovoljna jedna jedina oocista da bi izazvala infekciju prijemčivog domaćina (Chappell et al., 2006). *Cryptosporidium* spp. je značajan uzročnik dijareje kod ljudi i goveda širom sveta, a naročito kod domaćina sa oslabljenim ili još uvek nezrelim imunskim sistemom (Checkley et al., 2015). Kao i kod *Giardia* spp., put prenošenja je feko-oralni, direktan sa čoveka na čoveka, životinje na čoveka ili obratno, i indirektan, preko kontaminirane hrane ili vode. Životinje koje se smatraju posebno značajnim kao izvor infekcije *Cryptosporidium* spp. jesu goveda i ovce, što je dokazano i nekim istraživanjima faktora rizika za ovu infekciju (Robertson et al., 2002; Hunter et al., 2004). Međutim, iako se goveda smatraju glavnim uzrokom kontaminacije vode oocistama, utvrđeno je da vrlo često izvor predstavljaju kanizacioni ispusti u vodotokove, a mogućnost da dođe do infekcije ljudi veća je u ruralnim sredinama, najčešće usled neadekvatnih kanizacionih sistema i nepravilnog izđubavanja (Thompson & Smith, 2011). Istraživanje puteva širenja kroz prirodu i

otkrivanje izvora infekcije *Cryptosporidium* spp. od velikog je značaja za sprečavanje epidemija uzrokovanih ovom protozooom (Dumetre et al., 2012).

Infekcija nastaje kada čovek ili životinja progutaju sporulisanu oocistu. Oocista poseduje debeli omotač koji se sastoji od dva sloja proteina, masti i ugljenih hidrata koji su međusobno povezani, i koji joj pruža odličnu zaštitu. Iako je sproveden veliki broj istraživanja, sastav i funkcija omotača oociste *Cryptosporidium* spp. nisu u potpunosti razjašnjeni (Templeton et al., 2004). (Slika 1.4.).



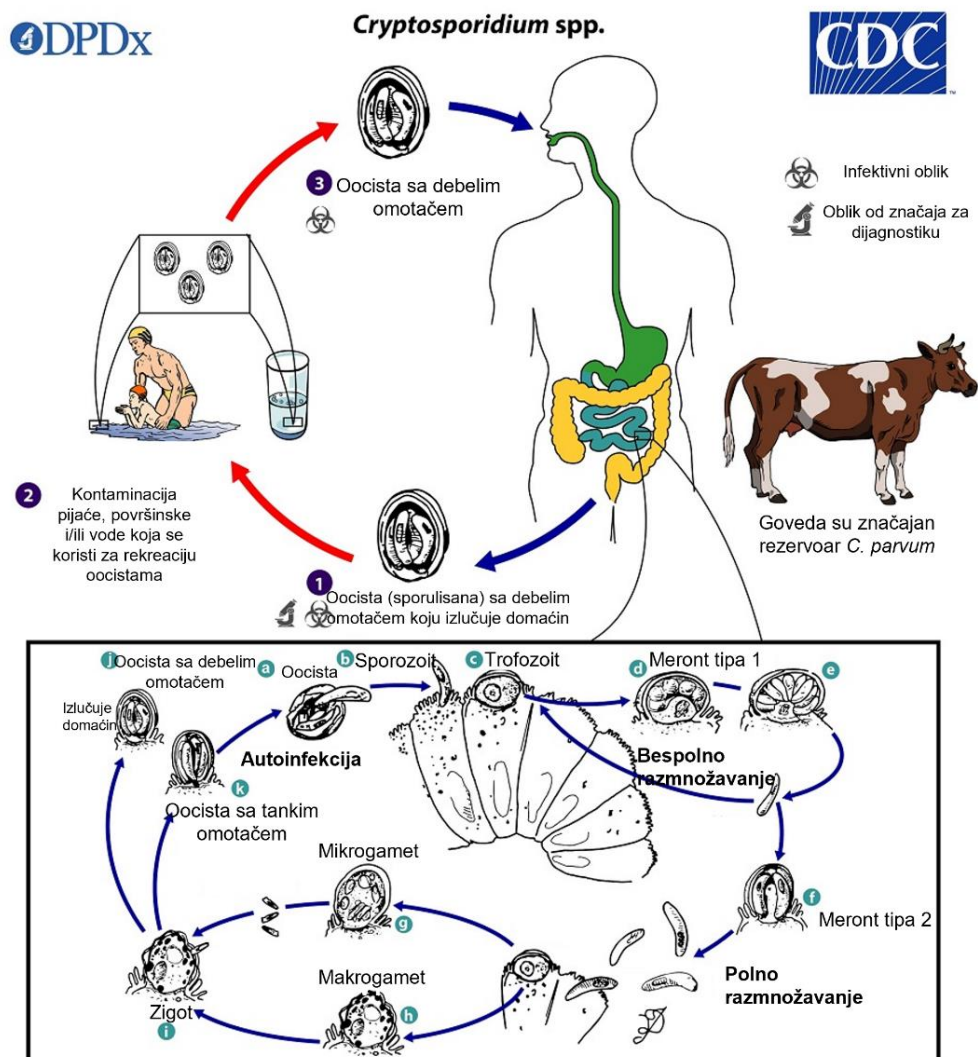
Slika 1.4. Šematski prikaz oociste *Cryptosporidium* spp.

Prosečna veličina oociste je oko 5 μm , ali može da bude veća ili manja u zavisnosti od vrste (Leitch & He, 2012). Pod uticajem enzima za varenje u želucu i dvanaestopalačnom crevu dolazi do ekscitacije i oslobađanja četiri pokretna sporozoita. Sporozoiti vrše invaziju epitelnih ćelija creva i stvaraju parazitoformnu vakuolu za koju se ranije smatralo da je u potpunosti poreklom od ćelije domaćina, međutim kasnije je pokazano da jedan deo membrane ove vakuole sintetiše i sam parazit (Borowski et al., 2008). Unutar vakuole, trofozoiti prolaze kroz nekoliko deoba, nakon čega dolazi do formiranja meronta tipa 1 koji se razmnožavaju u 6-8 (u zavisnosti od vrste) merozoita tipa 1 (Smith et al., 2005). Merozoiti tipa 1 morfološki podsećaju na sporozoite i nakon napuštanja vakuole invadiraju enterocite, kao i sporozoiti. Neki od merozoita tipa 1 stvaraju meronte tipa 2 iz kojih se nakon nekog vremena oslobađaju merozoiti tipa 2 koji mogu da napadaju i inficiraju enterocite poput merozoita tip 1, ili da se diferenciraju u makro- i mikrogamonte i da se uključe u proces gametogonije. Tokom gametogonije stvara se zigot, a potom i oocista (Slika 1.5). *Cryptosporidium* spp. stvara dva tipa oocista, oociste sa tankim i debelim omotačem. Smatra se da je 20% od ukupnog broja stvorenih oocista sa tankim omotačem, koje ekscitiraju još dok su u lumenu creva i dovode do autoinfekcije (Thompson, 2008). Ostatak oocista su oociste sa debelim omotačem i kao takve bivaju izbačene u spoljašnju sredinu i otporne su na veliki broj faktora (Xiao & Cama, 2018).

Ljudi su domaćini za oko 20 vrsta i genotipova *Cryptosporidium* spp., ali oboljenje kod čoveka najčešće izazivaju dve vrste, i to *C. hominis* i *C. parvum*. *C. hominis* najčešće izaziva infekciju samo u ljudskoj populaciji, ali je prenošenje moguće i među drugim primatima. *Cryptosporidium parvum* je zoonotski parazit jer pored ljudi inficira i veliki broj drugih vrsta. Ostale vrste parazita specifične su za vrstu i do sada je zabeleženo samo nekoliko slučajeva oboljevanja kod ljudi gde je potvrđeno da uzročnici nisu bili *C. hominis* ili *C. parvum* (Elwin et al., 2012; Kvač et al., 2014; Xiao & Feng, 2017; Y. Feng et al., 2018; Beser et al., 2020). Sve vrste su u stanju da izazovu bolest, kako kod imunokompetentnih, tako i kod imunokompromitovanih osoba, najčešće HIV pozitivnih, s tim što su neke vrste virulentnije od ostalih, kao što je to slučaj sa *C. hominis* (Cama et al., 2007).

Određen broj slučajeva kriptosporidioze kod ljudi prolazi asimptomatski, međutim, kod onih osoba kod kojih se razviju, simptomi uglavnom traju dve ili više nedelja, u zavisnosti od otpornosti organizma obolele osobe. Bolest je praćena dijarejom, koja može biti veoma obilna, kao i mučninom,

povraćanjem i dr. (Navin & Juranek, 1984; Chalmers & Davies, 2010). Na osnovu sprovedenih istraživanja, *Cryptosporidium* spp. je kod dece jedan od najvažnijih uzročnika dijareje (Betancourt, 2019). Takođe, istraživanja sprovedena u afričkim zemljama pokazala su da je kod HIV pozitivne dece sa dijarejom 18 puta veća verovatnoća da je ona uzrokovana *Cryptosporidium* spp. nego nekim drugim mikroorganizmom (Tumwine et al., 2005; Mbae et al., 2013).



Slika 1.5. Životni ciklus *Cryptosporidium* spp. Preuzeto i izmenjeno sa: Centers for Disease Control and Prevention. DPDx: *Cryptosporidium* (<https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>)

U imunokompetentnoj populaciji u zemljama u razvoju kriptosporidioza se najčešće javlja kod dece mlađe od pet godina, sa najvišom prevalencijom oko druge godine života ili mlađom (Kotloff et al., 2013). Iako samo trećina obolele dece ima simptome, čak i kod asimptomatskih slučajeva, bolest ostavlja posledice kao što su usporen rast i razvoj, tako da ova deca nikada ne dostignu po visini i težini vršnjake koji nisu imali kriptosporidiozu (Xiao et al., 2001; Sarkar et al., 2013; Khalil et al., 2018). Kriptosporidioza se kod dece u razvijenim zemljama javlja nešto kasnije i to obično u trećoj godini života (Mateo et al., 2014). Razlog je taj što u razvijenim zemljama deca kasnije dolaze u kontakt sa kontaminiranom sredinom ili sa drugom obolelom decom u kolektivima (obdaništa, škole) (Johansen et al., 2015).

Kod imunokompromitiranih pacijenata, poput onih sa AIDS-om, onkoloških pacijenata ili pacijenata koji su na imunosupresivnoj terapiji, kriptosporidioza je česta parazitarna infekcija (Hunter & Nichols, 2002). Kod HIV pozitivnih pacijenata, kriptosporidioza se ispoljava kao uporna dijareja koja veoma često može biti i opasna po život. Klinička slika, tok bolesti, kao i odgovor na terapiju su individualni, a u znatnom broju slučajeva terapija ovih pacijenata je bezuspešna (Chalmers & Davies, 2010). Takođe, pored gastrointestinalnog neretko se javlja i plućni oblik kriptosporidioze (Sullivan et al., 2013).

Mladunci goveda, ovaca i koza posebno su osetljivi na infekciju vrstama *Cryptosporidium*, te su veoma česta uginuća, a ukoliko se i oboljenje ne završi smrtnim ishodom, veliki su ekonomski gubici usled gubitka u telesnoj masi i smanjenog prirasta, slabog napredovanja i sl. (Santin, 2013). S obzirom na otpornost, kao i na veliki broj oocista eliminisanih u spoljašnju sredinu, prenošenje između jedinki u okviru iste farme ili gazdinstva veoma je lako. Najčešći vid prenosa jeste direktnim kontaktom (npr. sisanjem), mada je isto tako čest indirektan prenos hranom ili vodom (Paraud & Chartier, 2012). Infekcija farmskih životinja ne dovodi samo do ekonomskih gubitaka, već predstavlja i ozbiljan rizik po zdravlje ljudi koji su u stalnom kontaktu sa ovim životinjama. Preživari inficirani *C. parvum* izlučuju i do 10^7 oocista po gramu fecesa, što uzimajući prosek od 7,3 kg fecesa po danu po jednom govečetu (Nennich et al., 2005), predstavlja izuzetno veliki broj oocista izlučenih u spoljašnju sredinu i posledično veliki rizik po zdravlje (Fayer & Santín, 2009).

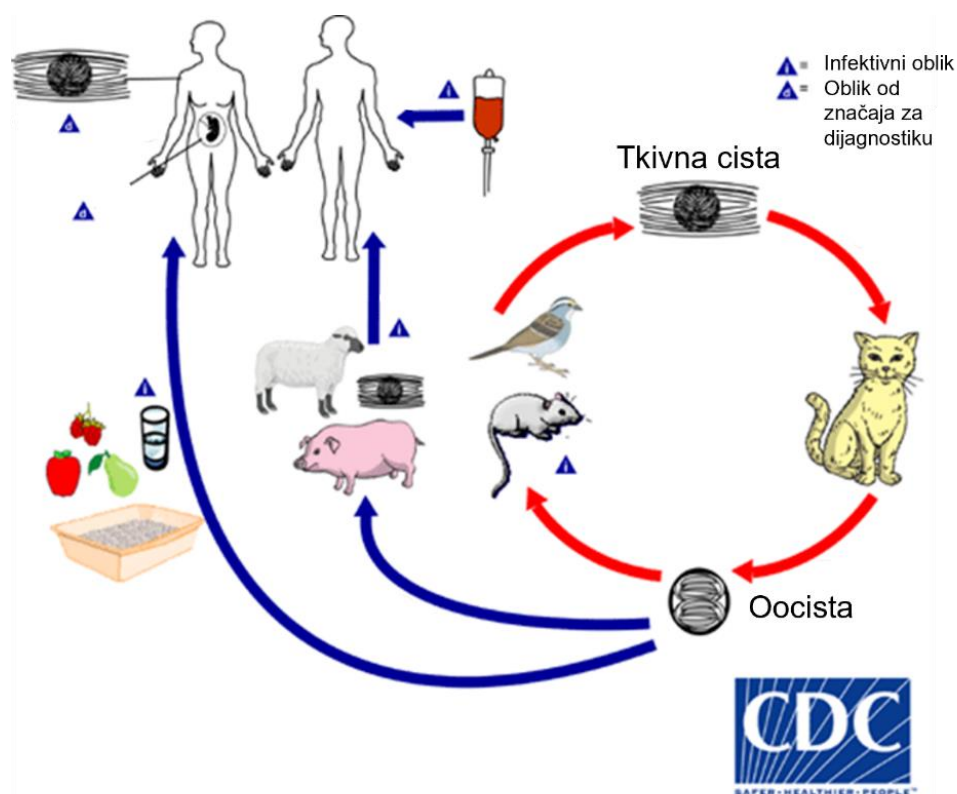
Kod pasa i mačaka, za razliku od farmskih životinja, kriptosporidioza uglavnom protiče asimptomatski. Eksperimentalno je pokazano da nakon infekcije čak ni mačići i štenci ne pokazuju neke značajne simptome, ali izlučuju oociste tokom 5-12 dana. Jedino u slučaju infekcije imunokompromitovanih jedinki dolazi do pojave dijareje i hronične anoreksije i apatije (Barr, 1997). *C. canis* i *C. felis* koje u najvećem broju slučajeva izazivaju infekciju pasa i mačaka veoma retko mogu da izazovu i infekciju ljudi. Može se reći da je za razliku od ostalih vrsta rizik za prenos ovog parazita sa pasa i mačaka na čoveka mali (Lucio-Forster et al., 2010).

Kontaminacija životne sredine (zemljišta, vode) uglavnom nastaje kao posledica nepravilnog odlaganja/upotrebe stajskog đubriva ili usled propusta u tehnologiji prerade otpadnih kanalizacionih voda, odnosno nepostojanja iste. Do zagađenja vodotokova najčešće dolazi usled đubrenja obradivog zemljišta prirodnim đubrivom poreklom od životinja koje su obolele od kriptosporidioze. Ukoliko dođe do padavina ubrzo nakon đubrenja a pogotovu ako su padavine obilne, oociste mogu da spiranjem zajedno sa kišnicom dospeju u površinske vode i na taj način ih kontaminiraju (Dorner et al., 2004; Brankston et al., 2018). Iako su oociste veoma otporne, neki faktori spoljašnje sredine, kao što su temperatura, isušivanje ili sunčeva svetlost, mogu značajno da im smanje vijabilnost i infektivnost. Visoke temperature utiču na vijabilnost oocista jer dolazi do ubrzavanja metabolizma sporozoita, što kao posledicu ima trošenje zaliha ugljenih hidrata unutar oociste i brže uginuće parazita. Takođe, starost oocista i infektivnost imaju obrnuto proporcionalan odnos. Duži sušni periodi isto tako negativno utiču na infektivnost oocista *Cryptosporidium* spp. (King et al., 2005). Eksperimentalno je pokazano da su oociste veoma osetljive na UV zrake, odnosno sunčevu svetlost. Biološkim ogledom na mišu dokazano je da su nakon izlaganja UV zracima u trajanju od 150 minuta oociste potpuno izgubile infektivnost, tj. ogledne životinje se nisu inficirale, iako su oociste zadržale sposobnost in vitro ekscitacije (Lorenzo-Lorenzo et al., 1993). I pored toga što su mehanizmi za reparaciju gena aktivni unutar oociste, oni nisu dovoljni da bi oocista zadržala infektivnost nakon izlaganja direktnim sunčevim zracima (Rochelle et al., 2004). Vegetacija takođe predstavlja prirodan filter koji sprečava kontaminaciju površinskih voda spiranjem usled padavina. U zavisnosti od više faktora, kao što su vrsta biljaka, količina padavina, stepen kontaminacije zemljišta i sl., dokazano je da biljke mogu značajno da umanje broj oocista u vodenim ekosistemima (Atwill et al., 2006; Collinet-Adler et al., 2010). S druge strane, niža temperatura i osenčena vlažna mesta doprinose očuvanju infektivnosti oocista i po nekoliko meseci (Alum et al., 2014).

1.2.3. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii jeste jedan od najuspešnijih parazita na planeti, a ujedno i jedan od najviše izučavanih. Smatra se da je oko 30% svetske populacije inficirano ovim parazitom pri čemu na prevalenciju značajno utiču lokacija, socio-ekonomski status, sanitarno-higijenski uslovi u kojima ljudi žive i drugo. *T. gondii* inficira i sve toplokrvne životinje pa je, pored toga što je značajna za medicinu, takođe i od velikog značaja i u veterinarskoj medicini (Dubey & Beattie, 1990; Montoya & Liesenfeld, 2004). Početkom XX veka, Nicolle & Manceaux (1908) izolovali su u Tunisu do tada nepoznatu protozou iz slezine, jetre i krvi malog sisara iz porodice glodara pod imenom gundi (*Ctenodactylus gundi*). Ime *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1909) ova protozoa dobila je zbog morfoloških karakteristika (oblika lûka), i po glodaru iz kojeg je izolovana. Međutim, do rasvetljavanja životnog ciklusa *T. gondii* proteklo je više decenija, kada je dokazano da su stalni domaćini za *T. gondii* mačke, tj. sve životinje iz porodice mačaka (Felidae), uključujući naravno i domaću mačku (*Felis catus*) (Frenkel et al., 1970; Hutchison et al., 1971). Prelazni domaćini su svi homeotermni organizmi, a dokazano je da pod određenim uslovima mogu da se inficiraju čak i neki ektotermni organizmi (Stone & Manwell, 1969). Do infekcije ljudi najčešće dolazi nakon konzumiranja nedovoljno termički obrađenog mesa kontaminiranog tkivnim cistama, ali takođe, infekcija je moguća i nakon konzumiranja neoprانog voća i povrća koje je kontaminirano oocistama kao i kontaminiranom vodom (Djurković-Djaković et al., 2019). Do infekcije može da dođe i intrauterino odnosno prelaskom parazita kroz placentu sa majke na plod (Cook et al., 2000; Remington et al., 1974; Remington, 2004). S obzirom na to da se oociste mogu naći i u slatkoj i slanoj vodi, kao i u zemljištu i na vegetaciji, i da mogu ostati dugo vijabilne, spoljašnja sredina, ukoliko je kontaminirana, može se smatrati značajnim izvorom infekcije (Shapiro et al., 2019).

Kao jedina vrsta roda *Toxoplasma* (Nicolle & Manceaux, 1909), *T. gondii* pripada filumu Apicomplexa (Levine, 1970), klasi Sporozoasida (Leukart, 1879) i porodici Toxoplasmatidae (Biocca, 1956). Životni ciklus parazita je složen i karakterišu ga tri životne forme: sporozoiti u oocistama, bradizoiti u tkivnim cistama (npr. u mesu), i tahizoiti. Infekcija stalnog domaćina, odnosno mačke, započinje ingestijom bilo koje od tri životne forme, pošto su sve tri infektivne. Prepatentni period, odnosno vreme koje protekne od infekcije pa do eliminacije oocista fecesom, zavisi od forme koju je životinja progutala. Nakon ingestije, pod uticajem proteolitičkih enzima u tankom crevu mačke dolazi do oslobađanja sporozoita (u slučaju unosa oociste), odn. bradizoita (u slučaju ingestije mesa kontaminiranog tkivnim cistama); ove forme zatim vrše invaziju enterocita i započinju bespolno razmnožavanje. Nakon nekoliko ciklusa deoba (šizogonija), sada merozoiti usled prenamnoženosti unutar ćelije dovode do njenog pucanja nakon čega se oslobađaju i vrše invaziju novih ćelija. Od jednog broja merozoita nastaju mikrogameti i makrogameti koji kasnije postaju deo polnog ciklusa odnosno polnog razmnožavanja *T. gondii* (Dubey et al., 1998b). Najduži prepatentni period javlja se nakon ingestije oociste i može da iznosi 18 i više dana, nešto kraći, nakon infekcije tahizoitima iznosi 13 dana, dok najkraći iznosi 3-10 dana, nakon ingestije tkivne ciste (Dubey, 1998a). Tokom akutne infekcije, mačke mogu fecesom da eliminišu i do nekoliko miliona oocista tokom tri nedelje koliko traje izlučivanje (Dubey, 2008). Oociste su neposredno nakon eliminacije nesporulisane (neinfektivne), a tek nakon 1-5 dana u spoljašnjoj sredini pod odgovarajućim uslovima temperature i vlage sporulišu i postaju infektivne i za stalne i za prelazne domaćine (Slika 1.6).



Slika 1.6. Životni ciklus - načini prenošenja *T. gondii*. Preuzeto i izmenjeno sa: Centers for Disease Control and Prevention. DPDx: Toxoplasmosis (<https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>)

Ispoljavanje toksoplazmoze kod velikih i malih preživara umnogome zavisi od vrste. Veliki preživari uglavnom nemaju nikakve simptome nakon infekcije, i mada su zabeleženi pobačaji kod goveda inficiranih *T. gondii*, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je pobačaj direktna posledica toksoplazmoze. Glavni simptom eksperimentalne infekcije goveda tahizoitima ili oocistama jeste povišena telesna temperatura koja može da traje i do dva meseca, praćena nazalnim iscetkom; smrtni slučajevi su retki a uglavnom se javljaju kod teladi intravenski inficiranih visokim dozama tahizoita (Stalheim et al., 1980; Stelzer et al., 2019). Za razliku od goveda, mali preživari – ovce i koze, veoma su prijemčive na infekciju. Smatra se da toksoplazmoza prouzrokuje velike ekonomske gubitke u uzgoju ovaca i koza zbog pobačaja kao posledice infekcije. Do infekcije najčešće dolazi unosom hraniva ili vode kontaminiranih oocistama, a ređe transplacentarno ili na neki drugi način. U slučaju simptomatski ispoljenog oboljenja, od infekcije do pojave simptoma prođe 3-6 dana; uglavnom su to febrilna stanja praćena anoreksijom koja traju do nedelju dana i spontano prolaze. Međutim, transplacentarna infekcija ploda dovodi do njegovog oštećenja ili pobačaja, što u nekim slučajevima može da dovede do poremećaja u estrusu ili čak do steriliteta (Stelzer et al., 2019).

Kod ljudi, kao i kod drugih prelaznih domaćina, infekcija parazitom *T. gondii* uglavnom prolazi asimptomatski ili sa nespecifičnim simptomima (Remington, 1974). Komplikacije i teža klinička slika najčešće se javljaju kod imunokompromitovanih osoba (Montoya, 2004). Kod zdravih ljudi nakon infekcije mogu da se jave simptomi slični gripu, poput umora, bola u mišićima i zglobovima i povišene telesne temperature. Simptomi prolaze spontano i mogu da traju od nekoliko dana do nekoliko nedelja. S obzirom na to da su svi ovi simptomi nespecifični, akutna toksoplazmoza veoma često ne bude dijagnostikovana ili bude zamenjena sa nekim drugim oboljenjem. Kod inficiranih imunodeficientnih osoba mogu da se jave ozbiljne komplikacije. Kod pacijenata koji su pozitivni na HIV, simptomi mogu da budu slični simptomima imunokompetentnih osoba, samo izraženiji, a mogu da se jave i jake glavobolje, dezorijentisanost i drugi neurološki simptomi poput hemiplegije i sl. Kod

velikog broja AIDS pacijenata koji su još od ranije u hroničnoj (latentnoj) infekciji *T. gondii*, do pojave simptoma najčešće dolazi zbog reaktivacije *T. gondii* (konverzije bradizoita iz tkivnih cista u tahizoite, i posledične multiplikacije i diseminacije tahizoita po organizmu) usled značajnog pada broja CD4+ T limfocita u krvi (Weiss & Dubey, 2009). Neretko, akutna toksoplazmoza kod ovakvih pacijenata, kao i kod drugih imunokompromitovanih osoba, čak i pored primenjene adekvatne terapije može da se završi letalno (Dubey, 2021).

S epidemiološkog stanovišta, za transmisiju *T. gondii* najznačajnije su mačke, jer su jedine u stanju da izlučuju oociste i stoga nije čudno što su baš ove životinje u fokusu veterinarske, ali i humane medicine. Prevalencija ove infekcije kod mačaka dosta varira, a razlikuje se ne samo između država već i između regiona jedne zemlje, između urbanih i ruralnih sredina, pa i između delova jednog istog grada. Smatra se da je prevalencija ipak viša kod divljih i nevladinskih mačaka zbog načina života. Simptomatska infekcija je kod mačaka izuzetno retka, a ukoliko se javi, posledica je inflamacije i nekroze tkiva usled umnožavanja parazita i posledičnog uništavanja ćelija domaćina i imunskog odgovora na infekciju. Najčešće pogođeni organi jesu pluća, mozak, oči i mišići, pa su simptomi koji prate akutnu toksoplazmozu kod mačaka neurološki, odnosno ataksija i epileptiformni napadi, zatim pneumonija sa dispnojom, anoreksija, febrilna stanja, apatija i drugo. U slučaju imunosupresije, npr. jatrogene ili i u situacijama kada je životinja inficirana virusom mačije imunodeficijencije (FIV) ili virusom mačije leukemije (FeLV), akutizacija hronične toksoplazmoze je češća, a moguća su i uginuća (Davidson et al., 1993; Hartmann et al., 2013; Montazeri et al., 2020).

S obzirom na to da mačke (domaće ili divlje) naseljavaju sve kontinente osim Antarktiku, kao stalni domaćini *T. gondii* mogu spoljašnju sredinu kontaminirati oocistama praktično svuda na planeti. Iako su mačke terestrični organizmi, kontaminacija vode oocistama je česta, pogotovu u delovima sveta sa većom količinom padavina. Složena struktura omotača oociste pruža odličnu zaštitu od većine mehaničkih sila u prirodi koje bi dovele do njenog oštećenja; takođe, s obzirom na to da je zatvorena skoro hermetički, oocista je otporna i na dejstvo mnogih hemijskih agenasa poput kiseline, hlora ili soli, što im omogućava i opstanak u ekosistemima visokog saliniteta (Jones & Dubey, 2010). Što se tiče otpornosti oocista na temperaturne oscilacije, eksperimentima je pokazano da oociste mogu da ostanu vijabilne i do 13 meseci na prosečnoj temperaturi od 19,5 °C ukoliko nisu izložene direktnom dejstvu sunčevih zraka (Yilmaz & Hopkins, 1972). Međutim, ukoliko su oociste uskladištene na temperaturi od 4 °C vreme za koje ostaju vijabilne se dosta produžava i iznosi 24 meseca u slanoj vodi, a čak do 55 meseci pri čuvanju u slatkoj vodi. Još jedan dokaz velike otpornosti oocista jeste taj da, nakon što su sporulisale, mogu da opstanu u vlažnom zemljištu do 18 meseci i kod velikih temperaturnih oscilacija, od -20 °C do 35 °C (Dumètre & Dardé, 2003). Otpornost oocista olakšava njihov transport prirodnim putem (voda, životinje) ili antropogeno (hrana), što omogućava širenje *T. gondii* i na velikoj udaljenosti od mesta gde su eliminisane u spoljašnju sredinu (Shapiro et al., 2019).

1.3. Značaj *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii* kao uzročnika hidričnih epidemija

S obzirom na to da većina svetske populacije nema pristup higijenski ispravnoj vodi, nije iznenađujuće što su hidrične epidemije česte a u nekim delovima sveta i uobičajene (Moreira & Bondelind, 2017). Postoji mnogo razloga za nastanak hidričnih epidemija ali među najčešćim jesu neadekvatno odvođenje otpadnih voda, kao i upotreba otpadnih voda i prirodnog đubriva u uzgoju biljnih kultura za ishranu ljudi i životinja. Ovaj drugi razlog je češći u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Iako je učestalost manja u razvijenim zemljama, hidrične epidemije se i dalje javljaju, a neke su i pored boljeg standarda života i dostupnosti savremenih metoda dijagnostike dovele do oboljevanja i ugrozile život velikog broja ljudi (WHO, 2004). Potencijal parazitskih

protozoa *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. za izazivanje hidričnih epidemija prepoznat je i zato su među najviše izučavanim patogenim protozoama u ovom kontekstu. Ali, za *T. gondii*, kao i za mnoge druge protozoe nedostaju podaci o prenošenju vodom u mnogim zemljama u Evropi, što je možda delimično povezano i sa nedostatkom ili neadekvatnim metodama detekcije. Jedan od ključnih razloga za pravovremenu detekciju parazitskih protozoa jeste briga o zdravoj životnoj sredini, prvenstveno o vodi kao značajnom resursu. Ovo je veoma važno s obzirom na to da životna sredina predstavlja vezu između ljudi i životinja, i da ova trijada i briga o zdravlju svakog pojedinačnog činioca predstavlja suštinu koncepta „jednog zdravlja“ (engl. *One Health*). Primena ovog koncepta danas se smatra najefikasnijim načinom borbe protiv bolesti koje izazivaju parazitske protozoe koje se prenose hranom ili vodom. Sve tri ispitivane vrste uzrokuju infekcije ili bolesti koje su dokazano ili potencijalno zoonotske, i njihovi životni oblici mogu da se dugo održe u životnoj sredini i kroz nju prenesu do hrane ili direktno do ljudi ili životinja (Kaplan et al., 2009; Essack et al., 2018; EFSA, 2021).

Tokom druge decenije ovog veka detektovano je 630 hidričnih epidemija, a kao najčešći uzročnici pominju se *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis*. Iza njih slede ostale protozoe poput *Entamoeba histolytica*, *Cyclospora cayetanensis*, i *T. gondii* (Plutzer & Karanis, 2016; Efstratiou et al., 2017a; Ma et al., 2022). Iz izloženog evidentno je da, osim protozoa koje su predmet ovog istraživanja, i neke druge vrste imaju veliku ulogu kao potencijalni uzročnici hidričnih epidemija. Jedna od njih je *E. histolytica* koja ima veoma sličan životni ciklus *Giardia* spp., i ima životne forme trofozoita i ciste. Ameba se nakon ingestije oslobađa iz ciste u gornjim partijama creva da bi zatim vršila invaziju epitela debelog creva i endotela krvnih sudova. Akutna bolest je praćena bolovima u stomaku i sluzavim i krvavim dijarejama. Ukoliko se ne leči, oboljenje može da dobije i hroničan tok sa posledičnim hepatitisom. Na osnovu prijava hidričnih epidemija iz čitavog sveta u prethodno pomenutom periodu, *E. histolytica* se najčešće javljala u nerazvijenim zemljama Afrike, Azije i Južne Amerike, međutim, epidemije su detektovane i u Evropi, u Švedskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu, kao i u Severnoj Americi u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (Balduresson & Karanis, 2011). S obzirom na to da postoje i nepatogene vrste ove amebe koje se morfološki ne razlikuju od patogenih, mikroskopija kao metoda detekcije nije primenljiva, što predstavlja veliki problem u siromašnim zemljama gde je to jedina opcija i gde korišćenje lančane reakcije polimerizacije (PCR) odnosno detekcija PCR metodom koja se pokazala kao najosetljivija, jednostavno nije moguća (Ali, 2013).

Takođe, *C. cayetanensis*, parazitska protozoa iz filuma Apicomplexa (kao i *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii*) značajna je kao uzročnik hidričnih epidemija. Oociste ovog parazita sporulišu i postaju infektivne nakon nekoliko dana provedenih u spoljašnjoj sredini, kao što je i slučaj sa oocistama *T. gondii*. Još jedna sličnost sa oocistama drugih prethodno pomenutih protozoa jeste ta da su veoma otporne u spoljašnjoj sredini. Bolest prate gastrointestinalni problemi, malapsorpcija i posledična malaksalost. U nekoliko studija koje su se bavile detekcijom ovog parazita u otpadnim vodama kao i u vodi za piće, u nekim zemljama broj pozitivnih uzoraka iznosio je i do 60%. Prenos *C. cayetanensis* kontaminiranom vodom na hranu (najčešće biljnog porekla) je čest i može da nastane u svakom koraku prilikom uzgoja ili pripreme hrane. Iako je daleko češća pojava hidričnih epidemija izazvanih *C. cayetanensis* u nerazvijenim zemljama, neretko se javlja i u razvijenim, kada je u zemljama Južne Evrope (Italija, Španija) zabeleženo nekoliko epidemija izazvanih kontaminiranom vodom. Za razliku od *E. histolytica*, kod detekcije *C. cayetanensis* mikroskopija može da bude metoda izbora (Almeria et al., 2019).

Što se tiče konkretnih podataka o patogenim vrstama protozoa koje su predmet ovog istraživanja, mora se istaći da je tokom proteklih decenija u svetu zabeleženo 190 hidričnih epidemija čiji je uzročnik bila *G. intestinalis*. Do infekcije je najčešće dolazilo usled konzumiranja kontaminirane vode za piće ili prilikom plivanja i sličnih aktivnosti na kupalištima i otvorenim vodama namenjenim za rekreaciju. U istom periodu zabeleženo je preko 430 hidričnih epidemija izazvanih

Cryptosporidium spp., gde je izvor infekcije pored već nabrojanih bila i kontaminirana voda u bazenima (Efstratiou et al., 2017a; Ma et al., 2022). Za razliku od hidričnih epidemija uzrokovanih *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp., hidrične epidemije izazvane *T. gondii* su mnogo manje prepoznate, usled nedostatka uniformne metodologije za detekciju kao i nespecifičnih simptoma koji mogu da se jave u akutnoj fazi toksoplazmoze (Madireddy et al., 2021).

Interesantno je da najveći broj svih registrovanih epidemija đardioze ima hidrično poreklo, s obzirom na to da su one ujedno i više izučavane u poređenju sa epidemijama alimentarnog porekla. Prva, a ujedno i do sada najveća registrovana hidrična epidemija đardioze dogodila se pedesetih godina u SAD. U državi Oregon koja je u to vreme imala populaciju od skoro 400.000 ljudi, obolelo je oko 50.000 osoba, praktično 1/8 cele populacije. Epidemija je otkrivena sasvim slučajno i to od strane studenata medicine koji su na vežbama radili koprološke preglede iz sopstvenih uzoraka stolice. Tom prilikom uočen je iznenađujuće visok procenat pozitivnih uzoraka što je kasnije povezano sa velikim brojem osoba sa stomačnim tegobama koje su se u tom periodu javljale lekaru. S obzirom na to da je u tom periodu veliki broj stručnjaka i dalje smatrao da je *G. intestinalis* nepatogena, uzrok za nastanak epidemije tražio se među drugim prouzrokovateljima bolesti kao što su bakterije ili virusi. Kasnije je potvrđeno da je razlog epidemije bila kontaminacija sistema za vodosnabdevanje koja je nastala spiranjem zemljišta kišnicom. Propust u tehnologiji obrade vode za piće bio je taj što se voda nije filtrirala, već samo hlorisala, a poznato je da hlorisanje vode ne utiče značajno na infektivnost cista *G. intestinalis*. Tačan izvor, odnosno lokacija kontaminanta nikada nije utvrđena (Meyer, 1973).

Posebno interesantna hidrična epidemija dogodila se krajem 2004. godine u Norveškom gradu Bergenu, i ovo je ujedno i prva zabeležena epidemija đardioze u toj državi. U Norveškoj se đardioza ne smatra endemskom bolešću jer više od 90% prijavljenih infekcija čine importovani slučajevi, odnosno tako se barem smatralo do izbijanja pomenute epidemije. Od septembra 2004. do februara 2005. godine, obolelo je oko 2.500 osoba a smatra se da je oko 48.000 bilo izloženo. Utvrđeno je da je uzrok za nastanak epidemije bila dotrajala kanalizaciona mreža. Naime, usled velike količine padavina koje su inače normalna pojava tokom tog perioda godine u Bergenu, došlo je do zasićenja kanalizacionih sistema i preliivanja otpadnih voda iz sistema u jezero koje je korišćeno za vodosnabdevanje stanovnika Bergena. Kao i u slučaju prethodne epidemije u SAD, od pre više od 30 godina, takođe su postojali propusti u tehnologiji prerade vode, odnosno voda je samo hlorisana ali ne i filtrirana. U slučaju ove epidemije dokazano je da je nastanak infekcije doznio zavisano pošto su uglavnom oboljevali ljudi koji su konzumirali više od pet čaša vode na dan (Nygård et al., 2006).

U poređenju sa svim ostalim parazitskim protozoama koje se prenose vodom, *Cryptosporidium* spp. ima najveći potencijal da izazove epidemije, a razlog za to jeste verovatno već pomenuta velika otpornost oocista na brojne faktore, ali i mala infektivna doza neophodna za infekciju i nastanak oboljenja. Hidrična epidemija koja je zapravo podigla svest o vodi kao značajnom sredstvu za transmisiju protozoa jeste epidemija kriptosporidioze koja se dogodila u SAD, u državi Milvoki, u proleće 1993. godine. Prvo su zdravstvene službe počele da beleže povećan broj obolelih sa simptomima vodenaste dijareje i povraćanja. Ovi simptomi pripisivali su se stomačnom gripu sve dok broj novih slučajeva nije počeo eksponencijalno da raste. Iako nije prošlo mnogo vremena od javljanja prvih obolelih pa do detektovanja *Cryptosporidium* spp. kao uzročnika ove hidrične epidemije, broj obolelih je u periodu od samo dve nedelje porastao na više od 400.000. Nastanak epidemije povezan je sa dva postrojenja za preradu vode na južnoj obali jezera Mičigen. Iako je voda pravilno hlorisana, postojali su propusti u primarnoj preradi vode odnosno u flokulaciji i filtraciji, što je dovelo do prolaska oocista u sistem za vodosnabdevanje. Postoji nekoliko teorija o tome kako je veća količina oocista dospela u vode jezera Mičigen. Jedna mogućnost je da su obe reke koje se ulivaju u jezero bile kontaminirane oocistama, jer se na njihovim obalama nalazi veliki broj goveda na paši te se smatralo da su ona dovela do kontaminacije vode. Druga je da je, s obzirom na to da je bilo proleće i

da je količina padavina veća od uobičajene, spiranje zemljišta isto tako moglo da doprinese kontaminaciji (Mac Kenzie et al., 1994). Značajno je da je ova epidemija dovela do promene protokola za prečišćavanje i monitoring kvaliteta vode za piće, kao i protokola za monitoring vode koja se koristi za rekreaciju ljudi (Chalmers, 2012).

Druga najveća epidemija kriptosporidioze na svetu i najveća u Evropi dogodila se u Švedskoj 2010. godine, u gradu Estersundu na severozapadu zemlje. Broj ljudi koji se inficirao tom prilikom iznosio je oko 27.000. Poput epidemije u Milvokiju, izvor infekcije i u ovom slučaju bilo je kontaminirano jezero koje se koristilo za vodosnabdevanje. Dodatnim, analizama potvrđeno je prisustvo oocista u vodi, i iako je njihov broj iznosio ≈ 1 oocista / 10 L vode to je očigledno bilo dovoljno da izazove bolest kod većeg broja ljudi. Pošto je poznato da hladnoća pospešuje održavanje vijabilnosti oocista *Cryptosporidium* spp. (Fayer & Nerad, 1996), izbijanju epidemije verovatno je doprinela niska temperatura vode i okoline s obzirom na to da je do epidemije došlo u zimskom periodu i da su neki delovi jezera bili pod ledom. Ova hidrična epidemija kao i ona koja se dogodila deset godina ranije u SAD, samo su neke od mnogih koje su evidentirane, a kod kojih je direktan uzrok bila kontaminacija vode oocistama *Cryptosporidium* spp. (Widerström et al., 2014; Zahedi & Ryan, 2020).

U poređenju sa *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis*, hidrične epidemije kod kojih je uzročnik bila *T. gondii* nisu toliko brojne, ili se usled nedostatka adekvatne metodologije barem ne detektuju toliko često. Takođe, broj obolelih u ovim epidemijama obično je manji od broja obolelih u epidemijama koje su uzrokovane sa prethodna dva parazita. Prva zabeležena hidrična epidemija toksoplazmoze dogodila se u Panami 1979. godine, pri čemu je obolelo oko 600 vojnika SAD koji su u tom trenutku bili na vojnoj vežbi. Zajedničko za sve obolele bilo je to što su kao vodu za piće koristili vodu iz izvora koji se nalazio u neposrednoj blizini kampa (Dubey, 2021). Međutim, hidrična epidemija koja je privukla najviše pažnje dogodila se oko 15 godina kasnije, tj. krajem 1994. i početkom 1995. godine u Britanskoj Kolumbiji u Kanadi. Ova epidemija je bila značajna kako zbog velikog broja obolelih tako i zbog toga što je istakla vodu kao bitan put prenošenja *T. gondii*. Tokom ove epidemije procenjuje se da je obolelo između 2.894 i 7.718 osoba, od kojih je oko 100 pacijenata sa akutnom formom bolesti ispoljilo simptome, najčešće horioretinitisa. Epidemija je slučajno otkrivena kada je primećeno drastično povećanje broja seropozitivnih trudnica koje su dolazile na redovne kontrole. Takođe, izvestan broj ljudi javljao se lekaru zbog simptoma koje inače mogu da prate akutnu infekciju, poput limfadenopatije, glavobolje, mijalgije, horioretinitisa i dr. Kao i kod već pomenutih hidričnih epidemija i ovde je izvor infekcije bio kontaminiran vodozahvat. Vodozahvat iz koga se vodom snabdevalo lokalno stanovništvo napajao se iz dva manja sliva koji su formirali potoke, pri čemu ni vodozahvat ni potoci nisu imali adekvatnu zonu sanitarne zaštite. Prilikom epidemiološkog ispitivanja ustanovljeno je da se jedan broj domaćih mačaka (*Felis catus*) i puma (*Puma concolor*) kretao i lovio u okolini vodozahvata. Mada oociste *T. gondii* nisu otkrivene u vodi, detektovane su u okolnom zemljištu. Nakon izlovljavanja puma radi rutinske kontrole brojnosti populacije, utvrđeno je serološkim metodama da je 11 od 12 jedinki imalo antitela specifična na *T. gondii*. Takođe je tokom analize fecesa ustanovljeno prisustvo oocista. Voda koja je stizala do stanovnika Britanske Kolumbije jeste bila hlorisana ali ne i filtrirana, a s obzirom da je poznato da su oociste *T. gondii* otporne na ovo dezinfekciono sredstvo, izbijanje pomenute epidemije, sa velikim brojem obolelih ljudi, nije iznenađujuće (Bowie et al., 1997).

1.4. Detekcija i monitoring

Giardia intestinalis, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii* već odavno se ne smatraju protozoama koje se prenose isključivo kontaminiranom hranom, a naročito nakon njihovog evidentiranja kao uzročnika pomenutih hidričnih epidemija. Kada je postalo jasno da je prenošenje vodom od velikog

značaja za dalje širenje ovih organizama, nastojalo se da se što efikasnije i preciznije obavi detekcija ovih organizama u vodi i tako prevenira potencijalno zaražavanje ljudi i životinja. Metodologije su se razvijale i unapređivale, pa je mikroskopiranje i biološke ogleda sve više počela da zamenjuje molekularna detekcija. Kako je još tokom 70-ih godina prepoznat potencijal *G. intestinalis* da izazove hidrične a ne samo alimentarne epidemije, rad na unapređenju detekcije ovog organizma započeo je još tada. S druge strane *Cryptosporidium* spp. je prepoznat kao patogen ljudi i životinja tek 80-ih godina tako da je unapređivanje metodologije radi njegove detekcije u vodi počelo nešto kasnije. Prva metodologija koja je razvijena za detekciju ovih parazita u vodi od strane Agencije za zaštitu životne sredine SAD (US EPA) 1978. godine zapravo je modifikovana metoda za detekciju enterovirusa u vodi. Ova metoda se svodila na propuštanje velikih količina vode kroz vunene filtere, nakon čega bi se filteri, po dopremanju u laboratoriju, ispirali, ispirak potom propuštao kroz polikarbonatne filtere, da bi se na kraju tako dobijen uzorak brojao u hemocitometru. Veliki nedostatak ovakve metodologije jeste bilo nekorišćenje pozitivne kontrole tako da je to dovodilo u pitanje preciznost čitave metodologije. Kasnije je filtracija poboljšana, a bojenje (oo)cista parazita prostim i složenim bojenjem preparata zamenjeno je imunofluorescencijom. Iako je ovakva detekcija bila daleko preciznija, imala je svoje nedostatke. Naučna zajednica tog vremena (početak 90-ih) je kao glavne probleme isticala složenost metodologije kao i njenu visoku cenu. Početkom 21. veka US EPA je razvila protokol 1622 za detekciju *Cryptosporidium* spp. u uzorcima vode, a nekoliko godina kasnije i protokol 1623 (US EPA, 2012) za detekciju oba parazita, odnosno *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp. Ovaj protokol je od tada menjan i usavršavan nekoliko puta ali je u isto vreme postajao i sve pristupačniji, a samim tim u sve većoj upotrebi kako u razvijenim zemljama (gde se danas rutinski koristi), tako i u zemljama u razvoju. Neophodna zapremina uzorka je sa prvobitnih 380 L smanjena čak na 10 L vode, što je omogućilo lakše uzorkovanje kao i po potrebi, čuvanje uzoraka. Takođe, uvedena je imuno-magnetna separacija kao veoma efikasna metoda za izdvajanje (oo)cista iz uzorka, a izvođenje IFA testa je unapređeno (Efstratiou et al., 2017b). Ova metodologija je pokazala visoku specifičnost i senzitivnost u detekciji (oo)cista *Giardia* spp. i *Cryptosporidium* spp. pa je stoga i primenjena u istraživanjima u okviru ove disertacije.

Već je navedeno da je broj hidričnih epidemija uzrokovanih *T. gondii* znatno manji u poređenju sa onima izazvanim prethodno navedenim patogenim protozoama, što može biti odraz korišćenja neadekvatne metodologije, a ne realno stanje stvari. Detekcija oocista *T. gondii* u vodi vrši se kombinovanjem nekoliko tehnika poput filtracije, centrifugiranja, biološkog ogleda, dok se u poslednjoj deceniji sve veći značaj pridaje upotrebi molekularnih metoda (Karaniš et al., 2013; Plutzer & Karaniš, 2016). Koja kombinacija tehnika će se koristiti zavisi od samog istraživača jer još uvek ne postoji adekvatan protokol koji bi predstavljao „zlatni standard“ u detekciji ovog parazita u uzorcima vode (Zarlenga et al., 2004). Za potrebe ovog istraživanja odabrano je koncentrisanje uzorka putem filtracije i centrifugiranja, praćeno detekcijom oocista (tj. gDNK *T. gondii*) molekularnim metodama.

U Srbiji se ne vrši detekcija protozoa u vodi, pa prema tome ne postoji ni obaveza monitoringa navedenih protozoa u površinskim vodama, te je prisustvo kontaminacije vodotokova potpuna nepoznanica.

2. Ciljevi istraživanja

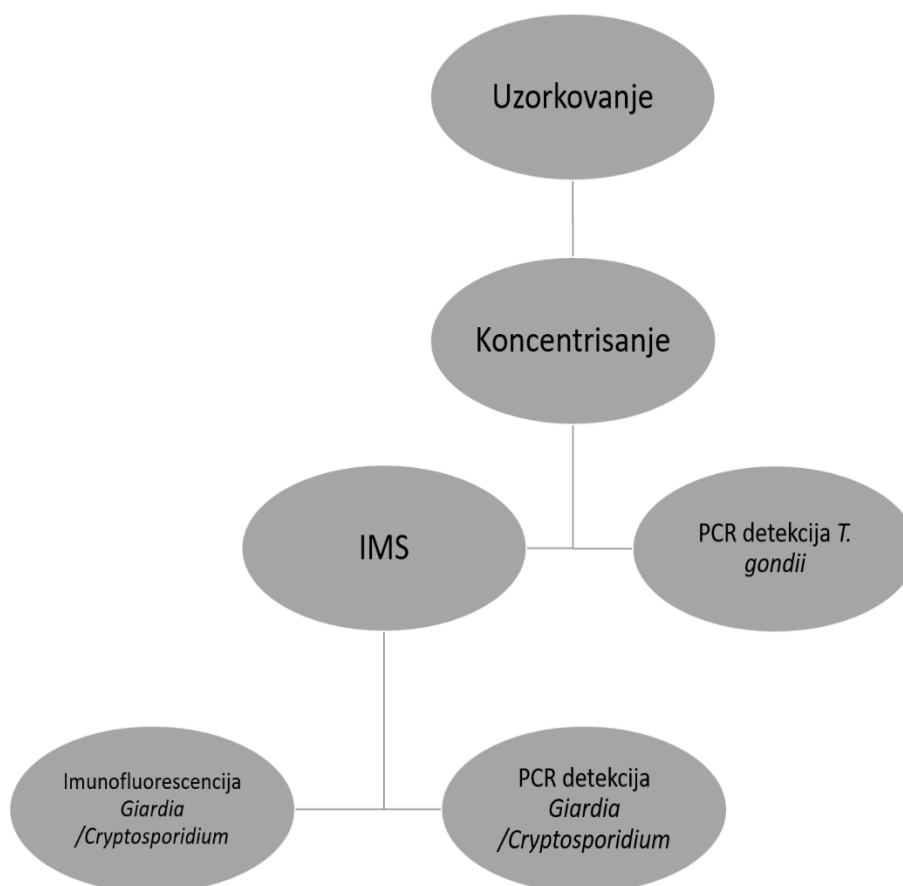
Cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je utvrđivanje prisustva parazitskih protozoa *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii* u površinskim vodama u Srbiji. Ovi paraziti su odabrani jer se njihov uticaj na zdravlje ljudi i životinja značajno uvećao u poslednjih nekoliko decenija. Da bi ovaj cilj bio realizovan morala je biti implementirana i standardna metodologija za detekciju parazita u vodi. Otuda su u okviru istraživanja postavljeni sledeći zadaci:

- uvođenje i standardizacija metodologije za detekciju parazitskih protozoa *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii*;
- utvrđivanje prisustva navedenih protozoa u uzorcima površinskih voda prikupljenim na različitim lokalitetima na teritoriji Srbije;
- analiza njihove geografske distribucije, odnosno prepoznavanje rizičnih mesta u Srbiji sa izraženim stepenom kontaminacije voda; i
- procena genetičkog diverziteta, odnosno utvrđivanje asemblaža ovih parazita.

3. Materijal i metode

3.1. Plan istraživanja i uzorkovanja

Za detekciju prisustva cista i oocista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u vodi korišćena je metodologija US EPA 1623 koja je standardizovana i dostupna kao ISO protokol ISO 15553:2006 (US EPA 1623; ISO 15553:2006). Detekcija oocista *T. gondii* u uzorcima vode vršena je PCR metodom uz prethodno koncentrisanje uzoraka centrifugiranjem. Algoritam navedenih procedura predstavljen je na Slici 3.1.



Slika 3.1. Algoritam korišćen za detekciju prisustva (oo)cista *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii* u vodi

3.1.1. Ispitivano područje i prikupljanje uzoraka

Lokacije na kojima je uzorkovana voda propisane su godišnjim Programom monitoringa statusa voda Agencije za zaštitu životne sredine Srbije (SEPA). Uzorkovanje je vršeno 2018, 2019, 2020. i 2021. godine, i to na svakom odabranom lokalitetu po jedanput tokom perioda uzorkovanja. Početkom svake godine SEPA izrađuje program monitoringa statusa površinskih (reke, irigacioni

kanali, jezera i vodozahvati) i podzemnih voda Srbije, planiran po preporukama Okvirne direktive o vodama Evropske unije (ODB) i na osnovu preporuka i uredbi o kvalitetu voda u Republici Srbiji. Jedan broj uzoraka, koji su prikupljeni u ovom istraživanju nije se našao u programu agencije za zaštitu životne sredine (SEPA, 2019/2020). To su bili uzorci sa odabranih lokacija, poput prirodnih i veštačkih jezera i nekih reka, gde se površinska voda koristi za rekreaciju i bavljenje sportom.

Uzorci vode prikupljeni su u čiste plastične kontejnere zapremine 5 L, a zbirna zapremina svakog uzorka iznosila je 10 L. Uzorkovanje je vršeno tokom cele godine bez obzira na godišnje doba i vremenske prilike. U zavisnosti od reljefa i vrste prilaza vodnom telu (ponton, rečna/jezerska obala) voda je uzorkovana (i) direktnim potapanjem kontejnera u vodu i punjenjem ili (ii) zahvatanjem kofom i presipanjem u plastične kontejnere. Izbegavalo se uzimanje površinskih slojeva vode kao i delova vode bliže dnu, zbog dodatnog opterećenja uzorka biomasom ili talogom koji se sastoji od organskih i neorganskih čestica. Uzorci su dostavljani u laboratoriju istog dana a ukoliko to nije bilo moguće, skladišteni su na temperaturi do 10 °C na suvom i mračnom mestu najviše 5 dana, nakon čega su bili obrađivani.

3.2. Provera efikasnosti koncentrisanja (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. iz vode filtracijom kroz membranski filter

Pre testiranja uzoraka vode urađena je provera efikasnosti koncentracije cista i oocista iz vode. Inaktivisane ciste i oociste *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. koje su dostupne u vidu komercijalnog preparata, EasySeed (Biopoint, Sidnej, Australija), korišćene su kao model za testiranje metodologije prema uputstvu proizvođača. Ukratko, u EasySeed epruvetu, koja sadrži po 100 inaktivisanih (oo)cista svake protozoe u puferu, dodato je 2 mL 0,05% Tween 20 rastvora (Sigma-Aldrich, Taufkirhen, Nemačka) i sadržaj je vorteksovano 20 sekundi. Ceo sadržaj je zatim prebačen u plastični kontejner sa 10 L vode za piće (česemske) iz beogradskog vodovoda koja je služila kao uzorak za testiranje. Epruveta je još dva puta ispirana sa po 3 mL destilovane vode i svaki put je ukupan sadržaj prebačen u uzorak vode koji je zatim promešan nekoliko puta i filtriran prema protokolu opisanom u 3.3. Nakon filtracije, filter je manuelno ispiran (3.3), a zatim je sadržaj procesuiran prema dalje opisanim metodama (3.4, 3.5.). Efikasnost koncentracije se izražavala u procentima, kao odnos broja (oo)cista koje su vizuelno detektovane IFA metodom (3.5.1.) i ukupnog broja oocista koji je dodat u uzorak. Prema US EPA 1623, minimalan procenat efikasnosti koji je neophodan da bi se rezultat smatrao validnim iznosi 30% (US EPA, 2012).

3.3. Koncentrisanje uzorka filtracijom kroz membranski filter

U svakom uzorku vode je, po dopremanju u laboratoriju i pre filtracije, vizuelno procenjen turbiditet koji bi ukazivao na prisustvo nerastvorljivih čestica organskog ili neorganskog porekla. Ukoliko je utvrđeno da je uzorak bogat krupnijim česticama, filtriran je kroz sterilnu gazu u drugi čist kontejner. Na ovaj način uklonjen je višak krupnijih organskih i neorganskih čestica koje bi mogle da ometaju dalju analizu. Svaki uzorak vode je pre filtriranja izmešan okretanjem plastičnog kontejnera nekoliko puta da bi se (oo)ciste podigle sa dna, ukoliko je zbog eventualnog dužeg stajanja uzorka došlo do sedimentacije pod uticajem gravitacije. U ovom istraživanju, koncentrisanje (oo)cista vršeno je filtriranjem vode kroz hidrofилne polikarbonatne filtere prečnika 142 mm i promera pora od 1,2 μm (Millipore, Berlington, Masačusets, SAD) (Slika 3.2). Filteri su prilikom filtriranja bili smešteni unutar držača za filter izrađenog od nerđajućeg čelika (Millipore, Berlington, Masačusets, SAD). Držač za filter je po postavljanju filtera hermetički zatvaran kako bi se sprečilo izlivanje uzoraka. Držač za filter je gumenim crevom bio povezan sa peristaltičkom pumpom (ISI 10, AxFlow, Dablin, Irska) čiji su valjci, praveći vakuum, sprovođili vodu kroz filter, a zatim u kanalizacioni

odvod. Crevo koje je korišćeno za sprovođenje vode menjano je nakon obrade svakog uzorka kako bi se izbegla unakrsna kontaminacija tokom filtriranja narednih uzoraka.



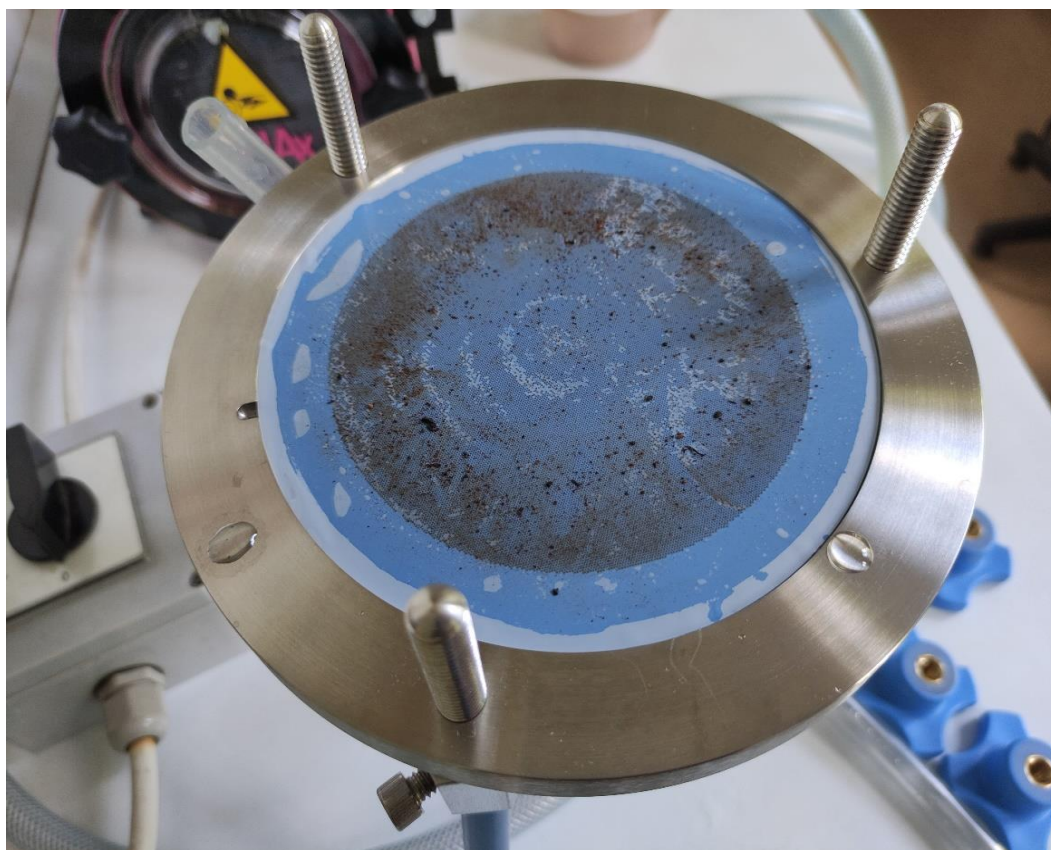
Slika 3.2. Prikaz postavke aparature za filtraciju vode; 1- Uzorak vode, 2- Držač za filter sa filterom plasiranim unutra, 3- Peristaltička pumpa

Filter je tokom procedure ispiran nekoliko puta, naizmenično destilovanom vodom i puferom za ispiranje (US EPA, 2005a) (Tabela 3.1), kada god bi protok vode kroz pumpu bio usporen ili kada bi u potpunosti prestao (Slika 3.3). Prilikom svakog zaustavljanja pumpe i ispiranja filtera, sav filtrat bi se prikupljao u sterilne epruvete od 50 mL za centrifugiranje. Turbiditet uzorka je uslovljavao koliko puta će filter biti ispiran tokom procedure. Filteri korišćeni za uzorke koji su bili veoma zamućeni, i pored prethodnog filtriranja kroz gazu, morali su da budu ispirani i preko pet puta tokom procedure. S druge strane, filteri korišćeni za filtraciju vizuelno čistih uzoraka morali su da se u međuvremenu ispiraju samo par puta ili čak nijednom, odnosno ceo uzorak je uspešno profiltriran kroz filter bez prethodnih međuispiranja. Po okončanju procesa filtracije svakog pojedinačnog uzorka, filter je manuelno ispiran u jednakim količinama destilovane vode i pufera u trajanju od tri minuta, zatim je filtrat prikupljen, a filter bačen.

Centrifugiranje filtrata vršena je u centrifugi (Heraeus Megafuge 1.0R, Kendro, Langensfeld, Nemačka) sa plivajućim rotorom pri brzini od $3.000 \times g$ tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je pažljivo uklonjen pipetom i odbačen. U svaku epruvetu je po odstranjivanju supernatanta dodata mala količina destilovane vode nakon čega je epruveta vorteksovana, a sadržaj prućen u drugu epruvetu istog uzorka. Ispiranje je vršeno dva puta. Nakon što je kompletan uzorak sveden na jednu epruvetu, centrifugiranje je ponovljeno, supernatant odbačen a talog sačuvan za dalje analize.

Tabela 3.1. Spisak i količina reagenasa koji su potrebni kako bi se napravio 1L pufera potrebnog za ispiranje filtera tokom procesa koncentracije

Sastojci	Količina potrebna za 1 L pufera
NaCl	8.0 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O)	2.9 g
KCl	0.2
SDS	1.0 g
Tween 80	1 mL
Antifoam A	0.1 mL



Slika 3.3. Prisustvo velike količine okom vidljivih čestica kao i onih mikroskopski sitnih koji usporavaju/onemogućavaju dalje filtriranje

3.4. Imunomagnetna separacija (IMS) (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp.

S obzirom na to da je ova metodologija prvi put primenjena u Srbiji u ovom istraživanju, neophodna oprema, reagensi i potrošni materijal za IMS biće posebno nabrojani:

- mikrotube
- L10 epruveta
- Anti-Crypto beads
- Anti-Giardia beads
- SL-Buffer A (10x)
- SL-Buffer B (10x)
- SL-Buffer A (1x)
- magnetni držač MPC-1
- predmetna pločica sa bunarom
- magnetni držač DynaMag2
- vorteks mikser
- rotacioni mikser
- pipete (staklene Pasterove, automatske)
- automatska Pro-pipeta
- HCl (0,1 M)
- NaOH (0,1 M)

Imunomagnetna separacija vršena je Dynabeads GC-Combo kitom (IDEXX, Vestbruk, Mejn, SAD). Ukratko, talog nastao nakon centrifugiranja, vorteksovano je i prebačeno u Dynal L10 epruvetu (IDEXX, Vestbruk, Mejn, SAD). Epruveta za centrifugiranje od 50 mL u kojoj se nalazio uzorak, isprana je još dva puta destilovanom vodom tako da kompletan sadržaj bude prebačen u Dynal L10 epruvetu. Vodilo se računa da ukupna zapremina tečnosti u L10 epruveti ne pređe 10 mL. U epruvetu je zatim dodato po 1 ml SL-Buffer A (10x) i SL-Buffer B (10x) kao i po 100 µL prethodno dobro izvorteksovanih magnetnih kuglica obloženih antitelima specifičnim za ciste i oociste *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. (nalaze se u kitu). Epruveta je dobro zatvorena i postavljena u rotacioni mikser Dynabeads MX (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), sat vremena na sobnoj temperaturi i pri brzini od 15-20 obrtaja u minutu. Nakon inkubacije, epruveta je prebačena u magnetni držač MPC-1 (IMS; IDEXX, Vestbruk, Mejn, SAD) tako da ravna strana L10 epruvete naleže direktno na magnet. Sadržaj epruvete je zatim nežno mešan pokretima ruke u trajanju od dva minuta tako da početni i završni položaj epruvete postavljene u magnetni držač bude pod uglom od 90° u odnosu na horizontalnu ravan. Bez vađenja epruvete iz magnetnog držača, sadržaj je odliven u sterilnu epruvetu za centrifugiranje od 50 mL i skladišten na -20 °C jer se iz tog uzorka kasnije radila ekstrakcija i detekcija *T. gondii*. L10 epruveta je potom izvađena iz magnetnog držača i u nju je dodato 0,4 ml 1x SL-Buffer A i sadržaj je izmešan lagano pokretima ruke. Sadržaj je zatim prebačen Pasterovom pipetom u mikrotubu i ovaj postupak ispiranja i prebacivanja ponovljen je još dva puta. Nakon što je kompletan sadržaj prebačen iz L10 epruvete, mikrotuba je postavljena u magnetni držač DynaMag2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i lagano mešana rukom tokom jednog minuta. Prilikom mešanja sadržaja, početni i završni položaj mikrotube postavljene u magnetni držač bio je pod uglom od 180° na horizontalnu ravan. Nakon toga, sav sadržaj je aspiriran Pasterovom pipetom i prebačen u epruvetu gde se već nalazi odvojen deo uzorka za detekciju *T. gondii*, pri čemu mikrotuba nije vađena iz magnetnog držača.

Nakon što je mikrotuba sa uzorkom izvađena iz magnetnog držača, u nju je dodato 50 µL 0,1 M HCl rastvora (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), zatim je mikrotuba vorteksovana na najvećoj brzini 30 sekundi a potom ostavljena na sobnoj temperaturi u vertikalnom položaju 10 minuta. Po isteku inkubacije, vorteksovanje je ponovljeno pri istoj brzini i trajanju a tuba je stavljena u magnetni držač DynaMag2 (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), pri čemu se vodilo računa da se kompletan

sadržaj tube nalazi na njenom dnu. Tuba je zatim ostavljena u magnetnom držaču na sobnoj temperaturi u trajanju od dva minuta. Bez uklanjanja mikrotube iz magnetnog držača ovako prečišćen uzorak, čija je količina u proseku iznosila oko 60 μL , podeljen je na dva dela, od kojih je jedan korišćen kao uzorak za IFA ispitivanje dok je ostatak ekstrahovan i korišćen u PCR detekciji. Preciznije, 30 μL uzorka prebačeno je na predmetnu pločicu sa bunarom na koju je prethodno stavljeno 5 μL 0.1M NaOH rastvora (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD) kako bi se neutralisala kiselina ranije dodata u uzorak. Predmetna pločica je ostavljena da se suši na sobnoj temperaturi 24h. Preostali deo uzorka prebačen je u novu mikrotubu i skladišten je na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka kada je rađena ekstrakcija gDNK radi PCR detekcije cista i oocista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. Kako je usled podele uzorka postojala mogućnost (iako veoma mala) da se sve (oo)ciste nađu u delu namenjenom ekstrakciji, što bi dovelo do toga da deo uzorka za IFA detekciju bude proglašen lažno negativnim, primena PCR analize bila je obavezna za svaki uzorak, bez obzira da li su u njemu IFA metodom uočene (oo)ciste ili ne.

3.5. Detekcija (oo)cista i/ili gDNK protozoa

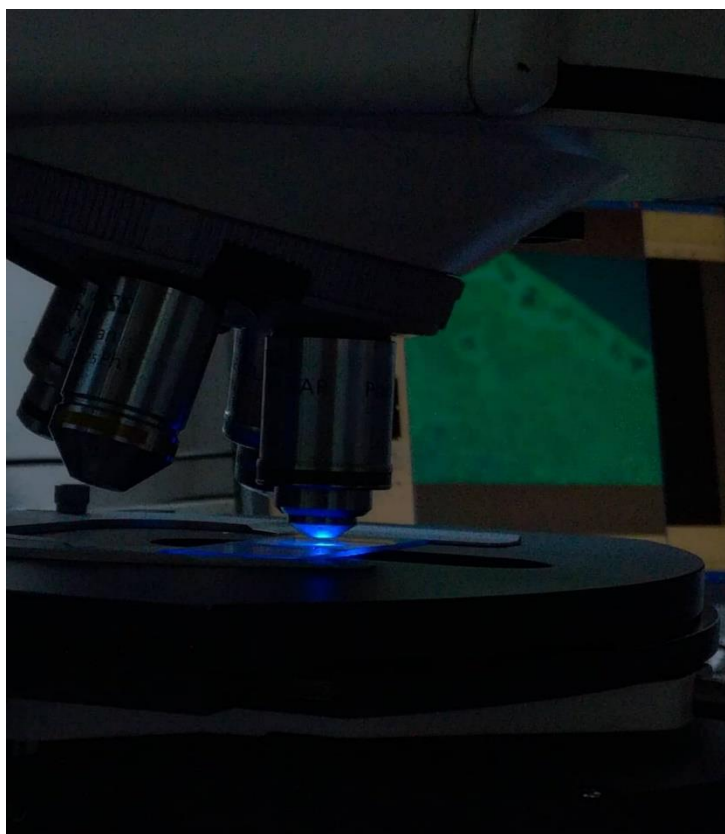
3.5.1. Detekcija (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. imunofluorescijom

Kao i za IMS, sva oprema, reagensi i potrošni materijal neophodni za imunofluorescenciju biće posebno nabrojani:

- RR2 Crypto/Giardia Cel reagens (Cellabs, Sidnej, Australija)
- RMG mounting medium
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD)
- metanol
- papirni ubrus
- pipete
- vlažna komora
- pokrovne ljušpice
- fluorescentni mikroskop (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Nemačka)
- inkubator (Heratherm, ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD)

Određivanje prisustva (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u uzorku odnosno na predmetnoj pločici vršeno je pomoću Crypto/Giardia Cel kita za imunofluorescenciju (Cellabs, Sidnej, Australija).

Uzorak je posle sušenja fiksiran sa 50 μL koncentrovanog metanola (Bio-strategy, Okland, Australija), a nakon što je metanol ispario, na uzorak je nakapano 25 μL RR2 reagensa. Uzorak je pažljivo postavljen u vlažnu komoru i inkubiran na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 minuta koliko je potrebno da dođe do vezivanja antitela. Nakon inkubiranja, predmetna pločica, a pogotovu bunar u kome se nalazio uzorak, lagano je isprana nekoliko puta rastvorom Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), a višak tečnosti je uklonjen papirnim ubrusom. Tokom upijanja viška tečnosti ubrusom vodilo se računa da se ne dodirne centralni deo predmetne pločice sa bunarom kako se ne bi oštetio uzorak. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, na preparat je stavljeno 25 μL medijuma RMG nakon čega je preparat prekriven pokrovnom ljušpicom. Uzorak je pregledan na Axioskop 2 mikroskopu (Zeiss, Oberkirhen, Nemačka) pod uveličanjem od $400\times$ sa emisionim filterom specifičnim za FITC/GFP (520 nm) (Slika 3.4).



Slika 3.4. Posmatranje preparata pod uveličanjem od $400\times$ sa emisionim filterom specifičnim za FITC [Fotografija, autor O. Lijeskić, 2020.].

3.5.2. Detekcija gDNK *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. i tipizacija asemblaža *G. intestinalis*

3.5.2.1. Ekstrakcija gDNK

Ekstrakcija gDNK iz cista i oocista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. vršena je iz dela uzorka (zapremine između 30 i 50 μL) koji je ostao nakon IMS procedure. Ekstrakcija gDNK oocista *T. gondii* vršena je iz 250 μL filtrata odnosno taloga koji je preostao nakon procedure IMS. Za ekstrakciju je korišćen DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Nemačka), zasnovan na principu izdvajanja DNK/RNK na silika-gel membrani. Uzorci su ekstrahovani prema uputstvu proizvođača, s tim što je zbog robustne prirode (oo)cista, umesto običnog vorteks aparata korišćen aparat za mehaničku homogenizaciju BeadRuptor4 (Omni international, Kenesi, Džordžija, SAD). Uzorci postavljeni u aparat vorteksovani su pri maksimalnoj brzini tri puta u trajanju od po pet minuta, pri čemu se vodilo računa da ne dođe do pregrevanja tubica sa uzorkom usled trenja. Nakon ovog koraka, ekstrakcija uzorka nastavljena je dalje po protokolu (liza, precipitacija, višekratno ispiranje na kolonici, elucija). Finalna količina eluata iznosila je 100 μL .

3.5.2.2. Koncentrisanje gDNK precipitacijom natrijum acetatom i etanolom

Koncentrisanje gDNK vršeno je po protokolu natrijum acetatom (finalna koncentracija 0,3 M) i etanolom uz dodatak reagensa Pellet Paint® NF Co-Precipitant, da bi se izbegao gubitak DNK peleta

(Millipore, Berlington, Masačusets, SAD). Ukratko, u ekstrahovanu DNK (50 μ L) dodato je po 1 μ L reagensa Pellet Paint® NF Co-Precipitant. Zatim je dodat 96% etanol u odnosu 1:1, nakon čega je uzorak pažljivo izmešan i ostavljen da se inkubira na sobnoj temperaturi jedan minut. Po isteku vremena inkubacije, uzorak je centrifugiran na najvećoj brzini cenrifuge (16.000 \times g) u trajanju od 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, u epruvetu sa peletom, koji je reagensom bio obojen u tamno plavo, dodato je 500 μ L 70% etanola. Zatim je uzorak ponovo izmešan i centrifugiran na najvećoj brzini u trajanju od tri minuta. Supernatant je ponovo pažljivo uklonjen i nakon što se pelet potpuno osušio na sobnoj temperaturi na vazduhu (2-5 min), rastvoren je u 5 μ L vode bez DNaza/RNaza.

3.5.2.3. Detekcija gDNK *G. intestinalis* PCR amplifikacijom iz dva koraka

Amplifikacija β -*giardin* gena za detekciju gDNK *G. intestinalis* rađena je u dva koraka. U prvom koraku fragment je umnožavan pomoću eksternih prajmera G7 i G759. Zapremina smeše u primarnoj PCR reakciji iznosila je 20 μ L a sastojala se od PCR Master Mix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 10 pmol prajmera, vode bez DNaza/RNza kao i 2 μ L gDNK. U drugom koraku korišćeni su interni prajmeri kao i 2 μ L produkta (amplikona) prve PCR reakcije kao matrica za drugu. PCR reakcije su rađene u Veriti™ 96-Well Thermal Cycler aparatu (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) a termalni profil koji je korišćen kao i sekvence prajmera nalaze se u Tabeli 3.2. Vizuelizacija produkata u 1,5% agaroznom gelu nakon elektroforeze vršena je u BioDocAnalyze aparatu (Biometra, Getingen, Nemačka). U svakoj PCR reakciji kao negativna kontrola korišćena je ultra čista voda bez DNaza/RNaza, a kao pozitivna kontrola gDNK *G. intestinalis*. Pojedini uzorci testirani su nakon dodavanja DNK prečišćenog Herpes virusa foka (PhHV-1) kao egzogene kontrole, radi provere uspešnosti amplifikacije, odnosno kao dokaz da u uzorcima nije bilo inhibišućih supstanci.

Tabela 3.2. Eksterni i interni prajmeri i termalni profili korišćeni za amplifikaciju β -*giardin* gena

SEKVENCA		PRAJMERI	TERMALNI PROFIL	BROJ CIKLUSA	REFERENCA
β -GIARDIN	1. Korak	EKSTERNI G7 5'-AAGCCCGACG ACCTCACCCGAGTGC-3' G759 5'- GAGGCCGCCCTGGATCTTCG AGACGAC-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 65 °C-45 sec 72 °C-60 sec 72 °C-7 min	35	Cacciò et al., 2002.
	2. Korak	INTERNI 5'-GAACGA ACGAGATCGAGGTCCG-3' 5'-CTCGACGAGCTTCGTGTT-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 55 °C-45 sec 72 °C-60 sec 72 °C-7 min	35	Lalle et al., 2005.

3.5.2.4. PCR-RFLP tipizacija asemblaža *G. intestinalis*

Za sve uzorke u kojima je amplifikacija β -*giardin* gena bila uspešna, vršena je determinacija asemblaža RFLP metodom. Reakciona smeša sastojala se od 5-15 μ L produkta drugog koraka PCR reakcije, 1 μ L enzima endonukleaze BsuRI (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 1 μ L 1X FastDigest Green Buffer (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), a do zapremine od 20 μ L dodata je ultra čista voda bez DNaza/RNaza. Reakciona smeša inkubirana je u termo-mikseru (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Beč, Austrija) na temperaturi od 37 °C u trajanju od 15 minuta. Kao pozitivna kontrola u reakciji korišćena je gDNK *G. intestinalis*, i to asemblaža A, B i E.

3.5.2.5 Detekcija gDNK *Cryptosporidium* spp. PCR amplifikacijom iz jednog ili dva koraka

Za detekciju *Cryptosporidium* spp. gDNK urađena je amplifikacija četiri različita gena: SSU rRNK, TRAP-C2, HSP70 i COWP prema publikovanim protokolima (Xiao et al., 1999; Elwin et al., 2001; Morgan et al., 2001; Spano et al., 1997). Sem za COWP gen, sve metode amplifikacije sastojale su se iz dva koraka. Za amplifikaciju SSU rRNK gena reakciona smeša prvog PCR koraka sastojala se od PCR Master Mix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 100 nM eksternih prajmera, 3 μ L gDNK i vode bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 μ L (Xiao et al., 1999). Termalni profil i sastav smeše za drugi PCR korak bili su slični kao i kod prvog osim što je korišćeno 2 μ L produkta prvog koraka kao matrica za drugi. Kao i u slučaju detekcije gDNK *G. intestinalis*, u pojedine uzorke dodavana je DNK prečišćenog Herpes virusa foka radi testiranja na prisustvo inhibitora amplifikacije.

Prvi korak reakcione smeše za amplifikaciju TRAP-C2 gena sastojao se od PCR Master Mix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 10 pmol seta eksternih prajmera, 3 μ L gDNK i vode bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 μ L (Elwin et al., 2001). Drugi korak PCR reakcije sastojao se od PCR Master Mix(1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 10 pmol seta internih prajmera, 3 μ L produkta prvog koraka kao i vode bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 μ L.

Prvi i drugi korak PCR reakcije za amplifikaciju HSP70 gena sastojali su se od PCR Master Mix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), eksternih (u prvom) i internih (u drugom koraku) prajmera koncentracije 12,5 pmol, 3 μ L gDNK u prvom odnosno 3 μ L produkta prve PCR reakcije u drugom koraku, kao i vode bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 μ L (Morgan et al., 2001).

Poslednji gen koji je korišćen za detekciju *Cryptosporidium* spp. u ovom istraživanju jeste COWP gen. Reakciona smeša za detekciju COWP gena sastojala se od PCR Master Mix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 30 pmol cry-15 i cry-9 prajmera, 3 μ L gDNK i ultra čiste vode bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 μ L. Za razliku od prethodna tri PCR protokola, ovaj je drukčiji jer postoji samo jedan korak PCR reakcije (Spano et al., 1997). Termalni profili kao i spisak prajmera korišćenih za svaki gen u detekciji *Cryptosporidium* spp. nalaze se u Tabeli 3.3.

Produkti PCR reakcija razdvajani su elektroforezom u agaroznom gelu u koji je dodat etidijum-bromid u koncentraciji od 4%. Koncentracija gela je iznosila 1,5% ili 2% u zavisnosti od očekivane veličine fragmenata nastalih u PCR reakciji. Nakon elektroforeze produkti su vizualizovani u BioDocAnalyze aparatu (Biometra, Getingen, Nemačka).

Tabela 3.3. Prajmeri i termalni profili korišćeni u detekciji *Cryptosporidium* spp.

SEKVENCA		PRAJMERI	TERMALNI PROFIL	BROJ CIKLUSA	REFERENCA
SSU rRNK	1. Korak	EKSTERNI 5'- TTCTAGAGCTAATAATGC G-3'	95 °C-3 min 95 °C-45 sec 55 °C-60 sec 72 °C-45 sec	35	Xiao et al., 1999.
		5'- CCCTAATCCTTCGAAACA GGA-3'	72 °C-5 min		
	2. Korak	INTERNI 5'- GGAAGGGTTGTATTTATT AGATAAAG-3'	95 °C-3 min 95 °C-45 sec 55 °C-60 sec 72 °C-45 sec	35	
		5'- AAGGAGTAAGGAACAAC CTCCA-3'	72 °C-5 min		
TRAP-C2	1. Korak	EKSTERNI 5'- CATATTCCTGTCCCTTG AGTTGT-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 60 °C-30 sec 72 °C-45 sec	38	Elwin et al, 2001.
		5'- TGGACAACCCAAATGCAG AC-3'	72 °C-5 min		
	2. Korak	INTERNI 5'-GGTAATTGGTCACGA-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 44 °C-30 sec 72 °C-45 sec	38	Elwin et al, 2001.
		5'-CCAA GTTCAGGCTTA-3'	72 °C-5 min		
HSP70	1. Korak	EKSTERNI HSPF4 5'- GGTGGTGGTACTTTTGAT GTATC-3'	95 °C-3 min 95 °C-30sec 56 °C-30sec 72 °C-30sec	40	Morgan et al., 2001.
		HSPR4 5'-GCCTGAACCTTTGGA ATACG-3'	72 °C-5min		

	2. Korak	INTERNI HSPF3 5'- GCTGSTGATACTCACTTG GGTGG-3' HSPR3 5'- CTCTTGTCATACCAGCA TCC-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 56 °C-30 sec 72 °C-30 sec 72 °C-5 min	40	
COWP	1. Korak	cry-15 5'- GTAGATAATGGAAGAGAT TGTG-3' cry-9 5'- GGACTGAAATACAGGCAT TATCTTG-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec 55 °C-35 sec 72 °C-50 sec 72 °C-5 min	40	Spano et al., 1997.

3.5.3. Detekcija gDNK *T. gondii* PCR amplifikacijom iz jednog (529 bp) i dva koraka (SAG2, GRA6)

PCR reakcija za detekciju gDNK *T. gondii* sastojala se od PCR MasterMix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 0,25 mM HO1 i HO2 prajmera specifičnih za 529 bp repetitivni element (AF146527), 3 µl gDNK, i ultra čiste vode bez DNaza/RNaza do ukupne zapremine reakcije od 20 µL (Homan et al., 2000; Vujanić et al., 2011). Radi potvrde prisustva *T. gondii* gDNK, rađena je takođe i detekcija SAG2 i GRA6 gena (Su et al., 2010). Ukratko, reakciona smeša za prvi korak i za SAG2 i za GRA6 sastojala se od PCR MasterMix (1X) (ThermoFisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD), 0,15 µM eksternih prajmera i 2 µL gDNK. Drugi korak PCR reakcije za detekciju oba gena sastojao se od 0,3 µM internih prajmera i 2-4 µL produkta prvog koraka. U svaku reakciju je dodata ultra čista voda bez DNaza/RNaza do zapremine od 20 µL (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Prajmeri i termalni profili korišćeni u detekciji *T. gondii*

SEKVENCA		PRAJMERI	TERMALNI PROFIL	BROJ CIKLUSA	REFERENCE
529 bp REPETITIVNI FRAGMENT	1. Korak	HO1 3'-AGAGACACCGGAATG CGA TCT-5' HO2 3'-CCCTCT TCTCCACTCTTCAATTCT-5'	95 °C-5 min 95 °C-15 sec 56 °C-30 sec 72 °C-45 sec	45	Vujanić et al., 2011. Lélu et al., 2012.

SAG2	1. Korak	EKSTERNI 5'-GGAACGCGAACAATGAGTTT-3' 5'-GCACTGTTGTCCAGGGTTT-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec	30	Su et al., 2010.
GRA6		EKSTERNI 5'-ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT-3' 5'-GCACCTTCGCTTGTGGTT-3'	55 °C-60 sec 72 °C-60 sec 72 °C-5 min		
SAG2	2. Korak	INTERNI 5'-GAAATGTTTCAGGTTGCTGC-3' 5'-GCAAGAGCGAACTTGAACAC-3'	95 °C-3 min 95 °C-30 sec	35	Su et al., 2010.
GRA6		INTERNI 5'-TTTCCGAGCAGGTGACCT-3' 5'-TCGCCGAAGAGTTGACATAG-3'	60 °C-60 sec 72 °C-60 sec 72 °C-5 min		

3.6. Priprema baze za grafički prikaz rezultata pomoću geografskog informacionog sistema (GIS)

Lokacije na kojima su prikupljeni uzorci georeferencirane su u WGS84 koordinatnom sistemu (georeferentni podaci dati u **Prilozima**), korišćenjem softvera OziExplorer (Des Newman's OziExplorer GPS Mapping Software, Brizbejn, Australija). Za potrebe mapiranja i drugih analiza, formirana je namenska baza podataka (Tabela 3.5) koja je obuhvatila pripadnost lokacije vodnom telu, najbliži grad, pripadnost administrativnom okrugu R. Srbije, detaljniji opis lokacija i datum uzorkovanja. Prikaz rezultata – različite varijante tematskog mapiranja podataka – obavljen je pomoću softvera qGIS verzija 3.16 Hannover (Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 licence (CC BY-SA)).

Tabela 3.5. Lokaliteti uzorkovanja (n = 48) vodnih tela, administrativno-teritorijalni podaci, datum i detaljan opis lokacije

Redni broj	Grad/mesto	Naziv vodnog tela	Okrug	Datum uzorkovanja	Mesto uzorkovanja	
					Geografske koordinate	Opis lokacije
1	Šabac	Sava	Mačvanski	09.12.2018.	44.770920, 19.698898	"Stari grad" Šabac, kod tvrđave
2	Šabac	Sava	Mačvanski	09.12.2018.	44.752518, 19.716768	nekoliko metara nizvodno od ispusne cevi kanalizacionog kolektora
3	Ostružnica	Sava	Grad Beograd	12.12.2018.	44.731655, 20.311835	1 km uzvodno od železničkog mosta
4	Zemun	Dunav	Grad Beograd	12.12.2018.	44.848846, 20.411830	Gardoš, Zemunski kej

5	Vinča	Dunav	Južnobanatski	12.12.2018.	44.768414, 20.620448	arheološko nalazište Vinča-Belo brdo
6	Smederevo	Dunav	Podunavski	12.12.2018.	44.693658, 20.959222	0,5 km uzvodno od mosta za Kovin
7	Ribare	Lugomir	Pomoravski	19.12.2018.	44.007699, 21.296089	kod ušća u Južnu Moravu
8	Lapovo	Lepenica	Šumadijski	24.12.2018.	44.148020, 21.053718	1 km od ušća u Južnu Moravu
9	Ljubičevski most	Velika Morava	Braničevski	24.12.2018.	44.586730, 21.132873	okolina Ljubičevskog mosta
10	Kusiće	Pek	Braničevski	24.12.2018.	44.716730, 21.536147	na izlasku iz mesta Kusiće
11	Bratinac	Mlava	Braničevski	24.12.2018.	44.645713, 21.220110	oko 15 km uzvodno od ušća u Dunav
12	Bagrdan	Velika Morava	Pomoravski	24.12.2018.	44.068452, 21.197887	Bagrdanska klisura
13	Badovinci	Drina	Mačvanski	25.12.2018.	44.784687, 19.350366	nizvodno od Pavlovića mosta
14	Bajina Bašta	Drina	Zlatiborski	25.12.2018.	43.975092, 19.541425	uzvodno od akumulacije Zvornik
15	Batrovci	Bosut	Sremski	25.12.2018.	45.052255, 19.169406	u blizini graničnog prelaza
16	Lešnica	Jadar	Mačvanski	14.02.2019.	44.633342, 19.273094	kod mosta na putu Kozjak-Jadranska Lešnica
17	Lešnica	Lešnica	Mačvanski	14.02.2019.	44.593385, 19.298004	kod veznog kanala Jadar-Lešnica
18	Jarak	Kudoš	Sremski	14.02.2019	44.914416, 19.743549	nekoliko metara pre ušća u Savu
19	Jamena	Sava	Sremski	14.02.2019.	44.878088, 19.084065	oko 5 km nizvodno od granice sa Hrvatskom
20	Markovac	Rača	Pomoravski	11.02.2019.	44.229567, 21.146498	kod ušća u Veliku Moravu-aluvion
21	Lanište	Belica	Pomoravski	11.02.2019.	44.237895, 21.176878	na putu Slanište
22	Kalište	Vitovnica	Braničevski	20.02.2019.	44.417803, 21.364797	neposredno pre ušća u Mlavu
23	Ušće	Studenica	Raški	20.02.2019.	43.457960, 20.596822	kod ušća u Ibar

24	Brgule	Tamna	Grad Beograd	18.02.2019.	44.538151, 20.209328	kod ušća u Kolubaru
25	Petrovac na Mlavi	Mlava	Braničevski	20.02.2019.	44.391790, 21.402819	kod ušća reke Busur u Mlavu
26	Kragujevac	Uglješnica	Šumadijski	23.03.2019.	44.032513, 20.943257	nizvodno od ušća Limovca
27	Višnjicevo	Šidina	Sremski	23.03.2019.	44.981024, 19.283683	okolina ušća u Bosut
28	Mrđenovac	Dobrava	Mačvanski	23.03.2019.	44.709786, 19.799873	u blizini regionalnog puta Šabac-Obrenovac
29	Tekija	Dunav	Borski	24.04.2019.	44.700123, 22.418538	1,5 km nizvodno od Tekije
30	Mislođin	Kolubara	Grad Beograd	22.04.2019.	44.652027, 20.216726	na izlazu iz Obrenovca
31	Mosna	Porečka	Borski	22.04.2019.	44.423018, 22.173043	vodozahvat; iz čamca, nekoliko metara od obale
32	Užice	Vrutci	Zlatiborski	24.09.2019.	43.843835, 19.706695	vodozahvat; sa obale jezera
33	Kruševac	Ćelije	Rasinski	26.09.2019.	43.415932, 21.183962	vodozahvat; iz čamca, nekoliko metara od obale
34	Novi Bečej	Tisa	Srednjobanatski	24.10.2019.	45.594014, 20.107228	nekoliko metara uzvodno od brane
35	Bezdan	Dunav	Zapadnobački	17.12.2019.	45.854052, 18.859036	na ušću kanala DTD
36	Bački Breg	Plazović	Zapadnobački	17.12.2019.	45.919732, 18.986591	oko 1 km od granice sa Mađarskom
37	Titel	Tisa	Južnobački	17.12.2019.	45.206210, 20.315213	oko 300 m nizvodno od ušća Begeja
38	Novi Sad	Dunav	Južnobački	17.12.2019.	45.266293, 19.872312	preko puta Ribarskog ostrva, desna strana reke
39	Vrbica	Zlatica	Severnobanatski	17.12.2019.	45.999523, 20.347688	oko 100 m od granice sa Rumunijom
40	Bačko Gradište	Kanal Dunav-Tisa-Dunav (DTD)	Južnobački	17.12.2019.	45.535999, 20.021837	kod ribnjaka „Bečej“

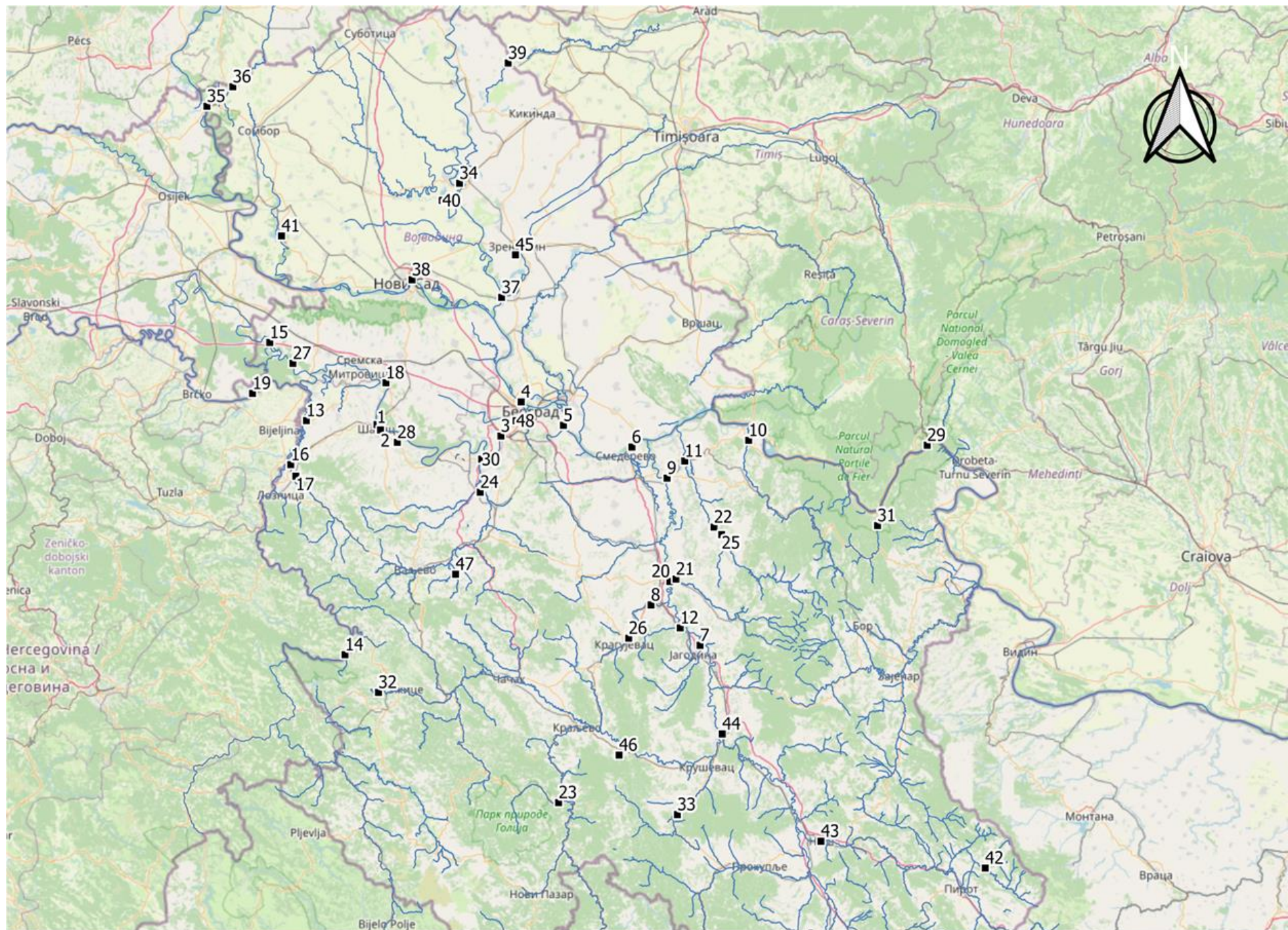
41	Bač	DTD	Južnobački	17.12.2019.	45.415278, 19.227500	u blizini mosta „Vojvođanskih brigada“
42	Park prirode "Stara planina"	Zavojsko jezero	Pirotski	12.09.2020.	43.227578, 22.705207	sa obale, zapadna strana jezera, u blizini brane
43	Niš	Nišava	Nišavski	12.09.2020.	43.322022, 21.893254	preko puta Stambol kapije
44	Stalac	Južna Morava	Rasinski	13.09.2020.	43.698540, 21.405655	neposredno pre ušća u Zapadnu Moravu
45	Zrenjanin	Peskara	Srednjobanatski	10.04.2021.	45.351078, 20.383610	gradsko kupalište „Peskara“
46	Vrnjačka banja	Vrnjačka reka	Raški	14.05.2021.	43.624541, 20.895836	desna obala reke, oko 100 m zapadno od regionalnog puta broj 208
47	Mionica	Ribnička reka	Kolubarski	17.06.2021.	44.254591, 20.087812	oko 100 m severno od regionalnog puta broj 150
48	Beograd	Savsko jezero	Grad Beograd	01.07.2021.	44.784371, 20.386957	ostrvo Ada Ciganlija, novobeogradska obala jezera

Većina uzoraka prikupljena je sa lokacija koje se nalaze u programu monitoringa vodnih tela koji svake godine sprovodi SEPA, i taj broj u proseku iznosi oko 69 profila godišnje. Uzorci su sakupljeni iz svih većih vodotokova, kao i vodnih tela blizu graničnih prelaza, iz većine okruga (19/25), izuzev Severnobačkog, Moravičkog, Zaječarskog, Topličkog, Jablaničkog i Pčinjskog (Slika 3.5). Uzorkovanje na prostoru Kosova i Metohije nije rađeno.

Uzorkovanje nije vršeno sa profila koji lokacijski nisu bili od značaja za istraživanje. Takođe, voda se nije sakupljala sa mesta koja su primetno prljava ili mesta gde postoji vidljivo ulivanje otpadnih voda u vodotokove, da bi se očuvala objektivnost studije. Pored uzoraka predviđenih programom Agencije, dodatno su analizirani i uzorci prikupljeni sa popularnih kupališta, kao i iz reka koje prolaze pored obradivog zemljišta i koje su izvor vode za navodnjavanje. Ova vodna tela potencijalno mogu da budu izvor infekcije za ljude i životinje ukoliko su kontaminirana protozoama.

3.7. Statistička analiza

Povezanost hidromorfoloških, fizičkih, hemijskih i bioloških parametara, kao parametara za određivanje kategorije kvaliteta vodnog tela, kao i godišnjeg doba uzorkovanja, sa nalazom protozoa u uzorcima vode ispitivana je χ^2 testom, a rezultati analize predstavljeni su vrednostima statističke značajnosti za svaki ispitivani faktor pojedinačno. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 5% ($P < 0,05$).



Slika 3.5. Mapa Republike Srbije sa naznačenim lokacijama uzorkovanja. Svaka tačka obeležena brojem predstavlja jedan uzorak odnosno tačnu lokaciju na kojoj je izvršeno uzorkovanje.

4. Rezultati

4.1. Tok uzorkovanja

Period u toku godine u kojem je uzorkovanje vršeno razlikovao se tokom trajanja istraživanja, a najveći broj uzoraka prikupljen je u zimskim i prolećnim mesecima. Najveći broj uzoraka prikupljen je tokom 2019. godine, njih 25, 2018. godine prikupljeno je 15 uzoraka, dok su u 2020. i 2021. godini prikupljena po svega četiri uzorka. Razlika u količini prikupljenih uzoraka u prve dve godine od početka istraživanja u poređenju sa druge dve povezana je sa početkom i trajanjem pandemije COVID19.

4.1.1. Prikaz ispitivanih lokacija

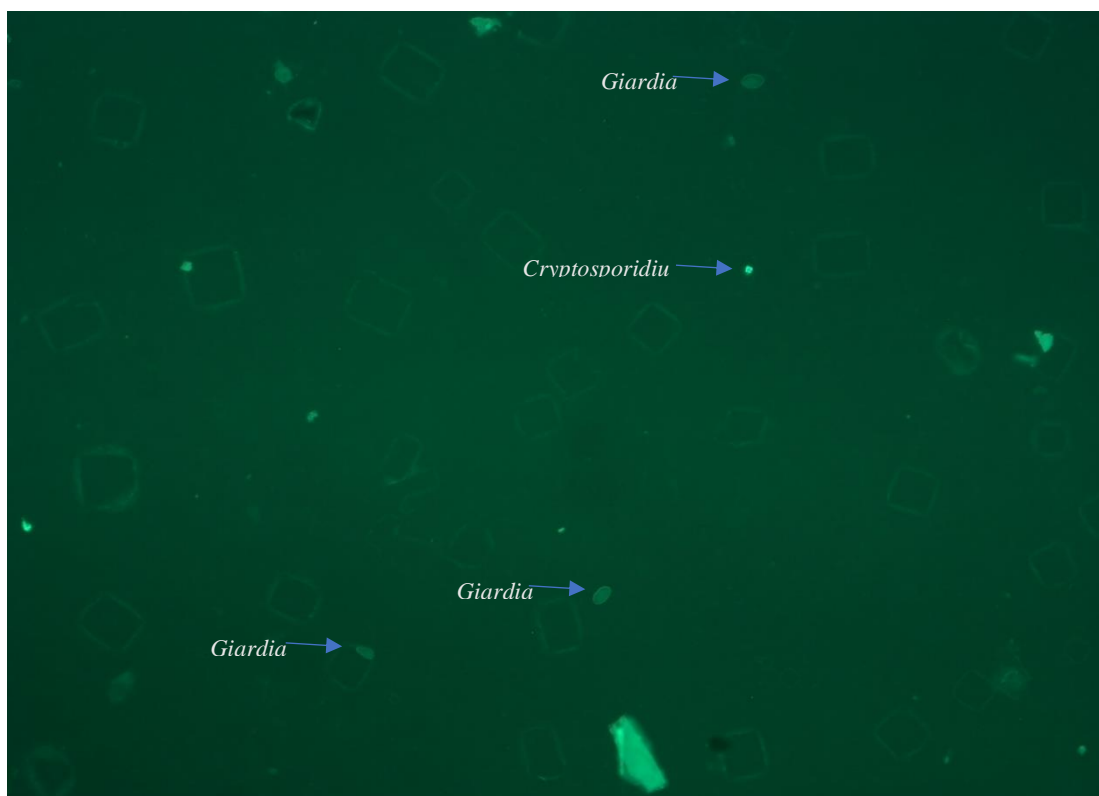
Tokom istraživanja prikupljeno je ukupno 48 uzoraka vode, primarno poreklom iz velikih reka i njihovih pritoka. Može se uočiti da su uzorci sakupljeni i iz irigacionih kanala, koji navodnjavaju, odnosno odvodnjavaju poljoprivredno zemljište, iz vodozahvata, kao i kupališta, odnosno mesta koje stanovništvo koristi za sport i rekreaciju. Na osnovu mapiranih lokaliteta, procenjeno je da je ovom studijom pokrivena adekvatna površina teritorije Srbije.

4.1.2. Kvalitet uzoraka

Svega pet uzoraka (10,4%) dodatno je filtrirano kroz gazu da bi se otklonila biomasa pre filtracije za koncentraciju (oo)cista. Ovi uzorci bili su poreklom iz irigacionih kanala (lokaliteti 18, 27, 40, 41) i iz reke Tamnave (24). Kod većine ostalih uzoraka iz vodozahvata i drugih stajaćih voda primećen je povećan turbiditet, ali ne i prisustvo dovoljno velikih čestica da bi se efikasno otklonile filtriranjem kroz gazu, te to nije učinjeno. Najmanje zamućeni uzorci bili su poreklom iz reke Pek (10) i Drine (13, 14), međutim treba pomenuti da izgled tj. stepen zamućenosti uzoraka nije bio u korelaciji sa evidentiranim fizičkim i hemijskim karakteristikama vodnog tela.

4.2. Rezultati provere efikasnosti koncentrisanja (oo)cista – validacija rezultata istraživanja

Mikroskopski preparat koji je načinjen nakon filtracije pijaće vode u koju su dodate inaktivisane (oo)ciste *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. posmatran je pod uveličanjem od 400x sa fluorescentnim filterom specifičnim za FITC/GFP. Od po 100 ± 2 cista odn. oocista oba parazita koliko je dodato u uzorak vode, izbrojana je 81 cista *G. intestinalis* (uspešnost 81%) i 32 oociste *Cryptosporidium* spp. (uspešnost 32%), čime je dokazano da je postignuta zadovoljavajuća efikasnost koncentracije prema smernicama US EPA 1623, što je potvrda za to da je metodologija uspešno implementirana prilikom ovog istraživanja kao i da su dobijeni rezultati validni. Na vidnom polju (Slika 4.1) preparata mogu se zapaziti tri ciste *G. intestinalis* i jedna oocista *Cryptosporidium* spp. koje su obeležene, kao i artefakti pravilnog oblika koji su autofluorescentni (verovatno kristali), ali nisu od značaja za istraživanje. Autofluorescencija artefakata u slučaju pijaće vode nije problematična za tumačenje rezultata, upravo zbog toga što su pravilnog oblika.



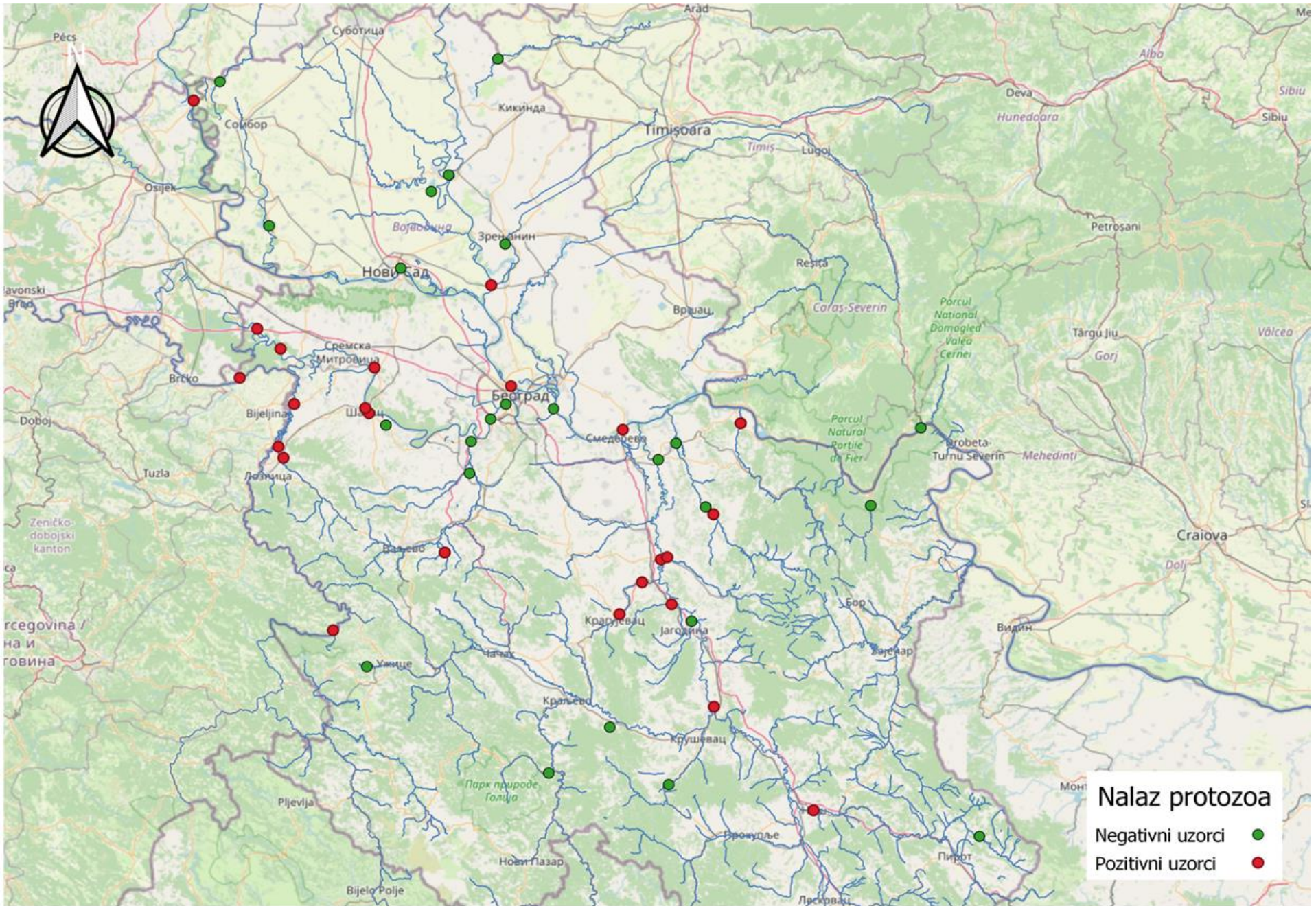
Slika 4.1. Rezultat provere efikasnosti metodologije za koncentrisanje (oo)cista - reprezentativno vidno polje preparata (FITC fluorescentni filter, uveličanje 400×)

4.3. Nalaz protozoa u površinskim vodama Srbije

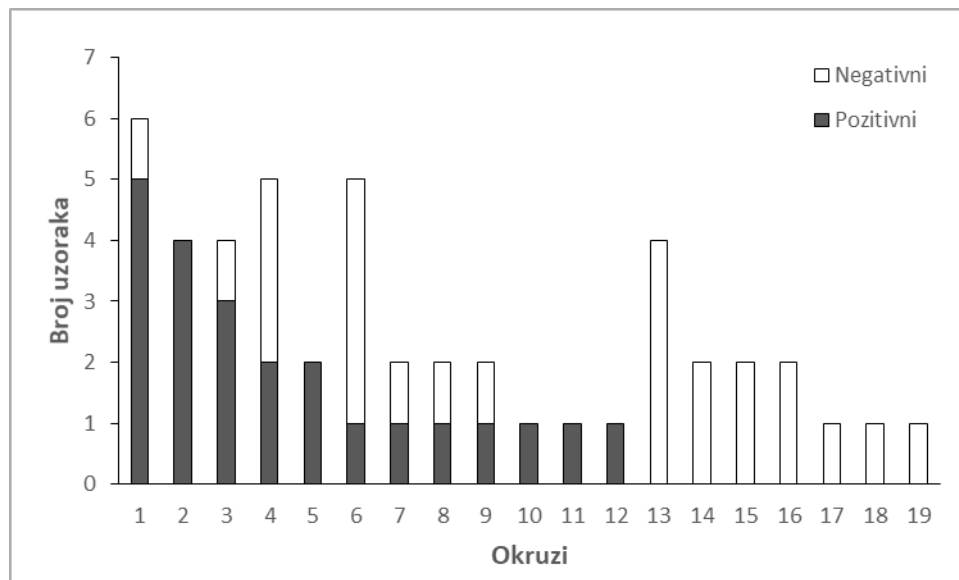
4.3.1. Ukupni nalaz: kontaminiranost površinskih voda cistama i oocistama protozoa

Od ukupno 48 uzoraka sakupljenih u ovom istraživanju, u 24 uzorka (50%) detektovane su (oo)ciste tri ispitivane protozoe *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii*. Uzorak se smatrao pozitivnim ukoliko je u njemu IFA testom ili PCR metodom detektovano prisustvo (oo)cista. Lokalitet se smatrao pozitivnim ako je u uzorku detektovano prisustvo bilo koje od tri ispitivane protozoe, bilo kojom metodom.

Veći broj uzoraka u kojima su bile prisutne (oo)ciste bio je grupisan u centralnoj Srbiji, u Šumadijskom i Pomoravskom okrugu (10,4%, 5/48) (Slika 4.2). Svih pet uzoraka poticalo je iz sliva Velike Morave i njenih pritoka poput Lepenice i Resave; u ovom slivu bilo je ukupno 14,6% (7/48) uzoraka u kojima su bile prisutne (oo)ciste. U zapadnoj Srbiji i Vojvodini, tačnije u Mačvanskom i Sremskom okrugu takođe je detektovano prisustvo ispitivanih protozoa na više lokacija u nekoliko reka. Paraziti su pronađeni u Drini i Savi (10,4%, 5/48), u njihovim pritokama, rekama Jadar i Bosut, kao i u irigacionom kanalu Kudoš koji se uliva u Savu sa Sremske strane (8,3%, 4/48). Prisustvo protozoa detektovano je i na lokacijama negrupisanim na nivou pojedinih okruga, i to u Nišavskom okrugu, na Nišavi, zatim u Zlatiborskom okrugu na reci Drini kod Bajine Bašte, i u Zapadnobačkom okrugu na Dunavu, kao i u Braničevskom okrugu na rekama Pek i Mlava. Pojedinačne lokacije na kojima je zabeležen pozitivan nalaz bile su na rekama Kolubari, Južnoj Moravi, Tisi i Dunavu, i to u Kolubarskom, Rasinskom i Podunavskom okrugu, kao i na teritoriji grada Beograda, dok u sedam okruga (Južnobački, Raški, Borski, Južnobanatski, Pirotski, Severnobačanski) prisustvo protozoa nije detektovano (Slika 4.3).



Slika 4.2. Prikaz lokacija uzorkovanja kao i status uzoraka u odnosu na nalaz patogenih protozoa. Negativni uzorci obeleženi su zelenim krugovima, a pozitivni crvenim.



Slika 4.3. Distribucija nalaza parazitskih protozoa u uzorcima površinskih voda u Srbiji u zavisnosti od okruga. Imena okruga: 1 - Mačvanski; 2 - Sremski; 3 - Pomoravski; 4 - Braničevski; 5 - Šumadijski; 6 - grad Beograd; 7- Zlatiborski; 8 - Zapadnobački; 9 - Rasinski; 10 - Podunavski; 11 - Nišavski; 12 - Kolubarski; 13 - Južnobački; 14 - Srednjebanatski; 15 - Raški; 16 - Borski; 17 - Južnobanatski; 18 - Pirotski; 19 - Severnobanatski.

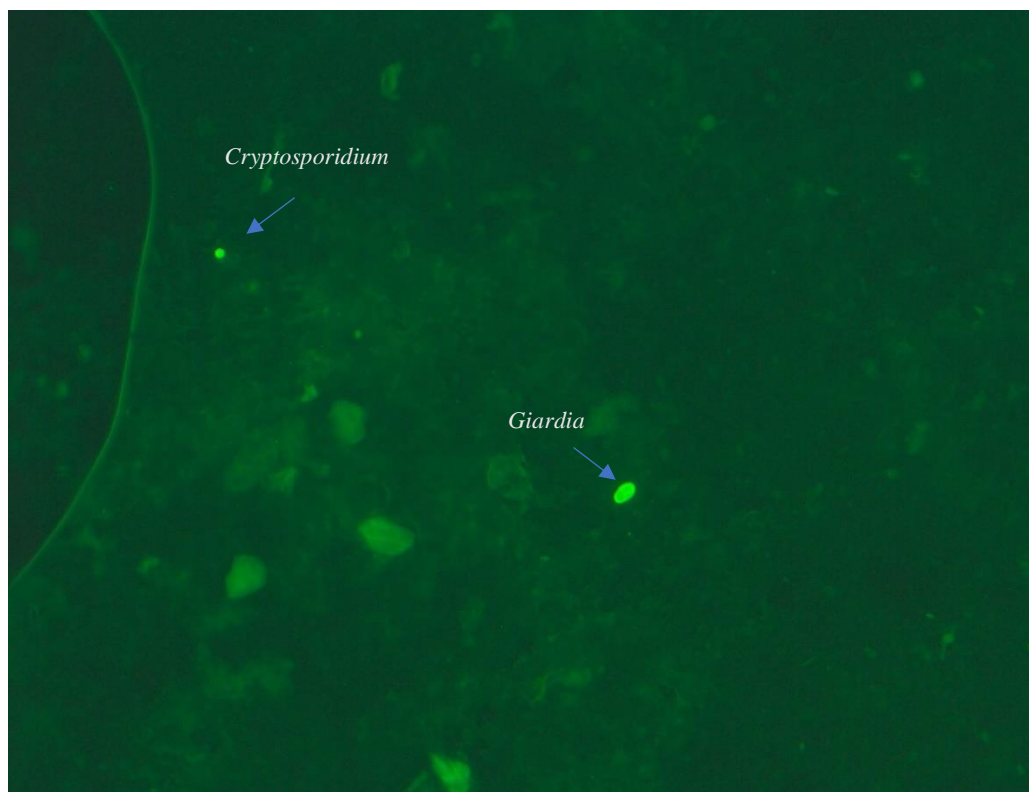
Ukupno, od svih uzoraka u kojima su bile prisutne (oo)ciste, najviše ih je bilo u Mačvanskom i Sremskom okrugu, 37,5% (9/24), dok je u Šumadijskom i Pomoravskom okrugu taj udeo iznosio 20,8% (5/24).

Utvrđeno je da je najviše uzoraka po pojedinom okrugu koji nisu bili kontaminirani (oo)cistama bilo na teritoriji grada Beograda (četiri od pet), na rekama Kolubari i Savi, svi locirani ruralno ili periurbano, uzvodno od samog grada. U centralnoj Srbiji, najveći broj uzoraka koji nisu bili kontaminirani poticao je iz vodozahvata iz kojih se crpi voda koja se koristi za vodosnabdevanje lokalnog stanovništva. U vodi uzorkovanoj iz vodozahvata u neposrednoj blizini gradova Užica i Kruševca (uzorci br. 32 i 33), nisu detektovane (oo)ciste. Vodozahvat Mosna je takođe bio negativan iako nije u upotrebi već nekoliko godina i uglavnom se koristi za snabdevanje Donjeg Milanovca tehničkom vodom, ali je i popularno mesto među sportskim ribolovcima.

4.3.2. Detekcija protozoa IFA metodom

Rezultati IFA testa pokazali su da je u 14 uzoraka (29,2%, 14/48) detektovano prisustvo cista *G. intestinalis*, dok su u pet uzoraka (10,4%, 5/48) detektovane oociste *Cryptosporidium* spp., a u tri uzorka (6,25%, 3/48), ciste i oociste obe vrste (Tabela 4.1). Na prikazanom reprezentativnom primeru preparata (Slika 4.4) nalaze se jedna cista *G. intestinalis* i nekoliko puta manja oocista *Cryptosporidium* spp. Pored ova dva parazita na preparatu se još mogu zapaziti i artefakti poreklom iz uzorka vode, koji fluoresciraju.

Što se prostorne distribucije nalaza protozoa IFA metodom tiče, na mapi se može primetiti grupisanje tj. lokalno povećano prisustvo oocista i cista parazita na dva mesta (u zapadnoj Srbiji na Drini i Savi sa pritokama, i u centralnoj Srbiji na Velikoj Moravi sa pritokama), dok su u nekim delovima zemlje *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. predstavljale sporadičan nalaz (Slika 4.5)



Slika 4.4. Mikrosopski preparat uzorka obojen IFA tehnikom (reprezentativni primer).

U slivu Velike Morave u četiri uzorka (8,3%, 4/48) detektovana je *G. intestinalis* dok su u jednom uzorku (2,1%, 1/48) iz Lepenice, leve pritoke Velike Morave, bile prisutne ciste i oociste obe vrste. Na severozapadu zemlje, u Mačvanskom i Sremskom okrugu, ciste i oociste su detektovane u devet uzoraka (18,75%, 9/48) od kojih su u četiri (8,3%, 4/48) bile prisutne ciste *G. intestinalis*, u takođe četiri (8,3%, 4/48) oociste *Cryptosporidium* spp., dok je jedan uzorak (2,1%, 1/48) iz reke Save sadržao ciste i oociste obe vrste.

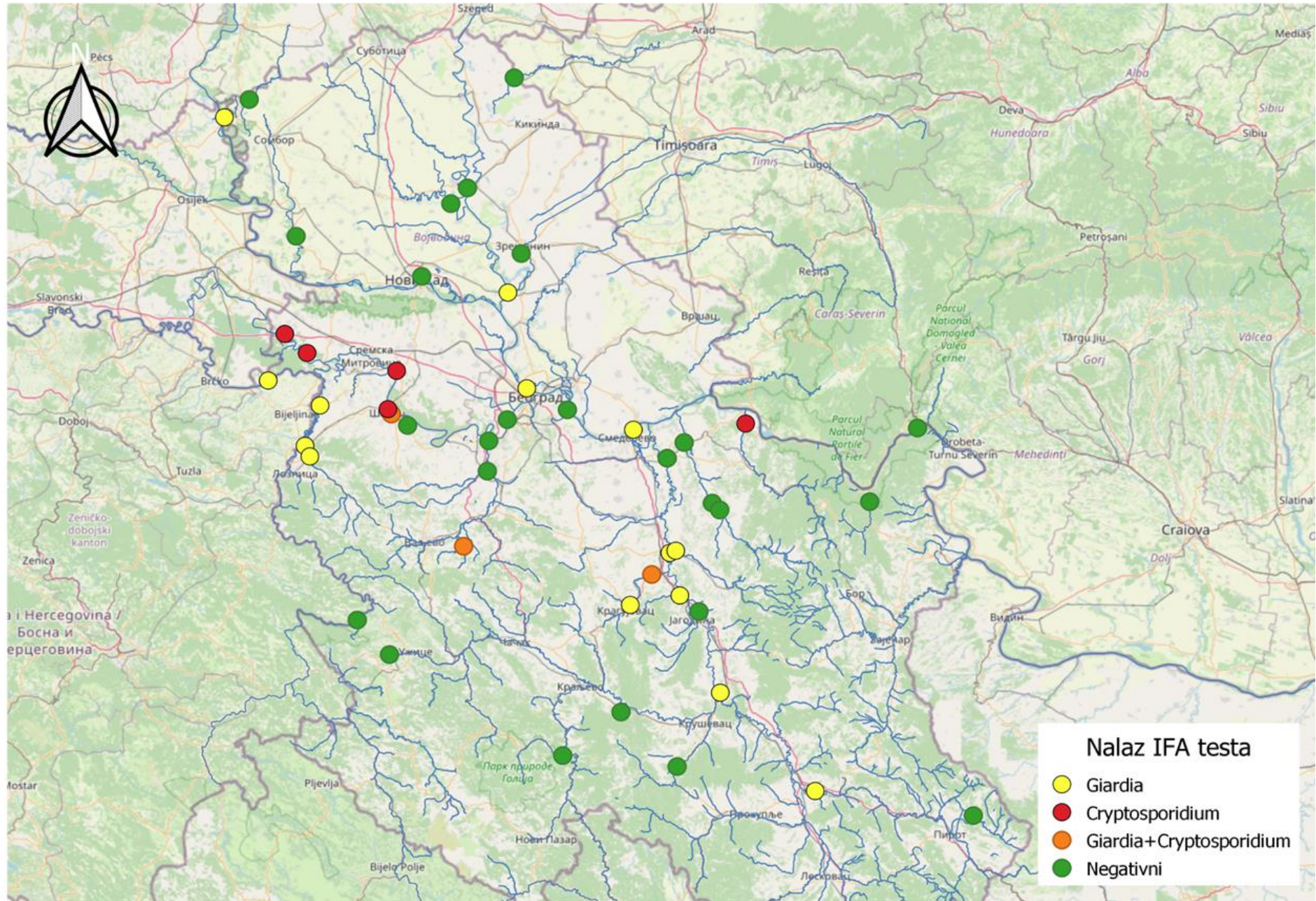
Izolovani nalazi *Cryptosporidium* spp. i *G. intestinalis* zabeleženi su u svim krajevima Srbije. U Vojvodini su ciste *G. intestinalis* detektovane u četiri uzorka (8,3%, 4/48) od kojih tri (6,25%, 3/48) sa Dunava i jedan (2,1%, 1/48) iz Tise. U jednom uzorku (2,1%, 1/48) iz reke Pek detektovane su oociste *Cryptosporidium* spp. dok su na jugu zemlje tj. u Nišavi detektovane ciste *G. intestinalis*, takođe u jednom uzorku (2,1%, 1/48).

Tabela 4.1. Rezultati detekcije (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. IFA testom

Broj uzorka	Geografski lokalitet	<i>G. intestinalis</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.
1	Šabac	-	+
2	Šabac	+	+
3	Ostružnica	-	-

4	Zemun	+	-
5	Vinča	-	-
6	Smederevo	+	-
7	Ribare	-	-
8	Lapovo	+	+
9	Ljubičevski most	-	-
10	Kusiće	-	+
11	Bratinac	-	-
12	Bagrdan	+	-
13	Badovinci	+	-
14	Bajina Bašta	-	-
15	Batrovci	-	+
16	Lešnica	+	-
17	Lešnica	+	-
18	Jarak	-	+
19	Jamena	+	-
20	Markovac	+	-
21	Lanište	+	-
22	Kalište	-	-
23	Ušće	-	-
24	Brgule	-	-
25	Petrovac na Mlavi	-	-
26	Kragujevac	+	-
27	Višnjićevo	-	+
28	Mrđenovac	-	-
29	Tekija	-	-
30	Mislođin	-	-
31	Mosna	-	-
32	Užice	-	-
33	Kruševac	-	-
34	Novi Bečej	-	-
35	Bezdan	+	-

36	Bački Breg	-	-
37	Titel	+	-
38	Novi Sad	-	-
39	Vrbica	-	-
40	Bačko Gradište	-	-
41	Bač	-	-
42	Park prirode "Stara planina"	-	-
43	Niš	+	-
44	Stalać	+	-
45	Zrenjanin	-	-
46	Vrnjačka Banja	-	-
47	Mionica	+	+
48	Beograd (Ada)	-	-



Slika 4.5. Nalaz protozoa IFA metodom. Zeleni krugovi predstavljaju lokacije sa negativnim uzorcima. Žutim krugovima su predstavljene lokacije gde je detektovana *Giardia intestinalis*, a crvenim lokacije sa *Cryptosporidium* spp. Narandžastim krugovima predstavljene su lokacije gde su detektovana oba parazita.

4.3.3. Detekcija gDNK protozoa PCR metodom

Svi uzorci testirani su PCR metodom bez obzira da li su rezultati IFA testa bili pozitivni ili negativni. S obzirom na to da za detekciju *T. gondii* u vodi ne postoji komercijalni kit, uzorci su nakon koncentrisanja ekstrahovani i testirani na prisustvo gDNK *T. gondii*.

4.3.3.1. PCR detekcija *G. intestinalis* u uzorcima vode

Detekcija gDNK *G. intestinalis* vršena je amplifikacijom β -giardin gena. Pozitivnim su se smatrali uzorci koji su nakon prvog koraka PCR reakcije dali fragment dužine 753 bp, a nakon drugog 511 bp.

U osam uzoraka detektovana je gDNK *G. intestinalis* (Tabela 4.2). Poređenje ovih rezultata sa detekcijom cista *G. intestinalis* IFA testom koji je bio pozitivan u ukupno 17 slučajeva pokazalo je da nije bilo lažno pozitivnih ni lažno negativnih rezultata dobijenih IFA metodom, tj. u svim uzorcima u kojima je detektovana gDNK detektovane su i ciste IFA testom, dok u uzorcima u kojima nisu bile prisutne ciste nije detektovana ni gDNK *G. intestinalis*.

Tabela 4.2. Lokacije uzoraka u kojima je detektovana gDNK *G. intestinalis*

Broj uzorka	Geografski lokalitet	<i>G. intestinalis</i> (β -giardin)
4	Zemun	+
6	Smederevo	+
8	Lapovo	+
12	Bagrdan	+
13	Badovinci	+
16	Lešnica	+
17	Lešnica	+
19	Jamena	+

Najveći broj lokacija gde je detektovana gDNK *G. intestinalis* pripadao je slivu reke Save (ukupno četiri) kao i slivu Velike Morave (tri), dok je jedna bila na Dunavu.

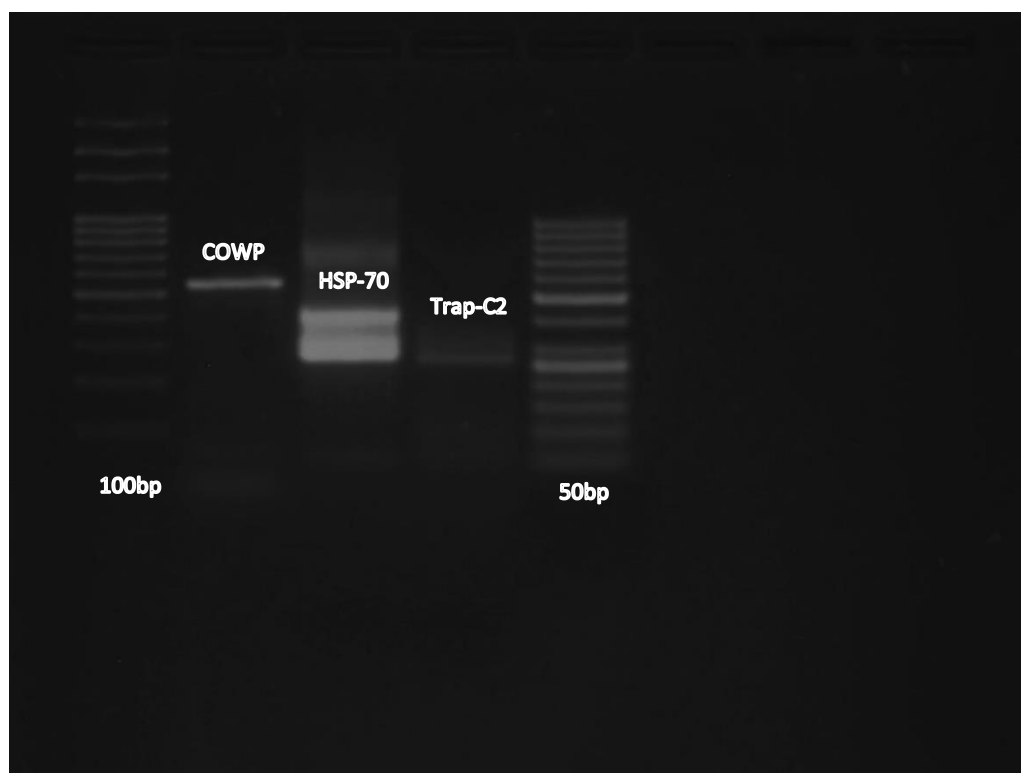
4.3.3.2. Standardizacija PCR metode za detekciju *Cryptosporidium* spp. u uzorcima vode

Ni jedan od četiri gena korišćenih za detekciju *Cryptosporidium* spp. nije uspešno amplifikovan ni u jednom od 48 uzoraka, i to u dva navrata. Da bi se isključila mala količina gDNK kao potencijalni razlog neuspele amplifikacije u prvobitnoj reakciji, izvršena je koncentracija gDNK u svim uzorcima

pre naredne PCR reakcije, pri čemu nije došlo do promene rezultata. Međutim, kako je i bilo očekivano, sva četiri gena bila su uspešno amplifikovana kada je korišćena pozitivna kontrola, odnosno gDNK *C. parvum*. Dužina fragmenata dobijenih u PCR reakciji sa pozitivnom kontrolom za svaki gen bila je drugačija (Tabela 4.3; Slika 4.6). Pozitivna kontrola za sekvencu SSU rRNK nije pokazana na Slici 4.6, jer je nakon uspešnih amplifikacija na početku eksperimenata vremenom potpuno izgubila sposobnost umnožavanja, te su u daljem istraživanju kao pozitivne kontrole korišćene preostale tri sekvence.

Tabela 4.3. *Target* geni korišćeni u PCR reakcijama za detekciju *Cryptosporidium* spp. i dužina dobijenih fragmenata

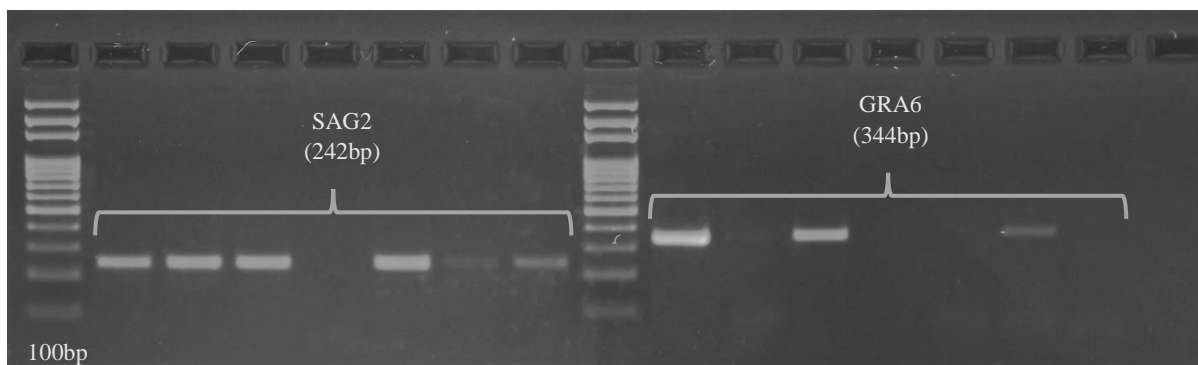
Target geni	Dužina fragmenta 1. korak	Dužina fragmenta 2. korak
SSU rRNK	1325 bp	826-864 bp
Trap-C2	369 bp	266 bp
COWP	550 bp	/
HSP-70	448 bp	325 bp



Slika 4.6. Agarozni gel sa pozitivnim kontrolama za tri od četiri ciljana gena *Cryptosporidium* spp.

4.3.3.3. PCR detekcija *T. gondii* u uzorcima vode

Kao što je već pomenuto, komercijalni kitovi još uvek nisu prisutni na tržištu tako da je *T. gondii* detektovana u prethodno koncentrisanim uzorcima vode, preostalim nakon završetka IMS procedure. Iz tako pripremljenog uzorka dalje je rađena ekstrakcija, i zatim detekcija gDNK *T. gondii* PCR metodom. Pozitivnim uzorcima smatrali su se samo uzorci u kojima su detektovani amplikoni sva tri testirana gena. U sedam uzoraka detektovana je sekvenca poreklom iz 529 bp repetitivnog elementa, u šest su detektovani amplikoni poreklom iz sekvence SAG2 gena (Slika 4.7) dok su u četiri uzorka detektovane sekvence poreklom iz sva tri gena (Tabela 4.4).

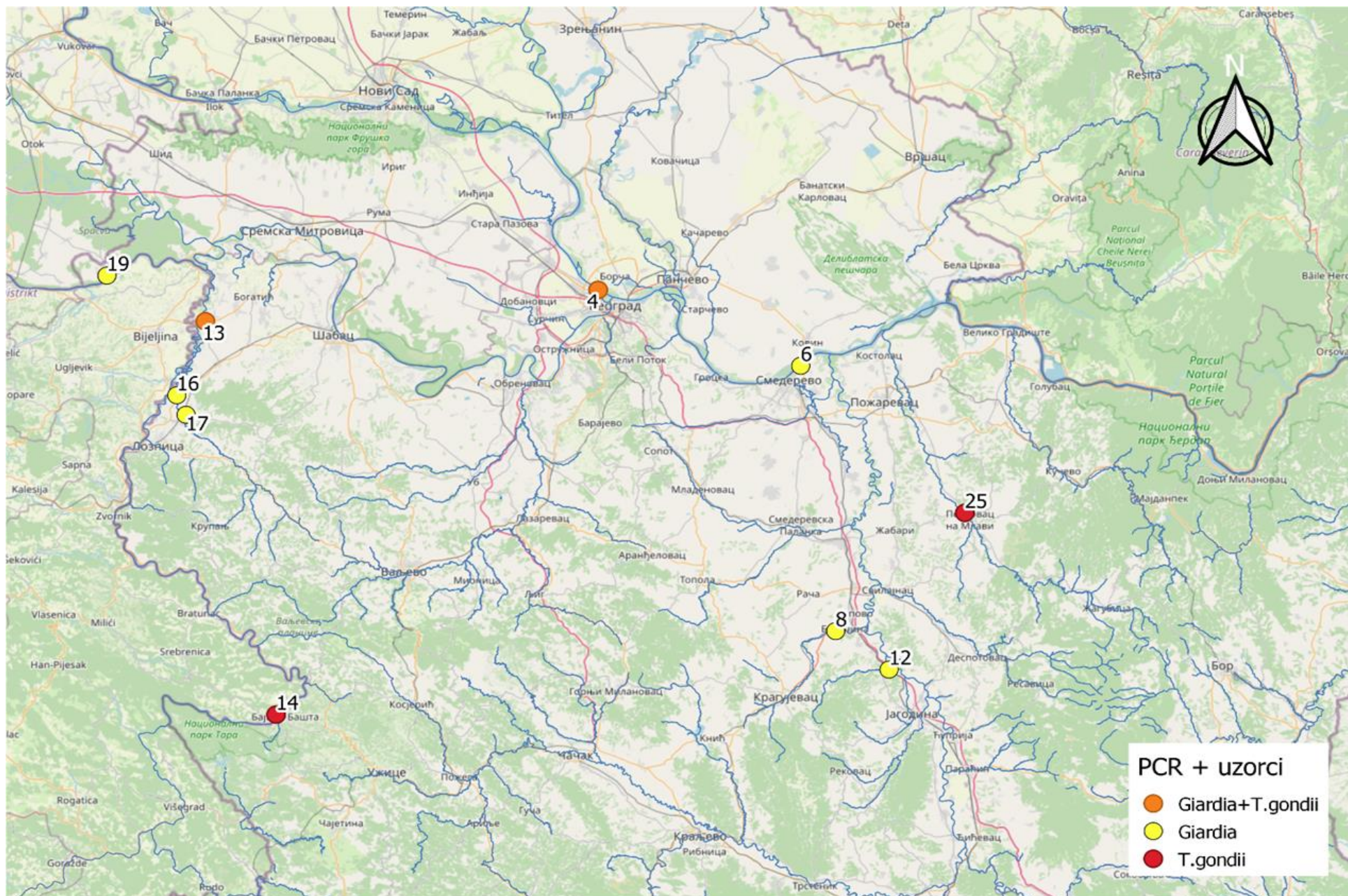


Slika 4.7. Agarozni gel sa pozitivnim uzorcima na *T. gondii*. 100 bp - ladder sa referentnom trakom na 500 bp; šest pozitivnih uzoraka na gen SAG2; četiri pozitivna uzorka na gen GRA6

Tabela 4.4. Lokacije uzoraka u kojima su detektovane sve tri ciljne sekvence u genomu *T. gondii*

Broj uzorka	Geografski lokalitet	<i>T. gondii</i>		
		529bp	SAG2	GRA6
4	Zemun	+	+	+
13	Badovinci	+	+	+
14	Bajina Bašta	+	+	+
25	Petrovac na Mlavi	+	+	+

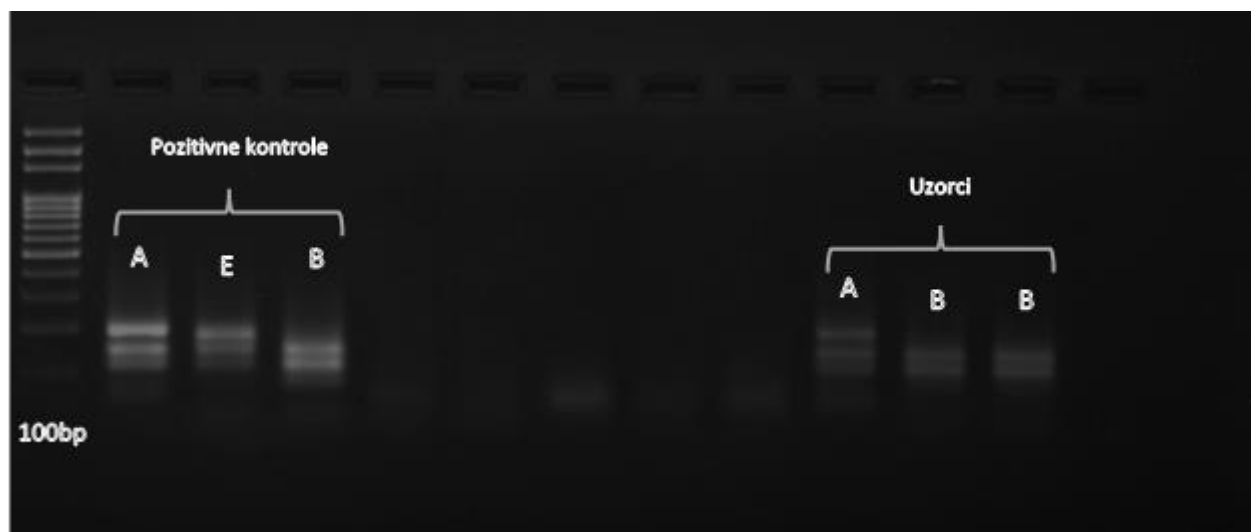
Dva pozitivna uzorka detektovana su na reci Drini, jedan na Dunavu u Zemunu, dok je četvrti pozitivan uzorak prikupljen iz reke Mlave kod Petrovca na Mlavi (Slika 4.8)



Slika 4.8. Nalaz protozoa PCR metodom. Predstavljani su uzorci pozitivni na parazite *Toxoplasma gondii* i *Giardia intestinalis*, sa naznačenim rednim brojem uzorka. Crveni krugovi predstavljaju uzorke pozitivne na *T. gondii*, žuti krugovi uzorke u kojima je detektovana *G. intestinalis*, dok su narandžastim krugovima obeleženi uzorci koji su sadržali gDNK oba parazita.

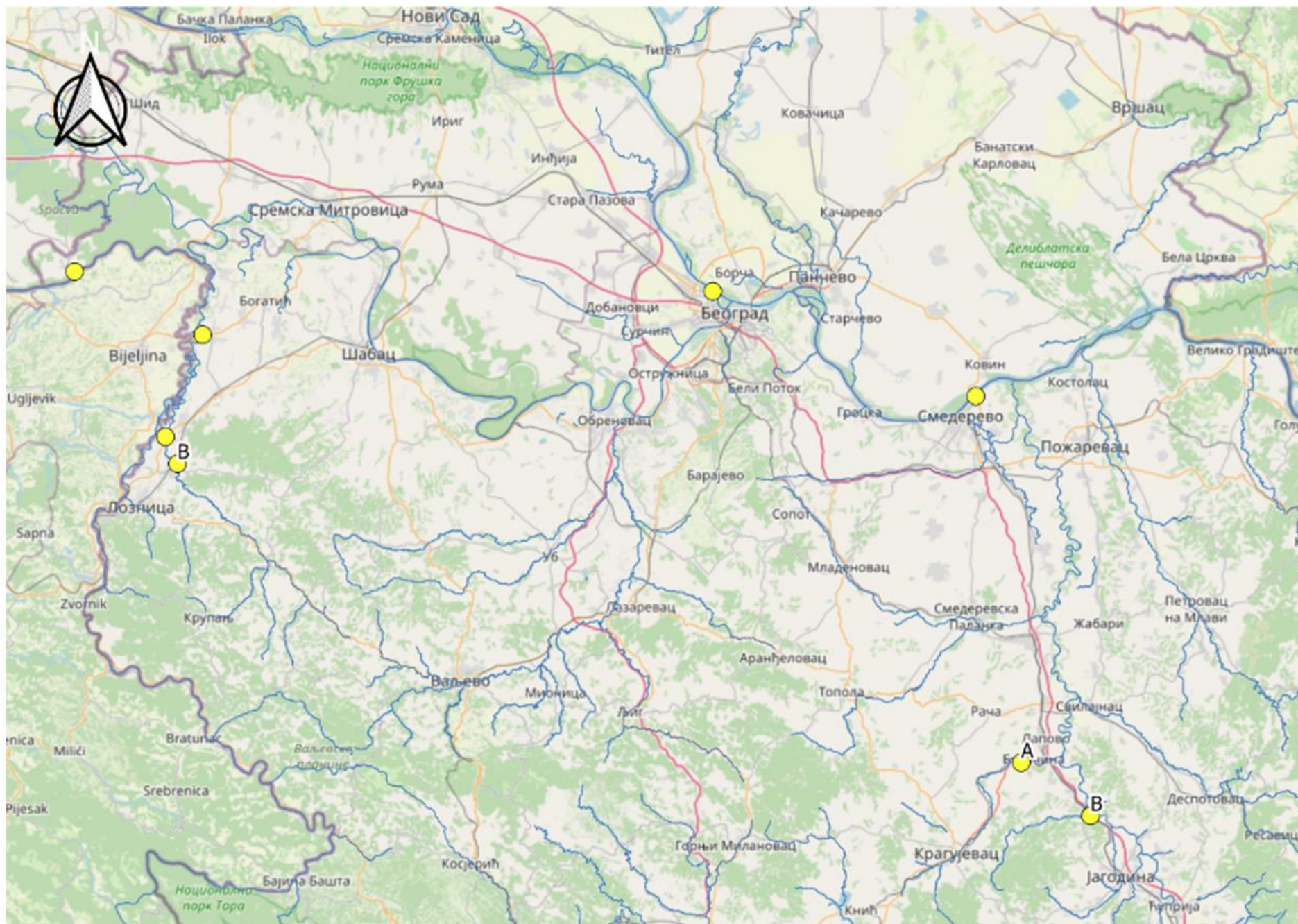
4.3.4. PCR-RFLP tipizacija asemblaža *G. intestinalis*

Od ukupno osam uzoraka u kojima je bio amplifikovan β -*giardin* gen, tipizacija asemblaža bila je uspešna u tri (Slika 4.9); detektovane su samo asemblaže A i B, dok asemblaža E, tipična za goveda, nije ustanovljena ni u jednom ispitivanom uzorku.



Slika 4.9. RFLP tipizacija asemblaža *Giardia intestinalis*. 100 bp - ladder sa referentnom trakom na 500 bp; Pozitivne kontrole - gDNK asemblaža A, E, B [dobijene od EURLP (Dr. M. Lalle, European Union Reference Laboratory for Parasites)]; Uzorci A, B, B - uzorci iz kojih je tipizacija asemblaža bila uspešna

U uzorku prikupljenom iz reke Lepenice (Lapovo) detektovana je *G. intestinalis* asemblaže A, dok je u preostala dva uzorka prikupljena iz Velike Morave kod Bagrdana kao i iz Lešnice detektovana *G. intestinalis* asemblaže B (Slika 4.10).



Slika 4.10. Mapa sa lokacijama osam uzoraka pozitivnih na gDNK *G. intestinalis*, sa naznačenim asemblazama utvrđenim za tri uzorka, čije su lokacije prema dezinaciji asemblaze na mapi obeležene slovima A i B.

4.4. Analiza uticaja najznačajnijih hidromorfoloških parametara površinskih voda na nalaz protozoa

Podaci o ispitivanjima kvaliteta površinskih voda preuzeti su iz izveštaja SEPA za 2018. i 2019. godinu, dok je jedan deo podataka o hidromorfološkom kvalitetu voda preuzet iz Hidroloških godišnjaka Republičkog hidrometeorološkog zavoda (RHMZS) za pomenute godine. Pregled svih poznatih podataka za lokacije na kojima je vršeno uzorkovanje dat je u Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Pregled fizičkih, hemijskih i bioloških parametara kvaliteta vode sa lokacija gde je vršeno uzorkovanje, kao i godišnje doba uzorkovanja, u odnosu na nalaz protozoa

Broj uzorka	Geografski lokalitet	pH	Proticaj m ³ /s	Mutnoća NTU	Rastvoreni kiseonik (O ₂) mg/L	Biološka potrošnja kiseonika (BPK-5) mg/L	Hemijska potrošnja kiseonika (HPK _{Mn}) mg/L	Ukupni organski ugljenik (TOC) mg/L	Ukupni koliformi n/100 mL	Nutrijenti (ukupni azot)	Kategorija kvaliteta vodnog tela (SEPA)	Godišnje doba uzorkovanja	Prisustvo protozoa*
1	Šabac	8,1	/	21,5	10,97	2	5,5	2,4	387	2	I-IV	Jesen/Zima	1
2	Šabac	8,1	/	21,5	10,97	2	5,5	2,4	387	2	I-IV	Jesen/Zima	1
3	Ostružnica	8,15	/	10,6	11,79	1,6	2,9	4,5	2.600	2	I-IV	Jesen/Zima	0
4	Zemun	8,17	/	11,6	11,8	2,9	5,3	5,6	65.700	3	II-IV	Jesen/Zima	1
5	Vinča	/	/	/	/	/	/	/	/	/	II-IV	Jesen/Zima	0
6	Smederevo	8,13	3180	7,32	11,3	3	5,5	3,6	9.850	2	II-IV	Jesen/Zima	1
7	Ribare	8,12	0,36	8,12	10,09	3	5,4	7,6	/	/	I-IV	Jesen/Zima	0
8	Lapovo	8,04	1,41	26,2	2	/	17,6	20,2	/	/	I-IV	Jesen/Zima	1
9	Ljubičevski most	8,18	79,9	7,24	12,47	2,1	3,7	4,8	5.500	3	I-IV	Jesen/Zima	0
10	Kusiće	8,43	1,7	4,64	12,4	2	3,7	3,6	5.290	3	I-IV	Jesen/Zima	1
11	Bratinac	8,1	/	6,72	11,47	2	3,7	3,9	/	3	I-IV	Jesen/Zima	0
12	Bagrdan	8,1	89,7	5,27	12,23	1,9	3,6	5,6	/	3	I-IV	Jesen/Zima	1
13	Badovinci	8,1	/	14,7	11,87	1,4	2,5	3,7	1.986	3	I-IV	Jesen/Zima	1
14	Bajina Bašta	8,06	233	3,74	11,97	0,9	1,6	3,4	/	3	I-IV	Jesen/Zima	1
15	Batrovci	7,58	/	19,9	/	/	30,2	19,6	24.000	3	V	Jesen/Zima	1
16	Lešnica	7,82	27,6	66	11,69	1,3	2,3	1,3	/	3	I-IV	Jesen/Zima	1
17	Lešnica	7,84	0,36	6,74	11,66	1,8	3,3	5,6	26.000	3	I-IV	Jesen/Zima	1
18	Jarak	8,01	/	55,1	2,6	/	44,3	37,1	1.210.000	5	/	Jesen/Zima	1
19	Jamena	8,07	1740	49,8	11,58	2,2	3,4	2,6	1.553	3	I-IV	Jesen/Zima	1
20	Markovac	8,17	0,57	9,93	8,76	5,6	10,2	5,8	2.100	3	/	Jesen/Zima	1
21	Lanište	7,77	0,52	22,7	1	/	9,1	12,7	/	5	/	Jesen/Zima	1
22	Kalište	8,06	0,51	243	11,84	3,6	6,6	8,2	18.950	3	/	Jesen/Zima	0
23	Ušće	8,1	15	47,2	12,09	3,1	7,9	3,2	1.550	2	I-IV	Jesen/Zima	0
24	Brgule	7,76	2,2	10,9	9,02	1,7	3	3,9	3.150	5	I-IV	Jesen/Zima	0

25	Petrovac na Mlavi	7,73	/	5,09	11,62	5,1	9,2	9,1	14.400	3	I-IV	Jesen/Zima	1
26	Kragujevac	8,13	0,301	37,3	0,5	/	31	25	24.000	5	/	Proleće/Leto	1
27	Višnjićevo	7,86	/	14	4,48	/	19,8	19,2	260	5	/	Proleće/Leto	1
28	Mrđenovac	7,73	0,409	16,8	10,9	6,7	10,2	8,8	1.400	3	/	Proleće/Leto	0
29	Tekija	7,81	/	9,07	9,26	2,2	3,8	2,4	1.710	3	II-IV	Proleće/Leto	0
30	Mislođin	7,97	/	17,6	7,44	2,8	3,5	4,1	500	3	I-IV	Proleće/Leto	0
31	Mosna	8,43	/	3,06	11,3	2	3,1	3,5	1.730	3	I-IV	Proleće/Leto	0
32	Užice	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Jesen/Zima	0
33	Kruševac	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Jesen/Zima	0
34	Novi Bečej	7,82	/	3,21	8,3	2	3,6	9,7	1.100	2	I-IV	Jesen/Zima	0
35	Bezdan	7,89	1590	26,3	11,5	1	3,4	3,5	2.800	3	I-IV	Jesen/Zima	1
36	Bački Breg	8,37	/	3,69	13,4	2	11,3	11,7	500	3	I-IV	Jesen/Zima	0
37	Titel	8	/	11,9	11	1	3	4,7	900	3	I-IV	Jesen/Zima	1
38	Novi Sad	8,15	2060	15,5	11,7	2,8	3,7	4,6	2.900	3	I-IV	Jesen/Zima	0
39	Vrbica	8	/	4,85	8,5	1	6	10,2	300	2	I-IV	Jesen/Zima	0
40	Bačko Gradište	8,3	/	4,42	12,9	3,9	5,1	7,4	300	3	II-IV	Jesen/Zima	0
41	Bač	7,79	/	12,1	10	6,5	7,8	10,01	1.800	3	II-IV	Jesen/Zima	0
42	Park prirode "Stara planina"	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Proleće/Leto	0
43	Niš	/	8,12	/	/	/	/	/	/	3	I-IV	Proleće/Leto	1
44	Stalac	/	21,2	/	/	/	/	/	/	/	I-IV	Proleće/Leto	1
45	Zrenjanin	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Proleće/Leto	0
46	Vrnjačka banja	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Proleće/Leto	0
47	Mionica	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	Proleće/Leto	1
48	Beograd	/	/	/	/	/	/	/	/	/	I-IV	Proleće/Leto	0

* 1 - pozitivan nalaz; 0 - negativan nalaz

Na osnovu datih vrednosti fizičkih i hemijskih parametara, SEPA određuje indeks kvaliteta voda, kojim se, po opadajućem nizu, vode svrstavaju u kategorije I-V, odnosno u vode odličnog, veoma dobrog, dobrog, lošeg i veoma lošeg kvaliteta.

Analizom svih posmatranih parametara, uključujući i indeks kvaliteta vode kao i godišnje doba uzorkovanja, pokazano je da nijedan od ovih faktora nije imao uticaja na prisustvo protozoa u vodi (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Vrednosti statističke značajnosti eventualnog uticaja ispitivanih parametara na nalaz protozoa u vodi, dobijene kao rezultat χ^2 testa.

Parametri	<i>P</i>
pH	1,000
Proticaj m ³ /s	0,988
Mutnoća NTU	0,268
Rastvoreni kiseonik (O ₂) mg/L	0,486
Biološka potrošnja kiseonika (BPK-5) mg/L	1,000
Hemijska potrošnja kiseonika (HPK _{Mn}) mg/L	0,496
Ukupni organski ugljenik (TOC) mg/L	0,099
Ukupni koliformi n/100 mL	1,000
Nutrijenti (ukupni azot)	0,163
Kategorija kvaliteta vodnog tela (SEPA)	0,465
Godisnje doba uzorkovanja	0,330

5. Diskusija

Predmet istraživanja ove disertacije bile su parazitske protozoe *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *T. gondii* i njihovo prisustvo u vodama Srbije. Ova tri organizma odabrana su za istraživanje jer su dokazani uzročnici hidričnih epidemija, između ostalog zbog otpornosti na ambijentalne uslove u akvatičnim ekosistemima i dugu vijabilnost, visoku transmisibilnost i širok spektar potencijalnih domaćina (sve tri vrste su zoonotske). U okviru istraživanja obrađeno je 48 uzoraka vode sa različitih lokacija te je pokriven veći deo teritorije države. Prikupljanje uzoraka odvijalo se po protokolima i planovima uzorkovanja Agencije za zaštitu životne sredine (SEPA). Sva vodna tela iz kojih je vršeno prikupljanje vode, programom mera SEPA označena su kao vodna tela od značaja, bez obzira na to da li je u pitanju geopolitički (blizina granice) ili sanitarno-higijenski značaj (zdravlje ljudi, životinja).

Rezultati su pokazali da postoji kontaminacija vodotokova i stajaćih voda u Srbiji ovim protozoama. Od ukupnog broja uzoraka, protozoe tj. njihove (oo)ciste ili gDNK detektovane su u 50% uzoraka. Površinske vode i vode za rekreaciju poput reka i jezera (prirodnih i veštačkih), jesu najčešće kontaminirane jer su i najizloženije kontaminaciji u poređenju sa podzemnim vodama. U svetu, stepen kontaminacije površinskih voda cistama *G. intestinalis* iznosi od 12% pa do 100% ali u većini slučajeva, istraživanja su pokazala da je kontaminiranost veća od 50% (Robertson & Gjerde, 2001; Boarato-David et al., 2017; Ćirković et al., 2020). U rekama iz svih velikih slivova sa teritorije Srbije (Dunav, Drina, Sava i Velika Morava – ukupno četiri) detektovan je barem jedan pozitivan uzorak. U sedam okruga nije detektovano prisustvo protozoa u vodotokovima na njihovoj teritoriji. To se posebno odnosi na teritorije koje imaju zaštićena područja, kao što su npr. Park prirode „Golija” u zapadnoj, ili Park prirode „Stara Planina” u istočnoj Srbiji, kao i oblasti u blizini državne granice sa Rumunijom, gde se i na našoj, i na teritoriji susedne zemlje, u blizini nalaze oblasti sa najvišim stepenom zaštite, proglašene Nacionalnim parkovima. Takođe, važno je istaći da ni u jednom od ispitivanih vodozahvata koji se koriste za snabdevanje stanovništva vodom nije detektovano prisustvo protozoa. Ovaj podatak može da ukaže na to da je zona sanitarne zaštite izvorišta adekvatna te da nema potencijalnih propusta koji bi mogli da izazovu promenu sastava vode ili unošenje patogenih organizama u istu.

U periodu od 2011. do 2020. godine, u svetu je zabeleženo ukupno 630 hidričnih epidemija (Efstratiou et al., 2017a; Ma et al., 2022). Ovaj broj, mada veliki, verovatno nije konačan, i može se očekivati da je značajno veći. Naime, može se pretpostaviti da je znatan broj hidričnih epidemija ostao neotkriven usled nepostojanja/nedostupnosti ili primene neadekvatne metodologije za detekciju protozoa u vodi, nedovoljno brze reakcije odgovornih institucija, stručnih propusta i drugog. Većina gore pomenutih epidemija bila je posledica kontaminacije vode protozoama *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp., dok je manji broj bio izazvan vrstama *T. gondii*, *Cylospora cayetensis* i drugim. Dominacija *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u zvaničnim izveštajima i/ili radovima kao uzročnika može se objasniti činjenicom da je za detekciju ova dva parazita US EPA propisala metodologiju za detekciju u vodi koja je u upotrebi već preko 15 godina (US EPA, 2012). Iako ova metodologija zahteva specifičnu opremu, daleko je dostupnija od drugih metodologija koje se koriste za detekciju ostalih vrsta parazita, pri čemu za neke uzročnike i dalje ne postoji konsenzus naučne zajednice koja je metoda najbolja. Od ukupnog broja poznatih epidemija nešto manje od 15% je prijavljeno u Evropi, dok je ostatak detektovan u SAD i na Novom Zelandu (Ma et al., 2022). Sve hidrične epidemije sa evropskog kontinenta detektovane su u državama na severu (Efstratiou et al., 2017a). Ovi podaci mogu da ukažu na to da praćenje i prijava hidričnih epidemija u ostalim delovima Evrope i sveta ili ne postoje ili su neadekvatni, tako da većina prođe neopaženo. Mogućnost da se hidrične epidemije uopšte ne javljaju u drugim zemljama je mala, zbog ubikvitarnosti parazitskih protozoa u različitim ekosistemima; međutim verovatno objašnjenje za neprijavljivanje odnosno neotkrivanje hidričnih epidemija u nerazvijenim zemljama ili zemljama u razvoju jeste nedostatak metodologije za detekciju, a ukoliko metodologija postoji, neadekvatan monitoring. Osim toga, podaci pokazuju da je uticaj klime i temperature na vijabilnost i infektivnost (oo)cista parazita mnogo

veća nego što se mislilo, te da vijabilnost brže opada pri višim temperaturama i da zato ne mogu da izazovu infekciju (Fayer, 1994; King et al., 2005).

U Srbiji nije dokazana uloga vode u nastanku oboljenja tj. hidričnih epidemija izazvanih ispitivanim protozoama, mada se beleže podaci o samom pojavljivanju oboljenja, posebno đardijaze, a postoje i podaci iz nekoliko studija, prikazanih u narednom tekstu, o detekciji infekcije ovim protozoama kod ljudi i životinja.

Iako bolesti uzrokovane ispitivanim protozoama podležu sprovođenju epidemiološkog nadzora (prema Zakonu o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti, „Sl. glasnik RS“, br. 15/2016, 68/2020 i 136/2020), on je samo pasivan, tj. prikupljaju se podaci o incidenciji i prevalenciji, bez aktivnog praćenja tj. sprovođenja pravih epidemioloških studija. Prema podacima Instituta za javno zdravlje „Milan Jovanović Batut“, broj slučajeva lamblijaze (đardioze) kod ljudi razlikuje se od godine do godine. U periodu od 2015. do 2019. godine u Srbiji je registrovano ukupno 370 slučajeva đardioze, s tim što je najveći broj obolelih ljudi bio 2017. godine ($n = 91$) a najmanji 2018. godine ($n = 69$). Đardioza je prijavljena u ukupno 11 okruga, s tim što su najveća incidencija i broj obolelih utvrđeni u Mačvanskom okrugu 2018. i 2019. godine (Jovanović, 2021). Interesantno je da je u ovom istraživanju pokazano da su u uzorcima vode iz Mačvanskog ali i Sremskog okruga detektovane ciste *G. intestinalis*, te postoji osnovana sumnja da je nekolicina hidričnih epidemija koje su se desile u prošlosti možda bila izazvana ovom protozomom. Uz podatke IZJZ „Batut“, postoje i istorijski podaci o prevalenciji *G. intestinalis* kod školske dece različitih starosnih kategorija u Srbiji. Istraživanje je rađeno pre više od 15 godina i tom prilikom je bilo obuhvaćeno 5440 dece sa mestom prebivališta u centralnoj Srbiji kao i na teritoriji grada Beograda. Ukupna prevalencija je iznosila 6,8% kod dece iz centralne Srbije, odnosno kretala se od 5,1% do 8% tokom perioda od tri godine kod dece sa prebivalištem na teritoriji grada Beograda (Nikolić et al., 2004). Zatim, kontinuirana evidencija i analiza rezultata koproloških parazitoloških ispitivanja (u sklopu obaveznih sanitarnih pregleda) u IZJZ Niš, pokazala je pad prevalencije đardioze kod odrasle asimptomatske populacije u Nišavskom okrugu sa 0,43 na 0,06% u periodu od 2002. do 2014. godine (Miladinović Tasić, 2006; Miladinović Tasić et al., 2008; 2010; 2017). U istom okrugu, kod pacijenata sa simptomima dijareje, prevalencija đardioze bila je 4% kod dece do 14 godina starosti, a čak 10% kod odraslih (Miladinović Tasić, 2006; Miladinović Tasić et al., 2008). Istraživanje o prevalenciji *G. intestinalis* kod pasa i mačaka u Srbiji urađeno je 2002. godine i tom prilikom obuhvaćeno je 248 jedinki (167 pasa i 81 mačka). Rezultati su pokazali da je prevalencija bila najviša kod pasa lualica (18,7%) kao i pasa sa farmi (36,4%) dok su vlasnički psi imali značajno nižu prevalenciju (7,4%). Takođe, prevalencija kod kućnih mačaka bila je viša u poređenju sa prevalencijom kod vlasničkih pasa i iznosila je 22,2% (Nikolić et al., 2002).

Prvi registrovani slučaj kriptosporidioze u Srbiji kod imunokompetentnih osoba dogodio se 2010. godine pri čemu je obolela tročlana porodica. Iako je *Cryptosporidium* spp. laboratorijski potvrđen u uzorcima stolice obolelih, genotipizacija nije urađena iz tehničkih razloga, a uprkos epidemiološkoj anketi, autori ipak nisu mogli sa sigurnošću da identifikuju izvor infekcije (Gvozdrenović et al., 2012). Nije isključeno ni hidrično poreklo ove male porodične epidemije, s obzirom na to da je voda odličan medijum za prenos oocista ovog parazita, koje su veoma otporne u spoljašnjoj sredini.

Prevalencija *T. gondii* kod ljudi u Srbiji poslednjih nekoliko decenija je u opadanju; krajem 1988. kod žena generativne dobi zabeleženo je čak 86% pozitivnih od ukupnog broja obrađenih uzoraka, da bi 1997. godine taj broj opao na 39% (Bobić et al., 2003), a 2007. na 31% (Bobić et al., 2011). Prema najnovijim podacima prevalencija *T. gondii* u zdravoj populaciji oba pola iznosi 20,5% (Stopić et al., 2022).

Moguće je da je za jedan broj ovih infekcija izvor bila voda kontaminirana oocistama *T. gondii*. Smatra se da je u Evropi oko 43% populacije vlasničkih mačaka seropozitivno na toksoplazmu, dok je taj broj u populaciji divljih mačaka viši i iznosi 67% (Montazeri et al. 2017). Iako je period eliminacije oocista nakon infekcije mačaka kratak, istraživanja su pokazala da se oociste izlučuju u spoljašnju sredinu u višemilionskom broju, te je potencijal za kontaminaciju zemljišta ogroman (Hill

& Dubey, 2002). Pošto je poznato da oociste *T. gondii* mogu da ostanu vijabilne u zemljištu i vodi duže od godinu dana, nije neočekivano da isto tako mogu da izazovu hidrične epidemije (Shapiro et al. 2019). Kao što je pomenuto, podaci za Srbiju ukazuju na to da postoji trend opadanja prevalencije infekcije parazitom *T. gondii* kod ljudi. Međutim, izvor infekcije u većini slučajeva nije poznat. U poslednjih nekoliko godina radi se na razvijanju testova koji bi mogli da utvrde koji je razvojni oblik - oocista (sporozoit), ili tkivna cista (bradizoiti) - *T. gondii* doveo do infekcije domaćina, pošto bi se na ovaj način moglo proceniti koliki je relativni značaj oocista (koje se potencijalno prenose i vodom) za nastanak infekcije.

Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije prvo je istraživanje koje se bavilo detekcijom protozoa u površinskim vodama u Srbiji. Ispitivanja bioloških, mikrobioloških (tj. bakterioloških), fizičkih i hemijskih parametara za ocenu ekološke ispravnosti vode sprovode se svakodnevno, odnosno nedeljno ili mesečno, u zavisnosti od lokaliteta na kome se vrši uzorkovanje. Ova ispitivanja su od velike važnosti ne samo za zdravlje stanovništva, već i kao bitan pokazatelj stepena zagađenosti vodotokova u Srbiji. Međutim, iako je metodologija za detekciju protozoa u vodi razvijena i standardizovana, a reagensi i oprema komercijalno dostupni, u Srbiji nije u rutinskoj upotrebi, za razliku od pojedinih zemalja u Evropi (ISO 15553, 2006; Kifleyohannes & Robertson, 2020). Istraživanja koja su vršena u proteklih 15 godina u evropskim državama pokazala su značajan stepen kontaminacije površinskih voda, kao i vode koja napušta kanalizacione kolektore i ulazi u vodotokove, cistama *G. intestinalis* i oocistama *Cryptosporidium* spp. (Ongerth et al., 2018). U Srbiji se oko 58% kanalizacionih otpadnih voda skuplja sistemima za kanalizaciju, od kojih se skoro 4/5 (79%) ispušta u spoljašnju sredinu bez prethodnog prečišćavanja (Veljković et al., 2018). Ukupno se samo 12% otpadnih voda prečišćava, i to tako da se oko 1,3% prečišćava primarno, ili mehanički, odnosno uklanjanjem samo čvrstih suspendovanih ili plutajućih čestica, dok se za 8,7% vrši sekundarno ili biološko prečišćavanje, u koje spada aerobno ili anaerobno razlaganje organskih materija (Veljković et al., 2018). Najzad, svega 1,9% otpadnih voda podleže tercijarnom prečišćavanju, čime se postiže uklanjanje zagađenja azotom i fosforom, i to u kanalizacionom sistemima na koje su priključeni građani Subotice. Izneti podaci su prilično zabrinjavajući kada se uzme u obzir da je kanalizaciona mreža severne i središnje Evrope, koja pokriva više od 77% stanovništva povezana sa tercijarnim sistemom za prečišćavanje otpadnih voda (Veljković et al., 2018). Višestepeno prečišćavanje sprečava da velike količine organskih i neorganskih jedinjenja dospeju u vodotokove i tako poremete ravnotežu vodenih ekosistema. S obzirom na činjenicu da većina otpadnih voda u Srbiji direktno (ispuštanjem kanalizacije) ili indirektno (spiranjem zemljišta) dospeva u površinske vode a verovatno i u podzemne, nalaz (oo)cista parazita u 50% ovde ispitanih uzoraka nije iznenađujući.

Kako bi obezbedila ispravnu vodu za ljudsku upotrebu, EPA u SAD je na osnovu zakona o bezbednosti vode za piće procenila rizike po ljudsko zdravlje koje predstavlja voda za piće kontaminirana raznim patogenim agensima, među kojima su se našli i *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. Agencija je predložila metodologiju koja će se koristiti u detekciji navedenih protozoa u površinskim vodama radi prevencije hidričnih epidemija (US EPA, 2012). Ova metodologija pod registracionim brojem 1623, iako u upotrebi još od 1996. godine, svoj finalni oblik dobila je 2005. godine. U ovoj doktorskoj disertaciji, detekcija *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. rađena je po pomenutoj metodologiji, dok je detekcija *T. gondii* vršena na drugi način iz tehničkih razloga.

Uprkos činjenici da je metodologija 1623 „zlatni standard“ u detekciji *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u uzorcima vode različitog porekla (pijaća, površinska, otpadna), ipak je ograničena jer turbiditet vode može značajno da utiče na kvalitet rezultata. Ukoliko je u uzorku prisutna veća količina rastvorenih organskih i neorganskih čestica, pore na filteru se zapuše, što zahteva zamenu filtera ukoliko ga nije moguće adekvatno isprati, ili pak često ispiranje, prilikom kojeg može doći do gubitka integriteta filtera i samim time, gubitka (oo)cista. Takođe, prisustvo raznih hemikalija i rastvorenih mineralnih soli može prilikom IMS da utiče na proces vezivanja

antitela za omotač (oo)ciste, dok povećano prisustvo metala u vodi može da dovede do kompeticije sa magnetnim česticama (Moss et al. 2014).

Uzorci vode koji su ispitani u ovom istraživanju potekli su iz veoma heterogenih vodnih tela, većih i manjih reka, jezera, vodozahvata i irigacionih kanala, tako da se kvalitet i hemijski sastav uzoraka veoma razlikovao. Uzorci potekli iz manjih reka i irigacionih kanala bili su veoma bogati organskom materijom, što je uslovalo da se filter tokom obrade uzorka ispira i po nekoliko puta zbog učestalog zapušavanja. S druge strane, stajaće vode i kao i veće reke uglavnom su filtrirane bez čestog ispiranja filtera.

Primenom različitih indeksa zagađenja ustanovljeno je da veliki broj vodotokova u Srbiji poseduje vrednosti teških metala iznad dozvoljenih granica (Sakan et al., 2009). Takođe, u sedimentu reka Južne i Zapadne Morave i Peka, utvrđeno je da najveći doprinos povećanoj koncentraciji ovih zagađivača iz antropogenih izvora (Sakan et al., 2009). Isti slučaj bio je i sa većim rekama poput Save i Tise gde su usled kontinuiranog izlivanja otpadnih voda iz industrijskih postrojenja kao i usled akcidenata, vrednosti teških metala u sedimentu značajno iznad dozvoljenih granica (Sakan et al., 2009).

S obzirom na iznete podatke o tome da hemijski sastav vode može da utiče na separaciju (oo)cista pomoću IMS, možda je potrebno prilagođavanje metodologije svakom uzorku posebno, iako bi to produžilo proces detekcije. Konkretno u ovom istraživanju svi uzorci vidno bogati organskom materijom bili su filtrirani kroz gazu kako bi se uklonili partikulati. Sam hemijski sastav kao i količina metala rastvorenih u vodi bili su nažalost nepoznati, tako da na taj aspekt nije moglo da se utiče tokom analize. Tako da ako se pretpostavi da svi navedeni ometajući faktori dovode do smanjenja osetljivosti i specifičnosti IMS, može se očekivati da je kontaminacija protozoama reka u Srbiji još i veća od zabeležene.

Rezultati provere ispravnosti metodologije za koncentrisanje (oo)cista urađeni su pre početka istraživanja, odnosno pre obrade prvog uzorka, po protokolu koji je uspostavljen na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Oslu. Sem provere ispravnosti metodologije, ovaj protokol se koristi da bi se evaluirao uticaj biološkog i hemijskog sastava uzorka vode na stepen uspešnosti detekcije (oo)cista. U ove svrhe, tokom obuke kandidata na Univerzitetu u Oslu i pripreme za izradu ove disertacije, uzorci pijaće vode eksperimentalno su kontaminirani različitim količinama supstrata za biljke, a zatim je u njih dodato po 100 inaktivisanih (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. iz komercijalno dostupnog preparata. Uzorci su zatim vizuelno procenjeni i podeljeni na najviše, srednje i malo zamućene. Dodatno je analiziran i uzorak pijaće vode kojem nije dodat supstrat i koji se zato kvalifikuje kao nezamućen. Nakon koncentracije filtracijom, IMS, i zatim detekcije imunofluorescencijom, pokazano je da je u najmanje zamućenom uzorku uspešno detektovano 73% cista *G. intestinalis* i 63% oociste *Cryptosporidium* spp., u srednje zamućenom uzorku 42% (oo)cista *G. intestinalis* odn. *Cryptosporidium* spp., dok je u najmutnijem uzorku detektovano samo 8% cista *G. intestinalis* i 7% oocista *Cryptosporidium* spp. Procenat efikasnosti detekcije (oo)cista u najmutnijem uzorku ne zadovoljava kriterijume propisane u US EPA protokolu 1623, jer neophodna vrednost za prolazni kvalitet nalaza iznosi 30% (US EPA, 2012). Rezultat nakon koncentrisanja uzorka pijaće vode koji se kvalifikuje kao nezamućen u našem istraživanju bio je 81% cista *G. intestinalis* i 32% oociste *Cryptosporidium* spp., što zadovoljava kriterijume propisane u protokolu 1623 (US EPA, 2012). Navedeni rezultati potvrdili su nalaze Feng et al. (2013) koji su ukazali na obrnutu proporcionalnost mutnoće vode i uspešnosti izolacije/detekcije (oo)cista. Nešto niži procenat detekcije oocista *Cryptosporidium* spp. u nezamućenom uzorku u odnosu na najmanje zamućen i srednje zamućen uzorak može se vrlo verovatno objasniti suptilnim razlikama tokom manuelnog procesuiranja (ispiranja) filtera, što ukazuje na to da kontrola kvaliteta mora biti integrisana u proces analize uzoraka i da je neophodno da se vrši u regularnim intervalima. I pored potencijalnih ograničenja koja mogu smanjiti uspešnost detekcije IMS metodom, u istraživanjima koja su činila sastavni deo ove disertacije metod se pokazao kao veoma adekvatan s obzirom na to da primena PCR

metoda za detekciju *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u istim uzorcima nije povećala broj pozitivnih uzoraka.

Upotreba različitih monoklonskih antitela specifičnih za omotač ciste *G. intestinalis* i oociste *Cryptosporidium* spp. konjugovanih sa fluoroforima jeste rutinski način detekcije u dijagnostičke i u eksperimentalne svrhe. Prednost ove tehnike jesu osetljivost i specifičnost koje daleko nadmašuju detekciju zasnovanu na mikroskopiranju nativnih preparata ili preparata obojenih Lugolovim rastvorom (Stibbs & Ongerth, 1986, Uiterwijk et al., 2018). S druge strane, standardizovane metode detekcije oocista *T. gondii* u vodi, iako je bilo nekoliko pokušaja da se razviju, nažalost nisu dostupne, ponajviše zbog nedostatka odgovarajućih monoklonskih antitela (Harito et al., 2017a). Imajući ovo u vidu, IFA metoda je u ovom istraživanju korišćena isključivo za detekciju (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. U ovom istraživanju je za detekciju (oo)cista korišćen komercijalni IFA kit proizvođača Cellabs (Crypto/Giardia CEL) koji je jedini bio dostupan na našem tržištu. Sem ovog, postoje drugi komercijalni kitovi, a preporuka US EPA je da se koristi kit proizvođača Waterborne Inc. (Aqua-Glo) jer je metodologija standardizovana upravo pomoću ovog kita. Imajući u vidu da Aqua-Glo nije bio dostupan za poređenje, osetljivost i specifičnost Crypto/Giardia CEL nije mogla eksperimentalno da se proveriti, iako proizvođač u deklaraciji tvrdi da i specifičnost i senzitivnost iznose 100%.

Procena vijabilnosti (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. u ovom istraživanju nije rađena. Reagensi koji se često upotrebljavaju za procenu vijabilnosti, kao što je npr. 4'6-diamino-2-phenylindol (DAPI) koji predstavlja interkalacionu boju sa afinitetom prema nukleinskim kiselinama, zapravo nisu idealni jer se DAPI vezuje za nukleinske kiseline čije prisustvo ili odsustvo unutar (oo)cista nije nužno vezano sa vijabilnost. Prisustvo nukleinskih kiselina unutar (oocista) je indicija za intaktnost membrane jedra, što može biti indicija za vijabilnost, ali ne i sam dokaz vijabilnosti. Sem DAPI, moguće je koristiti i Hoechst boju koja se takođe vezuje za nukleinske kiseline, ali iz istih razloga nije dokaz vijabilnosti. Biološka metoda za dokazivanje vijabilnosti (oo)cista parazita jeste biološki ogled koji se sprovodi na laboratorijskim životinjama (često laboratorijskim miševima) i koji se i dalje smatra „zlatnim standardom“; s druge strane postoje i novije metode kao što su *in vitro* (kultura ćelija/tkiva), i molekularne metode (Rousseau et al., 2018). Procena vijabilnosti nije bila predmet ovog istraživanja jer je fokus bila detekcija prisustva (oo)cista, te se ne može sa sigurnošću utvrditi da li postoji rizik po zdravlje ljudi i životinja ili ne u područjima u kojima su paraziti detektovani. Imajući u vidu da nije bilo ekstremnih temperaturnih oscilacija tokom prikupljanja uzoraka, jer je prosečna temperatura vode na lokacijama gde je vršeno uzorkovanje iznosila 11 °C tokom prolećnih meseci, 21 °C tokom letnjih, dok je u jesenjem i zimskom periodu iznosila oko 5 °C, a u sastavu vode nije bilo ni hemikalija koje bi mogle inaktivisati (oo)ciste, očuvana vijabilnost se ne može isključiti (Robertson & Gjerde, 2007; Čatović, 2021). Procena vijabilnosti (oo)cista parazita bi trebalo da čini sastavni deo budućih istraživanja. Ali, procena vijabilnosti upotrebom „zlatnog standarda“ u ovom slučaju nije preporučena jer iziskuje određene tehničke uslove i prostorne kapacitete, a sem toga, imajući u vidu heterogenost uzorka i moguće prisustvo drugih mikroorganizama koji mogu da inficiraju ogledne životinje, procena vijabilnosti bi morala da se zasniva isključivo na *in vitro* metodama.

Ekstrakcija nukleinskih kiselina nakon procedure IMS za *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp., iz uzorka koji praktično predstavlja prečišćene (oo)ciste, ili iz uzorka koji je predstavljao talog nakon filtracije (radi detekcije *T. gondii*), preduslov je za molekularnu detekciju (oo)cista ovih parazita u uzorcima. Ekstrakcija je rađena odgovarajućim komercijalnim kitom namenjenim za uzorke iz spoljašnje sredine (DNeasy PowerSoilKit) i protokolom u kojem se kombinuje upotreba mehaničke sile za destabilizaciju (oo)cista i enzimske digestije (Pearman et al., 2020). PCR amplifikacija odgovarajućih sekvenci za detekciju (oo)cista sve tri vrste urađena je za sve uzorke, nezavisno od rezultata detekcije putem IFA testa. Uzorci iz spoljašnje sredine iz kojih treba da se ekstrahuje eDNK (*environmental* DNK) kao što su zemljište i voda, posebno su interesantni zbog složenosti sastava i male količine DNK ali i zbog mogućih inhibitora bilo endogene bilo egzogene prirode, odnosno nastalih u ekosistemu ili dospelih u njega. Od endogenih inhibitora u vodi je prisutan hlorofil

jednoćelijskih algi kao i humična kiselina, koja potiče iz zemljišta. Humična kiselina je prisutna u velikoj količini i deluje kao inhibitor na nekoliko različitih načina: ometa polimerizaciju, vezuje se za fluorofore i prajmere (Sutlovic et al., 2008; Albers et al., 2013; Sidstedt et al., 2020). Pored inhibitora koji nastaju u ekosistemu problem prilikom PCR amplifikacije mogu da naprave i egzogeni inhibitori čije poreklo je često antropogene prirode (Schrader et al., 2012). Kompleksan sastav filtrata predstavljao je problem zbog mogućnosti inhibicije amplifikacije PCR metodom, koja podrazumeva inhibiciju aktivnosti polimeraze u umnožavanju ciljne DNK (Wilson, 1997). Sem inhibicije reakcije, amplifikacija PCR metodom može biti otežana ukoliko je prilikom ekstrakcije upotrebljena nedovoljna mehanička sila kojom se vrši destabilizacija integriteta omotača (oo)cista ili je liziranje membrana enzimskom digestijom neadekvatno, što je veoma čest problem kod *Cryptosporidium* spp. (Jiang et al., 2005).

Uzorci vode, prema podacima u uputstvu proizvođača, sadrže nižu koncentraciju inhibitora za razliku od komposta i stajskog đubriva, koji su takođe prihvatljive matrice za kit. Mogućnost inhibicije je takođe višestruko umanjena upotrebom IMS za izolaciju (oo)cista *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp., jer je uzorak na taj način još dodatno oslobođen od nečistoća. S obzirom na to da se detekcija *T. gondii* vršila iz prethodno neprečišćenog uzorka (IMS reagensi za izolaciju *T. gondii* oocista nisu komercijalno dostupni) postojala je šansa da dođe do inhibicije. Međutim, komercijalni kit za ekstrakciju nukleinskih kiselina takođe poseduje reagens za uklanjanje određenih inhibitora, stoga je mogućnost inhibicije PCR reakcije umanjena (Amberg et al., 2015; Eichmiller et al., 2016). U ovom istraživanju, pojedini uzorci testirani su dodatkom DNK prečišćenog Herpes virusa foka (PhHV-1), i uspešna amplifikacija određene sekvence u okviru ove DNK poslužila je za validaciju kvaliteta uzorka, tj. kao potvrda da u uzorku nije bilo inhibitora amplifikacije DNK.

Uzrok problema prilikom detekcije DNK *Cryptosporidium* spp. u uzorcima koji je primećen tokom ovog istraživanja verovatno leži u nedovoljnoj količini i kvalitetu ekstrahovane DNK. Na integritet DNK utiču fizičke sile (uključujući elektromagnetno zračenje) i hemikalije (organske i neorganske) koje svojim delovanjem mogu da dovedu do fragmentacije DNK, te su vreme i uslovi čuvanja veoma bitni (Blank & Goodman, 1997). Iako nisu postojali uslovi da uzorci korišćeni u ovom istraživanju do momenta analize budu čuvani u rashladnim vitrinama, oni su skladišteni u tamnoj prostoriji na temperaturi do 10 °C. Istraživanja su pokazala da količina eDNK u uzorku drastično opada već nakon 6h pri sobnoj temperaturi ili na direktnom sunčevom zračenju, dok u nekim slučajevima, nakon 24h pri istim uslovima, eDNK može potpuno da nestane (Curtis et al., 2021). Iz ovih razloga, svaki uzorak vode je u što kraćem roku dopreman u laboratoriju na dalju obradu, a ukoliko nije bilo moguće da se procesiranje završi u istom danu, uzorci su filtrirani i filtrat je čuvan u epruvetama od 50 mL u frižideru na +4 °C. Iako je u uzorku skladištenom na ovaj način degradacija DNK svedena na minimum, vodilo se računa da dalje procesiranje uzorka bude urađeno u što kraćem roku.

Količina DNK u uzorku je prilikom ovog istraživanja predstavljala glavni ograničavajući faktor u detekciji (oo)cista parazita u vodi. Jedna cista *Giardia* spp. u sebi sadrži oko 195 fg DNK, koja uključuje 16 kopija β -*giardin* gena, dok oocista *Cryptosporidium* spp. sadrži oko 40 fg DNK i 4 kopije COWP gena. Repetitivni element dužine 529 bp u genomu *T. gondii* je prema nekim istraživanjima ponovljen između 200-300 puta (Homan et al., 2000; Guy et al., 2003). Imajući u vidu da se broj kopija određenog gena koji se koristi za detekciju drastično razlikuje, osetljivost pojedinih protokola za detekciju putem PCR metodologije takođe se razlikuje, što podrazumeva da je limit detekcije različit. Prema gore navedenim podacima, limit detekcije je najniži za 529 bp repetitivni element (*T. gondii*), zatim za β -*giardin* gen (*Giardia* spp.), dok je najviši za COWP (*Cryptosporidium* spp.). Limit detekcije se odražava u minimalnom broju (oo)cista u uzorku koje su neophodne da bi količina DNK bila dovoljna za amplifikaciju, pri čemu se podrazumeva efikasnost ekstrakcije DNK iz (oo)cista od 100%.

Zbog toga je u ovom istraživanju upotrebljena metoda koncentracije DNK precipitacijom u etanolu sa dodatkom natrijum acetata za sve uzorke koji su ocenjeni kao negativni nakon IFA

protokola i neuspešne amplifikacije DNK sve tri vrste protozoa u uzorku. Koncentrovanje uzoraka nije dovelo do promene prvobitnog rezultata analiza, tj. uzorci koji su prvobitno ocenjeni kao negativni ostali su negativni i dalje.

Prethodno je već pomenuto da su svi uzorci testirani na prisustvo *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. bez obzira na rezultate detekcije IFA metodom. Po protokolu su svi uzorci dalje ekstrahovani i vršena je detekcija PCR metodom. U ovom istraživanju prisustva protozoa u vodi, kao prvom te vrste u Srbiji, korišćen je ovakav pristup dvostrukog testiranja kao neophodan kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da ne postoje lažno negativni ili pozitivni rezultati, iako možda odaje utisak neekonomičnosti.

Ukupan broj uzoraka vode u kojima je detektovano prisustvo *G. intestinalis* IFA ili PCR metodama bio je 17. U osam uzoraka vode detektovane su ciste *G. intestinalis* pomoću obe metode, dok je u devet uzoraka prisustvo cista detektovano samo IFA metodom. Iako nije bilo moguće precizno utvrditi limit detekcije, jer je uzorak podeljen na dva dela pre ekstrakcije gDNK, tako da je jedna celina iskorišćena za IFA dok je druga iskorišćena za PCR metodu, činjenica da je u mnogim uzorcima vizuelno potvrđeno prisustvo malog broja cista (1-4), čak i u slučaju da je kod svih bila prisutna očuvana gDNK, ipak ostavlja mogućnost da ih je bilo nedovoljno za uspešnu detekciju jer nije dostignut potreban minimum (limit) za primenjenu PCR metodu. Negativan rezultat PCR testa u slučajevima pozitivnog nalaza IFA testom može da ukaže na to da u cistama nije bilo sadržaja (sporozoita/jedara), tj. da se antitelo vezalo za omotač (oo)ciste koja nije vijabilna. Druga mogućnost jeste da su sporozoiti/jedra bili prisutni, ali da je DNK bila izuzetno degradirana, iako je vremenski rok od uzorkovanja pa do analiza bio kratak, što takođe može da ukaže na to da (oo)ciste nisu bile vijabilne. Upotreba DAPI, kao što je prethodno pomenuto nije dokaz vijabilnosti, ali u ovom slučaju ne bi bila informativna ni kao potvrda integriteta DNK, te je izuzetno teško proceniti biološki značaj ovih rezultata u kontekstu rizika za zdravlje ljudi i životinja.

Najveći broj uzoraka u kojima je detektovana DNK *G. intestinalis* bio je poreklom iz severozapadne Srbije i Šumadije, u rekama Drini i Velikoj Moravi kao i njihovim pritokama. U Velikoj Moravi su nakon izvršene tipizacije detektovane asemblaže A i B. Obe asemblaže *G. intestinalis* mogu da dovedu do oboljevanja ljudi i životinja tj. imaju zoonotski potencijal (Lalle et al., 2005; Heyworth et al., 2016) a isto tako mogu da dovedu do nastanka hidričnih epidemija (Prystajecy et al., 2015). U zapadnoj Srbiji je takođe detektovana *G. intestinalis* asemblaže B u uzorku prikupljenom iz male reke Lešnice, pritoke Jadra. Objašnjenje za relativno mali broj uzoraka za koje je asemblaža uspešno određena moglo bi da bude mali broj parazita u uzorku, odnosno nedovoljna količina DNK. Sa tom količinom DNK bilo je moguće da se uradi PCR, ali je ona bila nedovoljna za tipizaciju (Kumar et al., 2016). Prema podacima Republičkog zavoda za statistiku, goveda se najviše uzgajaju upravo u delovima Srbije gde je i utvrđeno prisustvo *G. intestinalis* u ovom istraživanju, i to tako da se od ukupnog broja goveda čak 46,2% nalazi u pomenuta dva regiona, dok je ostatak raspoređen po regionima južne i istočne Srbije, Vojvodine i na teritoriji grada Beograda (Anon., 2021). Kao jedan od uzroka kontaminacije vodotokova može se navesti spiranje obradivih površina kontaminiranih cistama parazita u reke. Stepem razvoja poljoprivrede u Srbiji još uvek nije na nivou poljoprivrede razvijenih zapadnoevropskih zemalja zbog prolongirane tranzicije (Đurić, 2018). U Srbiji je i dalje u značajnoj meri prisutan ekstenzivan oblik poljoprivrede i uzgoj domaćih životinja. Ovo znači da su agrotehničke mere iako su značajno napredovale i dalje ispod standarda drugih evropskih zemalja. Obradivo zemljište se u velikoj meri đubri stajskim đubrivom dok se navodnjavanje njiva vrši vodom iz neproverenih izvora koja često nije sanitarno-higijenski ispravna (Maletić et al., 1970; Sl. glasnik br. 85/2014). Svi navedeni razlozi povećavaju mogućnost da dođe do kontaminacije vodotokova/hrane cistama *G. intestinalis*. Interesantno je da ni u jednom uzorku reka koje protiču kroz zapadnu Srbiju i Šumadiju, gde se nalazi najveći broj govedarskih farmi, nije detektovana asemblaža E koja se smatra za asemblažu specifičnu za tu životinjsku vrstu, a koja ujedno i nema zoonotski potencijal. Ovaj rezultat potvrđuje tvrdnju Olson et al. (2004) da goveda zapravo ne predstavljaju rezervoar asemblaža *G. intestinalis* koje su infektivne za ljude. Međutim, tvrdnja da se ljudi mogu inficirati isključivo asemblažama A i B u novije vreme pokazuje se kao netačna, s

obzirom na sve veći broj otkrivenih slučajeva infekcije ljudi drugim asemblažama (Fantinatti et al., 2016; Pipiková et al., 2020). Takođe, moguće je da su obe detektovane asemblaže zapravo poreklom iz kanalizacionih ispusta i da neregulisani problem sa otpadnim vodama u Srbiji u stvari predstavlja rizik i po zdravlje životinja. Neophodna su dodatna istraživanja, poput sekvenciranja i procene vijabilnosti i infektivnosti cista, da bi se ova pretpostavka dokazala.

Prisustvo oocista *Cryptosporidium* spp. utvrđeno je IFA metodom u ukupno osam uzoraka, međutim nakon urađenog PCR, prisustvo DNK ovog parazita nije bilo potvrđeno ni u jednom uzorku. Eksperimentalno je pokazano da je koncentracija od najmanje 200 oocista/mL uzorka neophodna kako bi se uspešno amplifikovale određene DNK sekvence konvencionalnom PCR metodom *Cryptosporidium* spp., odnosno 6 oocista/mL za nested PCR metodu (Díaz-Lee et al., 2015). Na osnovu iznetih podataka može se zaključiti da je postojala mogućnost da je koncentracija oocista u uzorcima bila nedovoljna da bi DNK mogla da bude detektovana; pritom je uzorak nakon koncentrisanja deljen na dva dela, za IFA test i za PCR, što je dodatno umanjilo šansu za molekularnu detekciju. Iako je baš iz razloga mogućeg premalog broja oocista u uzorcima DNK dodatno koncentrisana, to nije dalo željene rezultate. Oociste koje su detektovane IFA metodom mogle su da budu prazne, ili da DNK u njima bude fragmentirana i na taj način nepodesna za PCR što bi za posledicu imalo negativan rezultat. Inhibicija kao potencijalni razlog negativnog nalaza mogla je da bude isključena jer je iz istog uzorka uspešno rađena detekcija *G. intestinalis*.

Imajući u vidu da ne postoji standardizovana metoda za detekciju *Cryptosporidium* spp. putem PCR, tj. da najpodobnija sekvencija i način amplifikacije i dalje nisu usaglašeni, u ovom istraživanju korišćeno je više sekvenci različitih dužina iz kodirajućeg dela genoma, kako bi se povećala šansa za detekciju, što je bilo predmet sličnih istraživanja (Yu et al., 2009; Joseph et al., 2014). Dužina produkata PCR reakcije se kretala od 266 bp pa do oko 800 bp. Ovaj pristup na žalost, takođe nije dao pozitivne rezultate, te je zaključeno da u uzorcima vrlo verovatno nije bilo dovoljno DNK. Merenje koncentracije ciljane DNK nije bilo moguće u ovom slučaju, s obzirom da je, imajući u vidu prirodu uzroka, očekivano prisustvo DNK iz vrlo heterogenih izvora.

Standardizacija i optimizacija PCR metode često je veoma zahtevan posao, a postizanje visokog stepena senzitivnosti reakcije iziskuje posebne napore (Hu et al., 2021). Upotreba nekih aditiva, odnosno pojačivača PCR reakcije, poput DMSO (Musso et al., 2006), BSA (Farell et al., 2012) ili recimo tiola (Bai et al., 2018), mogla bi da povećá šansu za detekciju ovih parazita u uzorcima. Istraživanjima je pokazano da ukoliko su u PCR reakciji korišćeni prajmeri prethodno izmenjeni tiolom, senzitivnost reakcije može da se povećá i do 100 puta. U narednim istraživanjima pažnju treba usmeriti na upotrebu pojačivača PCR reakcije kako bi se lakše prevazišli problemi vezani za malu količinu DNK u uzorku.

Za *T. gondii*, voda je takođe značajan medijum za transmisiju između akvatičnog i terestričnog okruženja, kao i za transmisiju između pravih i prelaznih domaćina (Aramini et al., 1999; Dubey, 2004; Vieira et al., 2015; Shapiro et al., 2019). Ova studija je potvrdila opisani značaj vode kao medijuma i pokazala adekvatnost primene PCR metode. Već je pomenuto da je detekcija *T. gondii* u uzorcima iz spoljašnje sredine, a primarno vode, vremenom napredovala, tako da su se metode koje se ne zasnivaju na biološkom ogledu pokazale kao daleko preciznije i efikasnije (Isaac-Renton et al., 1998; Yang et al., 2009; Dumètre et al., 2012; Wells et al., 2015; Galvani et al., 2019).

Nedostupnost komercijalnog kita za IMS koji bi bio prilagođen detekciji oocista *T. gondii* podstaklo je razvoj različitih metodologija za izolaciju oocista primarno u okviru istraživačkih laboratorija. Lektinska magnetna separacija je metoda koja je razvijena kao zamena za IMS, odnosno kao opcija za izolaciju oocista *T. gondii* iz vode. Lektini predstavljaju grupu proteina koji imaju veoma izražen afinitet prema ugljenim hidratima (Panacer et al., 2019) i baš ta njihova karakteristika iskorišćena je kao osnova za izolaciju oocista. Međutim, metodologija zasnovana na lektinima nije našla širu primenu jer verovatno zahteva upotrebu sofisticiranih eksperimentalnih tehnika za

pripremu reagenasa i odgovarajuće ekspertske osoblje (Harito et al., 2017a; Harito et al., 2017b; Fabian et al., 2021).

U ovom istraživanju prisustvo *T. gondii* oocista u vodi detektovano je konvencionalnom PCR metodom, amplifikacijom dela sekvence 529 bp repetitivnog elementa koji predstavlja ampikon od 86 bp. Uzorci vode prethodno su pripremljeni koncentrisanjem, filtracijom i centrifugiranjem, nakon čega je sledila ekstrakcija DNK, pa potom PCR. Sličan protokol korišćen je i u drugim istraživanjima i pokazao se kao efikasan, tako da je to bio jedan od razloga zašto je korišćen i u ovom istraživanju (Dumètre & Dardé, 2003; Galvani et al., 2019; Haghparast-Kenari et al., 2020).

Četiri uzorka u kojima su detektovane oociste *T. gondii* sakupljena su u zimskom periodu, tj. tri uzorka u decembru 2019. godine i jedan u februaru 2020. godine. Dva uzorka su bila iz reke Drine (Bajina Bašta i Badovinci), a po jedan iz Dunava (Zemun) i Mlave (Petrovac na Mlavi). Prosečna temperatura vazduha u decembru kada je vršeno uzorkovanje nije bila viša od šest stepeni dok je u februaru iznosila osam stepeni. Nekoliko dana pre uzorkovanja u decembru i u februaru, bilo je kišovito. Količina padavina utiče na prisustvo oocista *T. gondii* u vodi imajući u vidu da definitivni domaćini oociste eliminišu na i u zemljište, te je spiranje zemljišta jedini način da se nađu u vodi, dok se (oo)ciste *G. intestinalis* i *Cryptosporidium* spp. mogu naći u površinskim vodama i kao posledica izlivanja kanalizacije (Cacciò et al., 2003; Robertson et al., 2006; Nasser et al., 2012). Dok su kiše doprinele spiranju zemljišta kontaminiranog oocistama sa priobalja reka, hladno i oblačno vreme sprečilo je njihovu degradaciju (Shapiro et al., 2019). Sezonska ispitivanja prisustva oocista u rekama u nekim drugim zemljama potvrdila su da postoji zavisnost između pozitivnih nalaza i godišnjeg doba kao i drugih meteoroloških parametara (Niehaus et al., 2020). Ono što je interesantno jeste da hladno vreme ne pogoduje sporulaciji oocista, tako da nije bilo moguće utvrditi da li su ove oociste bile sporulisane, čak iako su bile vijabilne. Ukoliko nisu bile sporulisane, ovi nalazi ne odražavaju postojanje rizika za zdravlje ljudi i životinja. Jedina metoda za utvrđivanje statusa infektivnosti oociste jeste biološki ogled.

Pozitivan nalaz uzorka vode Dunava i Mlave, oba iz urbane sredine, istakli su potencijalni značaj domaćih mačaka koje se slobodno kreću (vlasničke ili lualice) kao izvora kontaminacije spoljašnje sredine oocistama *T. gondii*, što su i slična istraživanja u drugim zemljama potvrdila (Wilson et al., 2021). Deo obale Dunava u blizini mesta uzorkovanja u Zemunu ima ulogu zimovnika za plovila i mesto je gde se ljudi okupljaju i bave sportskim ribolovom. Prisustvo ostataka hrane, ljudi, kao i mesta koja mogu da posluže kao zaštita od neprijatelja ili nepovoljnog vremena, stvorili su uslove za naseljavanje mačaka lualica. Uzorak iz Petrovca na Mlavi, tačnije lokacija odakle je uzet nalazila se blizu poljoprivrednog gazdinstva, kao i skladišta i manje fabrike za proizvodnju peleta. Ovi objekti takođe mogu da predstavljaju mesta gde postoje izvori hrane i skloništa za domaće mačke. Pokazano je da su gustina ljudske populacije i stepen kontaminacije spoljašnje sredine oocistama *T. gondii* u direktno proporcionalnom odnosu (Lovejoy et al., 2020). Imajući u vidu da je obala Dunava u Zemunu na mestu gde je detektovan pozitivan uzorak gusto naseljena i da je svakodnevna fluktuacija ljudi velika, taj pozitivan nalaz može da bude od značaja za zdravlje ljudi i životinja, iako nije utvrđen status infektivnosti oocista.

Preostala dva uzorka koja su bila pozitivna na *T. gondii* prikupljena su iz reke Drine. Uzorkovanje na lokaciji u blizini sela Badovinci vršeno je na delu rečnog toka gde reka pravi meandre i gde je priobalje uglavnom močvarno zbog čestog plavljenja. Drugi pozitivan uzorak iz ove reke sakupljen je u Bajinoj Bašti u blizini graničnog prelaza. Drina predstavlja najdužu krečnjačku reku Dinarida odnosno Dinarskih Alpa i većinom toka protiče kroz šumske i planinske predele zapadne Srbije (Pivic et al., 2014). Deo je Nacionalnog parka „Drina“ koji se nalazi na teritoriji Bosne i Hercegovine i dom je velikog broja biljnih i životinjskih vrsta. Šume kroz koje Drina protiče predstavljaju stanište za više od 19 vrsta mesojeda, od kojih dve vrste pripadaju porodici mačaka (Felidae), i to balkanski ris (*Lynx lynx*), i evropska divlja mačka (*Felis silvestris silvestris*) (Paunović et al., 2007). Balkanski ris uglavnom naseljava prostore istočne Srbije, međutim, njegovo prisustvo primećeno je i u Nacionalnom parku „Tara“ kroz koji protiče reka Drina. S druge strane, evropska divlja mačka široko

je rasprostranjena na celoj teritoriji Srbije, tako da se njeno prisustvo moglo očekivati i u okolini lokaliteta gde su prikupljeni uzorci vode. Ove životinje su, pored gore pomenutih domaćih mačaka, mogle biti izvor kontaminacije reke oocistama. Drina je kao i Dunav veoma značajna za rekreaciju lokalnog stanovništva, ali i kao turistička atrakcija, zbog splavarenja i regata koje se održavaju tokom leta, tako da nalaz oocista *T. gondii* može predstavljati potencijalnu opasnost po zdravlje ljudi i životinja.

I na kraju, rezultati našeg istraživanja, pionirskog za Srbiju, potvrđuju kontaminiranost akvatičnih ekosistema patogenim protozoama koja nije uslovljena kvalitetom i ekološkom ispravnošću ispitanih vodotokova. Dokazano zagađenje, u čak polovini uzoraka poreklom iz površinskih voda, ukazuje na potrebu hitnog uvođenja redovnog monitoringa naših voda na prisustvo (oo)cista ovih mikroorganizama, zbog očuvanja ispravnosti vode – kako one za vodosnabdevanje, tako i one za rekreaciju stanovništva, a koji bi omogućio preventivno delovanje u slučaju rizika od izbijanja i širenja hidričnih epidemija.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih prvim sistematskim istraživanjem prisustva parazitskih protozoa *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. i *Toxoplasma gondii* u površinskim vodama u Srbiji može se zaključiti sledeće:

1. Novouvedena i standardizovana metodologija za detekciju parazitskih protozoa (filtracijom i imunomagnetnom separacijom za prečišćavanje cista odn. oocista protozoa i kombinacijom imunofluorescencije i molekularne detekcije zasnovane na PCR metodi) pokazala je zadovoljavajuću osetljivost i specifičnost, stoga i primenljivost u budućim sličnim istraživanjima u našoj sredini.
2. Na teritoriji cele zemlje, prisustvo protozoa utvrđeno je u 50% (24/48) ukupnog broja uzoraka u vodotokovima. U rekama iz svih velikih slivova sa teritorije Srbije (Dunav, Drina, Sava, Velika Morava) protozoe su detektovane u barem jednom uzorku.
3. Imunofluorescencijom je detektovano prisustvo *G. intestinalis* u 14 uzoraka (29,2%, 14/48) a *Cryptosporidium* spp. u pet uzoraka (10,4%, 5/48), dok je u tri uzorka (6,25%, 3/48) detektovano prisustvo obe protozoe.
4. PCR metodom detektovana je gDNK *G. intestinalis* u osam uzoraka (16,7%, 8/48), *T. gondii* u četiri uzorka (8,3%, 4/48), dok gDNK *Cryptosporidium* spp. nije detektovana ni u jednom uzorku.
5. Tipizacijom *G. intestinalis* pokazano je prisustvo asemblaže A u jednom uzorku i asemblaže B u dva uzorka, što znači da su u vodama u Srbiji prisutne potencijalno zoonotske asemblaže ovog parazita.
6. Upotrebom qGIS softvera određena je prostorna distribucija protozoa i pokazano je njihovo relativno veće prisustvo u zapadnoj Srbiji, odnosno rekama Drini i Savi i njihovim pritokama, kao i u centralnoj Srbiji, na Velikoj Moravi sa pritokama.
7. Ovo su prvi podaci o stanju kontaminiranosti površinskih voda parazitskim protozoama u Srbiji, koji mogu doprineti razumevanju nastanka i širenja hidričnih epidemija, te time predstavljaju polaznu osnovu za dalja istraživanja, u cilju pripreme i uvođenja plana mera prevencije.

Osim naučnog doprinosa, rezultati ove disertacije imaju i praktičan značaj za javno zdravlje, a posebno treba istaći da čine važan doprinos primeni koncepta „jednog zdravlja“ u našoj sredini.

Literatura

- Adam R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>.
- Albers, C.N., Jensen, A., Bælum, J., Jacobsen, C.S. (2013). Inhibition of DNA polymerases used in Q-PCR by structurally different soil-derived humic substances. *Geomicrobiology Journal*. 2013;30:675–681. <https://doi.org/10.1080/01490451.2012.758193>.
- Ali, R. (2013). Amoebiasis as a major risk to human health: A Review. *International Journal of Molecular Medical Science*. <https://doi.org/10.5376/ijmms.2013.03.0003>.
- Almeria, S., Cinar, H. N., & Dubey, J. P. (2019). *Cyclospora cayetanensis* and Cyclosporiasis: An Update. *Microorganisms*, 7(9), 317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090317>.
- Alum, A., Absar, I. M., Asaad, H., Rubino, J. R., & Ijaz, M. K. (2014). Impact of environmental conditions on the survival of cryptosporidium and giardia on environmental surfaces. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/210385>.
- Amberg, J. J., Grace McCalla, S., Monroe, E., Lance, R., Baerwaldt, K., & Gaikowski, M. P. (2015). Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for Silver Carp. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2015.02.009>.
- Anon. (2021). Broj stoke, stanje 1. decembra 2020. godine. Republički zavod za statistiku Srbije. Retrieved October 28, 2021, from <https://www.stat.gov.rs/sr-latn/vesti/20210212-broj-stoke-stanje-1-decembra-2020-godine/?s=1302>.
- Anon. (2020). Zakon o zaštiti stanovništva od zaraznih bolesti. Službeni glasnik Republike Srbije, br. 15/2016, 68/2020 i 136/2020.
- Aramini, J. J., Stephen, C., Dubey, J. P., Engelstoft, C., Schwantje, H., & Ribble, C. S. (1999). Potential contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and Infection*, 122(2), 305–315. <https://doi.org/10.1017/s0950268899002113>.
- Atwill, E. R., Tate, K. W., Pereira, M. D., Bartolome, J., & Nader, G. (2006). Efficacy of natural grassland buffers for removal of *Cryptosporidium parvum* in rangeland runoff. *Journal of Food Protection*, 69(1), 177–184. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.1.177>.
- Bai, Y., Xiao, Y., Suo, Y., Shen, Y., Shao, Y., Zhang, D., & Zhou, C. (2018). Enhancement of PCR Sensitivity and Yield Using Thiol-modified Primers. *Scientific Reports*, 8(1), 14858. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33223-2>.
- Baldursson, S., & Karanis, P. (2011). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research*, 45(20), 6603–6614. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.013>.
- Barr F. (1997). Cryptosporidiosis. *The Journal of Small Animal Practice*, 38(7), 319–320. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1997.tb03475.x>.
- Bartelt, L. A., & Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Reports*, 7, 62. <https://doi.org/10.12703/P7-62>.

- Beser, J., Bujila, I., Wittesjö, B., & Lebbad, M. (2020). From mice to men: Three cases of human infection with *Cryptosporidium ditrichi*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 78, 104120. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104120>.
- Betancourt, W. (2019). *Cryptosporidium* spp. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (R. Fayer and W. Jakubowski (eds), Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 3: Protists), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.33>.
- Blank, M., & Goodman, R. (1997). Do electromagnetic fields interact directly with DNA?. *Bioelectromagnetics*, 18(2), 111–115. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-186x\(1997\)18:2<111::aid-bem3>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-186x(1997)18:2<111::aid-bem3>3.0.co;2-5).
- Boarato-David, E., Guimarães, S., and Cacciò, S. (2017). *Giardia duodenalis*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (eds), *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (R. Fayer and W. Jakubowski (eds), Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 3: Protists), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.35>.
- Bobić, B., Nikolic, A. & Djurkovic-Djakovic, O. (2003). Identification of risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in Serbia as a basis of a program for prevention of congenital toxoplasmosis. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, 131(3-4), 162–167. <https://doi.org/10.2298/sarh0304162b>.
- Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I., & Djurković–Djaković, O. (2011). Kinetics of toxoplasma infection in the Balkans. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 123(S1), 2–6. <https://doi.org/10.1007/s00508-011-0052-6>.
- Borchardt, M. A., Bradbury, K. R., Gotkowitz, M. B., Cherry, J. A., & Parker, B. L. (2007). Human enteric viruses in groundwater from a confined Bedrock Aquifer. *Environmental Science and Technology*, 41(18), 6606–6612. <https://doi.org/10.1021/es071110>.
- Borowski, H., Clode, P. L., & Thompson, R. C. (2008). Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 24(11), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.08.002>.
- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D., & Hunter, P. R. (2015). The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4), 181–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.011>.
- Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H., Isaac-Renton, J. L., Bell, A., Eng, S. B., & Marion, S. A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet (London, England)*, 350(9072), 173–177. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)11105-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)11105-3).
- Brankston, G., Boughen, C., Ng, V., Fisman, D. N., Sargeant, J. M., & Greer, A. L. (2018). Assessing the impact of environmental exposures and *Cryptosporidium* infection in cattle on human

- incidence of cryptosporidiosis in Southwestern Ontario, Canada. *PloS one*, 13(4), e0196573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196573>.
- Bridle, H. (2014). Overview of Waterborne Pathogens. In *Waterborne Pathogens Detection Methods and Applications Elsevier / Academic Press, London*, pp. 9–40. Retrieved from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444595430000025>.
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00068-1).
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., Aulicino, F. A., & Pozio, E. (2003). *Giardia* cysts in wastewater treatment plants in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3393–3398. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3393-3398.2003>.
- Cama, V. A., Ross, J. M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Navincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R. H., Bern, C., & Xiao, L. (2007). Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(5), 684–691. <https://doi.org/10.1086/519842>.
- Carreno, R. A., Martin, D. S., & Barta, J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85(11), 899–904. <https://doi.org/10.1007/s004360050655>.
- Cavalier-Smith, T. (2003). Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology*, 39(4), 338–348. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00002>.
- Cavalier-Smith T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50(5), 472–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2014.07.002>.
- Chalmers R. M. (2012). Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 48(4), 429–446. https://doi.org/10.4415/ANN_12_04_10.
- Chalmers, R. M., & Davies, A. P. (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1), 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.003>.
- Chappell, C. L., Okhuysen, P. C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D. E., Tanriverdi, S., & Tzipori, S. (2006). *Cryptosporidium hominis*: experimental challenge of healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), 851–857.
- Checkley, W., White, A. C., Jr, Jaganath, D., Arrowood, M. J., Chalmers, R. M., Chen, X. M., Fayer, R., Griffiths, J. K., Guerrant, R. L., Hedstrom, L., Huston, C. D., Kotloff, K. L., Kang, G., Mead, J. R., Miller, M., Petri, W. A., Jr, Priest, J. W., Roos, D. S., Striepen, B., Thompson, R. C., ... Houpt, E. R. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet. Infectious diseases*, 15(1), 85–94. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70772-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70772-8).
- Collinet-Adler, S., & Ward, H. D. (2010). Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic, and preventive challenges. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official

- publication of the European Society of Clinical Microbiology, 29(8), 927–935. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-0960-9>.
- Cook, A. J., Gilbert, R. E., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E., & Dunn, D. T. (2000). Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7254), 142–147. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>.
- Cotruvo, J. A. (2004). Waterborne Zoonoses: Identification, causes, and control. WHO. World Health organization. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9241562730>.
- Cotton, J. A., Amat, C. B., & Buret, A. G. (2015). Disruptions of host immunity and inflammation by *Giardia duodenalis*: Potential consequences for co-infections in the gastro-intestinal tract. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 4(4), 764–792. <https://doi.org/10.3390/pathogens4040764>.
- Cox F. E. (2002). Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends in Parasitology*, 18(3), 108. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02196-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02196-1),
- Curtis, A.N., Larson, E.R. & Davis, M.A. Field storage of water samples affects measured environmental DNA concentration and detection. *Limnology* 22, 1–4 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10201-020-00634-y>.
- Ćatović, S. (2021). (rep.). Hidrološki godišnjak 1. Površinske vode. Retrieved from http://www.hidmet.gov.rs/data/hidro_pov_godisnjaci/2020.pdf.
- Ćirković, V., Uzelac, A., Milčić, D., Klun, I., & Đurković-Đaković, O. (2020). First detection of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) in river waters in Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica*. Retrieved November 8, 2021, from <http://rimi.imi.bg.ac.rs/handle/123456789/1009>.
- Ćirković, V., Klun, I., Utaaker, K. S., Uzelac, A., Tysnes, K. R., Robertson, L. J., & Djurković-Djaković, O. (2020). Surface waters as a potential source of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Serbia. *Experimental Parasitology*, 209, 107824. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107824>
- Davidson, M. G., Rottman, J. B., English, R. V., Lappin, M. R., & Tompkins, M. B. (1993). Feline immunodeficiency virus predisposes cats to acute generalized toxoplasmosis. *The American Journal of Pathology*, 143(5), 1486–1497.
- Degefu, D. M., Weijun, H., Zaiyi, L., Liang, Y., Zhengwei, H., & Min, A. (2018). Mapping monthly water scarcity in global transboundary basins at country-basin mesh based spatial resolution. *Scientific Reports*, 8(1), 2144. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20032-w>.
- Díaz-Lee, A., Molina, R., Dougnac, C., Mercado, R., Retamal, P., & Fredes, F. (2015). Analytical sensitivity of staining and molecular techniques for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts isolated from bovines in water samples: A preliminary study. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(1), 91–96. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2015000100015>.
- Dixon B. R. (2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals - Transmission and disease. *Research in Veterinary Science*, 135, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.09.034>.
- Djurković-Djaković, O., Dupouy-Camet, J., Van der Giessen, J., & Dubey, J. P. (2019). Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00054. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054>.

- Dorner, S. M., Huck, P. M., & Slawson, R. M. (2004). Estimating potential environmental loadings of *Cryptosporidium* spp. and *Campylobacter* spp. from livestock in the Grand River Watershed, Ontario, Canada. *Environmental Science & Technology*, 38(12), 3370–3380. <https://doi.org/10.1021/es035208+>.
- Dsalaberri@bioazul.com. (2019, January 1). Reclaimed Water for Agricultural Irrigation Systems. Suwanu. Retrieved February 10, 2022, from <https://suwanu-europe.eu/>.
- Dubey J. P. (1998a). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1019–1024. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00023-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00023-x).
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998b). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>.
- Dubey J. P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.005>.
- Dubey J. P. (2008). The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55(6), 467–475. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>.
- Dubey, J. P. (2001). Oocyst Shedding by Cats Fed Isolated Bradyzoites and Comparison of Infectivity of Bradyzoites of the VEG Strain *Toxoplasma gondii* to Cats and Mice. *The Journal of Parasitology*, 87(1), 215–219. <https://doi.org/10.2307/3285204>.
- Dubey, J. P. (2021). *Toxoplasmosis of Animals and Humans (Third edition)*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 564 pp. ISBN 9780367543129
- Dubey and C. P. Beattie *Toxoplasmosis of Animals and Man*. By J. P. 220 pages. ISBN 0 8493 4618 5. CRC Press, Boca Raton, 1988. £108.00. (1990). *Parasitology*, 100(3), 500-501. <https://doi:10.1017/S0031182000078914>.
- Dumètre, A., & Dardé, M. L. (2003). How to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples?. *FEMS microbiology reviews*, 27(5), 651–661. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00071-8).
- Dumètre, A., Aubert, D., Puech, P. H., Hohweyer, J., Azas, N., & Villena, I. (2012). Interaction forces drive the environmental transmission of pathogenic protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 905–912. <https://doi.org/10.1128/AEM.06488-11>.
- Đurić, K. (2018). *Poljoprivreda i ruralni Razvoj Srbije u procesu evropskih integracija*. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad. Retrieved October 28, 2021, from http://polj.uns.ac.rs/sites/default/files/udzbenici/Poljoprivreda_i_ruralni_razvoj_Srbije_u_procesu_evropskih_integracija_2018.pdf.
- Eckmann, L. (2003). Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunology*, 25(5), 259–270. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00634.x>.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 19(12): 6971, 324 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>.

- Efstratiou, A., Ongerth, J. E., & Karanis, P. (2017a). Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks - An update 2011-2016. *Water Research*, 114, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.036>.
- Efstratiou, A., Ongerth, J., & Karanis, P. (2017b). Evolution of monitoring for *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Water Research*, 123, 96–112. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.042>.
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M., & Sorensen, P. W. (2016). Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 56–68. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12421>.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svärd, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>.
- Elwin, K., Chalmers, R. M., Roberts, R., Guy, E. C., & Casemore, D. P. (2001). Modification of a rapid method for the identification of gene-specific polymorphisms in *Cryptosporidium parvum* and its application to clinical and epidemiological investigations. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12), 5581–5584. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5581-5584.2001>.
- Elwin, K., Hadfield, S. J., Robinson, G., & Chalmers, R. M. (2012). The epidemiology of sporadic human infections with unusual *Cryptosporidia* detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. *Epidemiology and Infection*, 140(4), 673–683. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000860>.
- Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Schupp, D. E., Shields, J. M., Jarroll, E. L., Sauch, J. F., & Pawley, J. B. (1990). High-resolution immunogold localization of *Giardia* cyst wall antigens using field emission SEM with secondary and backscatter electron imaging. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 38(5), 625–632. <https://doi.org/10.1177/38.5.2332623>.
- Essack S. Y. (2018). Environment: the neglected component of the One Health triad. *The Lancet. Planetary health*, 2(6), e238–e239. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30124-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30124-4).
- European Environment Agency, 2010a, 'Water resources: quantity and flows — SOER 2010 thematic assessment', in: *The European environment — state and outlook 2010, State of the environment report*, European Environment Agency. Retrieved from: <https://www.eea.europa.eu/soer/2010/europe/understanding-climate-change>.
- European Environment Agency, 2010b, 'Adapting to climate change — SOER 2010 thematic assessment' (<http://www.eea.europa.eu/soer/2010/europe/adapting-to-climate-change>) in: *The European environment — state and outlook report 2010, State of the environment report No 1/2010*.
- European Environment Agency. (2009). (rep.). *Water resources across Europe — confronting water scarcity and drought*. Retrieved from <https://www.eea.europa.eu/publications/water-resources-across-europe>.
- European Environment Agency. (2012). *Towards efficient use of water resources in Europe*. EEA Report No. 1/2012. ISSN 1725-9177. Retrieved from: https://www.eea.europa.eu/publications/towards-efficient-use-of-water/at_download/file.

- Fabian, B. T., Lepenies, B., Schares, G., Dubey, J. P., Spano, F., & Seeber, F. (2021). Expanding the Known Repertoire of C-Type Lectin Receptors Binding to *Toxoplasma gondii* Oocysts Using a Modified High-Resolution Immunofluorescence Assay. *mSphere*, 6(2), e01341-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01341-20>.
- Fantinatti, M., Bello, A. R., Fernandes, O., & Da-Cruz, A. M. (2016). Identification of *Giardia lamblia* Assemblage E in Humans Points to a New Anthroponotic Cycle. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(8), 1256–1259. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw361>.
- Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, 5, 257. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>.
- Fayer, R. (1994). Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2732–2735. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2732-2735.1994>.
- Fayer, R., & Nerad, T. (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology*, 62(4), 1431–1433. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1431-1433.1996>.
- Fayer, R., & Santín, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.011>.
- Fenchel, T. (1987). Ecology of protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists. Science Tech. Retrieved from <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-06817-5>.
- Feng, Y. Y., Ong, S. L., Hu, J. Y., Song, L. F., Tan, X. L., & Ng, W. J. (2003). Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1898–1903. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1898-1903.2003>.
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>.
- Feng, Y., Ryan, U. M., & Xiao, L. (2018). Genetic Diversity and Population Structure of *Cryptosporidium*. *Trends in Parasitology*, 34(11), 997–1011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.009>.
- Frenkel, J. K., Dubey, J. P., & Miller, N. L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 167(3919), 893–896. <https://doi.org/10.1126/science.167.3919.893>.
- Gain, A.K., Wada, Y. Assessment of Future Water Scarcity at Different Spatial and Temporal Scales of the Brahmaputra River Basin. *Water Resource Management* 28, 999–1012 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11269-014-0530-5>.
- Galvani, A.T., Christ, A.P.G., Padula, J.A. et al. Real-time PCR detection of *Toxoplasma gondii* in surface water samples in São Paulo, Brazil. *Parasitol Research* 118, 631–640 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6185-z>.

- Garcia, L. S., Arrowood, M., Kokoskin, E., Paltridge, G. P., Pillai, D. R., Procop, G. W., Ryan, N., Shimizu, R. Y., & Visvesvara, G. (2017). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00025-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-17>.
- Global Agriculture. 2016. Agriculture at a crossroads: findings and recommendations for future farming: water. <https://www.globalagriculture.org/report-topics/water.html>.
- Guy, R. A., Payment, P., Krull, U. J., & Horgen, P. A. (2003). Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5178–5185. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5178-5185.2003>.
- Gvozdenović, E., Mitrovic, N., Dakic, Z., Stojkovic-Svrtlih, N., & Dulovic, O. (2012). Family outbreak of cryptosporidiosis in Serbia: Case report. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 140(9-10), 653–657. <https://doi.org/10.2298/sarh1210653g>.
- Hachich, E. M., Galvani, A. T., Padula, J. A., Stoppe, N. C., Garcia, S. C., Bonanno, V. M., Barbosa, M. R., & Sato, M. I. (2013). Pathogenic parasites and enteroviruses in wastewater: support for a regulation on water reuse. *Water science and technology : a Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 67(7), 1512–1518. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.019>.
- Hagharast-Kenari, B., Sarvi, S., Sharif, M., Ahmadpour, E., Hosseini, S. A., & Daryani, A. (2020). Isolation and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* based on GRA6 gene from environmental soil samples in Mazandaran Province, north of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i2.3297>
- Harito, J. B., Campbell, A. T., Tysnes, K. R., & Robertson, L. J. (2017a). Use of lectin-magnetic separation (LMS) for detecting *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental water samples. *Water Research*, 127, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.012>.
- Harito, J. B., Campbell, A. T., Tysnes, K. R., Dubey, J. P., & Robertson, L. J. (2017b). Lectin-magnetic separation (LMS) for isolation of *Toxoplasma gondii* oocysts from concentrated water samples prior to detection by microscopy or qPCR. *Water Research*, 114, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.044>.
- Hartmann, K., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hosie, M. J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U., & Horzinek, M. C. (2013). *Toxoplasma gondii* infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(7), 631–637. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489228>.
- Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R., & Rose, J. B. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 3163–3170. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005>.
- Hemphill, A., Müller, N., & Müller, J. (2019). Comparative Pathobiology of the Intestinal Protozoan Parasites *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium parvum*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 8(3), 116. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030116>.

- Heyworth M. F. (2016). *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite* (Paris, France), 23, 13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016013>.
- Hill, D., & Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8(10), 634–640. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>.
- Hillman, A., Ash, A., Elliot, A., Lymbery, A., Perez, C., & Thompson, R. (2016). Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isodon obesulus*). *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 5(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.002>.
- Hoekstra, A. Y., Mekonnen, M. M., Chapagain, A. K., Mathews, R. E., & Richter, B. D. (2012). Global monthly water scarcity: blue water footprints versus blue water availability. *PloS one*, 7(2), e32688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032688>.
- Holberton D. V. (1973). Fine structure of the ventral disk apparatus and the mechanism of attachment in the flagellate *Giardia muris*. *Journal of Cell Science*, 13(1), 11–41.
- Homan, W. L., Vercammen, M., De Braekeleer, J., & Verschueren, H. (2000). Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *International journal for parasitology*, 30(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00170-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00170-8).
- Hu, B., , Wang, Y., , Li, N., , Zhang, S., , Luo, G., , & Huang, Z., (2021). Highly convenient and highly specific-and-sensitive PCR using Se-atom modified dNTPs. *Chemical Communications* (Cambridge, England), 57(1), 57–60. <https://doi.org/10.1039/d0cc06172g>.
- Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Work, K., & Siim, J. C. (1971). The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(3), 380–399. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90018-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90018-6).
- Hunter, P. R., & Nichols, G. (2002). Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(1), 145–154. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.145-154.2002>.
- Hunter, P. R., Hughes, S., Woodhouse, S., Syed, Q., Verlander, N. Q., Chalmers, R. M., Morgan, K., Nichols, G., Beeching, N., & Osborn, K. (2004). Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7), 1241–1249. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030582>.
- Ioanita, M., Nagavciuc, V., Kumar, R., & Rakovec, O. (2020). On The curious case of the recent decade, mid-spring precipitation deficit in Central Europe. *Npj Climate and Atmospheric Science*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41612-020-00153-8>.
- Isaac-Renton, J., Bowie, W. R., King, A., Irwin, G. S., Ong, C. S., Fung, C. P., Shokeir, M. O., & Dubey, J. P. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2278–2280. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2278-2280.1998>.

- ISO (International Organization for Standardization) ISO Standard 15553:2006 Water Quality— Isolation and Identification of *Cryptosporidium* Oocysts and *Giardia* Cysts from Water International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland (2006)
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Singh, A., & Xiao, L. (2005). Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1135–1141. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1135-1141.2005>.
- Johansen, Ø. H., Hanevik, K., Thrana, F., Carlson, A., Stachurska-Hagen, T., Skaare, D., & Robertson, L. J. (2015). Symptomatic and asymptomatic secondary transmission of *Cryptosporidium parvum* following two related outbreaks in schoolchildren. *Epidemiology and Infection*, 143(8), 1702–1709. <https://doi.org/10.1017/S095026881400243X>.
- Jones, J. L., & Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis--recent developments. *Experimental Parasitology*, 124(1), 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.013>.
- Joseph, A., Moss, John Gordy, Richard A. Snyder, "Effective Concentration and Detection of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and the *Microsporidia* from Environmental Matrices", *Journal of Pathogens*, vol. 2014, Article ID 408204, 10 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/408204>.
- Jovanović, V. (Ed.). (2021). (rep.). Godišnji izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2019. godinu. Retrieved February 3, 2022, from <https://www.batut.org.rs/index.php?content=2241>.
- Jun-Yang Ma, Man-Yao Li, Ze-Zheng Qi, Ming Fu, Tian-Feng Sun, Hany M. Elsheikha, Wei Cong. (2022). Waterborne protozoan outbreaks: An update on the Global, regional, and national prevalence from 2017 to 2020 and sources of contamination. *Science of the Total Environment*, 806, 150562. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150562>.
- Karanis, P., Aldeyarbi, H. M., Mirhashemi, M. E., & Khalil, K. M. (2013). The impact of the waterborne transmission of *Toxoplasma gondii* and analysis efforts for water detection: an overview and update. *Environmental Science and Pollution Research International*, 20(1), 86–99. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1177-5>.
- Kaplan, B., Kahn, L.H., Monath, T.P., Woodal, J. 'ONE HEALTH' and parasitology. *Parasites Vectors* 2, 36 (2009). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-36>.
- van Keulen, H., Macechko, P. T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P. M., & Erlandsen, S. L. (2002). Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 108(2), 97–107. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00181-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00181-4).
- Khalil, I. A., Troeger, C., Rao, P. C., Blacker, B. F., Brown, A., Brewer, T. G., Colombara, D. V., De Hostos, E. L., Engmann, C., Guerrant, R. L., Haque, R., Houpt, E. R., Kang, G., Korpe, P. S., Kotloff, K. L., Lima, A., Petri, W. A., Jr, Platts-Mills, J. A., Shoultz, D. A., Forouzanfar, M. H., ... Mokdad, A. H. (2018). Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study. *The Lancet. Global health*, 6(7), e758–e768. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30283-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30283-3).
- Kifleyohannes, T., & Robertson, L. J. (2020). Preliminary insights regarding water as a transmission vehicle for *Cryptosporidium* and *Giardia* in Tigray, Ethiopia. *Food and Waterborne Parasitology*, 19, e00073. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00073>.

- King, B. J., Keegan, A. R., Monis, P. T., & Saint, C. P. (2005). Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3848–3857. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3848-3857.2005>.
- Kitajima, M., Haramoto, E., Iker, B. C., & Gerba, C. P. (2014). Occurrence of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in influent and effluent water at wastewater treatment plants in Arizona. *The Science of the Total Environment*, 484, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.036>.
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S., Zaidi, A. K., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., ... Levine, M. M. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet (London, England)*, 382(9888), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60844-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60844-2).
- Kumar, T., Abd Majid, M. A., Onichandran, S., Jaturas, N., Andiappan, H., Salibay, C. C., Tabo, H. A., Tabo, N., Dungca, J. Z., Tangpong, J., Phiriyasamith, S., Yuttayong, B., Polseela, R., Do, B. N., Sawangjaroen, N., Tan, T. C., Lim, Y. A., & Nissapatorn, V. (2016). Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infectious Diseases of Poverty*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0095-z>.
- Kváč, M., Saková, K., Květoňová, D., Kicia, M., Wesołowska, M., McEvoy, J., & Sak, B. (2014). Gastroenteritis caused by the *Cryptosporidium* hedgehog genotype in an immunocompetent man. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 347–349. <https://doi.org/10.1128/JCM.02456-13>.
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Cacciò, S.M. (2005). Genetic heterogeneity at the β -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology* 35 (2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>.
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., & Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PloS One*, 8(9), e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal for Parasitology*, 40(9), 1063–1074. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.015>.
- Leitch, G. J., & He, Q. (2012). Cryptosporidiosis-an overview. *Journal of Biomedical Research*, 25(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60001-8](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60001-8).
- Lélu, M., Villena, I., Dardé, M. L., Aubert, D., Geers, R., Dupuis, E., Marnef, F., Poulle, M. L., Gotteland, C., Dumètre, A., & Gilot-Fromont, E. (2012). Quantitative estimation of the viability of *Toxoplasma gondii* oocysts in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5127–5132. <https://doi.org/10.1128/AEM.00246-12>.

- Li, Y., Wang, M., Chen, X., Cui, S., Hofstra, N., Kroeze, C., Ma, L., Xu, W., Zhang, Q., Zhang, F., Stokal, M. (2021). Multi-pollutant assessment of river pollution from livestock production worldwide. *Water Research*, 117906. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117906>.
- Lorenzo-Lorenzo, M. J., Ares-Mazas, M. E., Villacorta-Martinez de Maturana, I., & Duran-Oreiro, D. (1993). Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 79(1), 67–70.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J. K., Cama, V. A., Xiao, L., & Bowman, D. D. (2010). Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trends in Parasitology*, 26(4), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.004>.
- Lyu, Z., Shao, J., Xue, M., Ye, Q., Chen, B., Qin, Y., & Wen, J. (2018). A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcocystidophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasites & Vectors*, 11(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2786-8>.
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., Kazmierczak, J. J., Addiss, D. G., Fox, K. R., & Rose, J. B. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine*, 331(3), 161–167. <https://doi.org/10.1056/NEJM199407213310304>.
- Madireddy S, Rivas Chacon ED, Mangat R. Toxoplasmosis. [Updated 2021 Sep 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563286/>.
- Magana-Arachchi, D. N., & Wanigatunge, R. P. (2020). Ubiquitous waterborne pathogens. *Waterborne Pathogens*, 15–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818783-8.00002-5>.
- Maletić, R., & Popović, B. (1970, January 1). Production capacity of family farms in Serbia and EU countries. *Teme - Časopis za Društvene Nauke*. Retrieved October 28, 2021, from <https://www.ceeol.com/search/article-detail?id=441019>.
- Markland, S. M., Ingram, D., Kniel, K. E., & Sharma, M. (2017). Water for Agriculture: the Convergence of Sustainability and Safety. *Microbiology spectrum*, 5(3), 10.1128/microbiolspec.PFS-0014-2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PFS-0014-2016>.
- Mateo, M., Mateo, M., Montoya, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2014). Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine*, 93(15), e75. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000075>.
- Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L., & Chilton, N. B. (1995). Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, 111 (Pt 1), 11–17. <https://doi.org/10.1017/s0031182000064556>.
- Mbae, C. K., Nokes, D. J., Mulinge, E., Nyambura, J., Waruru, A., & Kariuki, S. (2013). Intestinal parasitic infections in children presenting with diarrhoea in outpatient and inpatient settings in an informal settlement of Nairobi, Kenya. *BMC Infectious Diseases*, 13, 243. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-243>.

- McBride, G. B., Stott, R., Miller, W., Bambic, D., & Wuertz, S. (2013). Discharge-based QMRA for estimation of public health risks from exposure to stormwater-borne pathogens in recreational waters in the United States. *Water Research*, 47(14), 5282–5297. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.001>.
- Meng, T. C., Aley, S. B., Svard, S. G., Smith, M. W., Huang, B., Kim, J., & Gillin, F. D. (1996). Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 79(1), 103–108. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02636-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02636-9).
- Meyer, W. T. (1973). Epidemic giardiasis. A continued elusive entity. *Rocky Mountain Medical Journal*, 70(10), 48-49.
- Miladinović Tasić, N. Dijagnostički i epidemiološki aspekti prisustva protozoa *Giardia lamblia* u digestivnom traktu. [disertacija]. Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu, Niš. 2006
- Miladinović Tasić, N., Tasić, S., Kranjčić-Zec, I., Tasić, G., Tasić, A. Asymptomatic giardiasis - more prevalent in refugees than in native inhabitants of the city of Nis, Serbia. *Cent Eur J Med*. 2008;3(2):203-6. <https://doi.org/10.2478/s11536-008-0013-2>.
- Miladinović Tasić, N., Tasić, S., Tasić, A., Zdravković, D., Đorđević, J., Micić, T. Advantages of enzyme immunoassay in diagnosing lambliosis of population under sanitary supervision. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2010;27(1):33-7.
- Miladinovic-Tasic, N., Đorđević, N., Zdravković, D., Tasic, A. Prevalence of giardiasis in asymptomatic individuals in the territory of the city of Nis. *Acta Medica Medianae*, 2017; 56 (3):48-54.
- Montazeri, M., Mikaeili Galeh, T., Moosazadeh, M., Sarvi, S., Dodangeh, S., Javidnia, J., Sharif, M., & Daryani, A. (2020). The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 13(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3954-1>.
- Montoya, J. G., & Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* (London, England), 363(9425), 1965–1976. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).
- Moreira, N. A., & Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health*, 15(1), 83–96. <https://doi.org/10.2166/wh.2016.103>.
- Morgan, U. M., Constantine, C. C., Greene, W. K., & Thompson, R. C. (1993). RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), 702–705. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90303-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90303-8).
- Morgan, U. M., Monis, P. T., Xiao, L., Limor, J., Sulaiman, I., Raidal, S., O'Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B. L., Lal, A. A., & Thompson, R. C. (2001). Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *International Journal for Parasitology*, 31(3), 289–296. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00164-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00164-8).
- Morrison, H. G., McArthur, A. G., Gillin, F. D., Aley, S. B., Adam, R. D., Olsen, G. J., Best, A. A., Cande, W. Z., Chen, F., Cipriano, M. J., Davids, B. J., Dawson, S. C., Elmendorf, H. G., Hehl, A. B., Holder, M. E., Huse, S. M., Kim, U. U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., ... Sogin, M. L. (2007). Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia*

- lamblia*. Science (New York, N.Y.), 317(5846), 1921–1926. <https://doi.org/10.1126/science.1143837>.
- Moss, J. A., Gordy, J., & Snyder, R. A. (2014). Effective concentration and detection of cryptosporidium, giardia, and the microsporidia from environmental matrices. *Journal of pathogens*, 2014, 408204. <https://doi.org/10.1155/2014/408204>.
- Musso, M., Bocciardi, R., Parodi, S., Ravazzolo, R., & Ceccherini, I. (2006). Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 8(5), 544–550. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.060058>.
- Nasser, A. M., Vaizel-Ohayon, D., Aharoni, A., & Revhun, M. (2012). Prevalence and fate of *Giardia* cysts in wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 477–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05335.x>.
- The National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. (n.d.). *Giardia*. Retrieved January 28, 2022, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/5740/>.
- Navin, T. R., & Juranek, D. D. (1984). Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(3), 313–327. <https://doi.org/10.1093/clinids/6.3.313>.
- Nennich, T. D., Harrison, J. H., VanWieringen, L. M., Meyer, D., Heinrichs, A. J., Weiss, W. P., St-Pierre, N. R., Kincaid, R. L., Davidson, D. L., & Block, E. (2005). Prediction of manure and nutrient excretion from dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3721–3733. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73058-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73058-7).
- Nicolle, C., & Manceaux, L. H. (1908). Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de L'Académie des Sciences*, 147(17), 763–766.
- Nicolle, C., & Manceaux, L. H. (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi (*Toxoplasma* n. gen.). *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 2, 97-103.
- Niehaus, C., Spínola, M., Su, C., Rojas, N., Rico-Chávez, O., Ibarra-Cerdeña, C. N., Foley, J., Suzán, G., Gutiérrez-Espeleta, G. A., & Chaves, A. (2020). Environmental factors associated With *Toxoplasma gondii* Exposure in Neotropical Primates of Costa Rica. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 583032. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.583032>.
- Nikolić, A., Dimitrijević, S., Đurković-Đaković, O., Bobić, B., & Maksimović-Mihajlović, O. (2002). Giardiasis in dogs and cats in the Belgrade area. *Acta Veterinaria-Beograd*, 52(1), 43-48. <https://doi.org/10.2298/AVB0201043>.
- Nikolić, A., Bobić, B., Katić-Radivojević, S., Klun, I., & Đurković-Đaković, O. (2004). *Giardia* Infection in Humans and Pets in Serbia. In: *Multidisciplinary for Parasites, Vectors & Parasitic Diseases*, Vol 2 Medimond Publishing Co, Bologna., 179-182.
- Nygård, K., Schimmer, B., Søbstad, Ø., Walde, A., Tveit, I., Langeland, N., Hausken, T., & Aavitsland, P. (2006). A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health*, 6, 141. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-6-141>.

- Oki, T., & Kanae, S. (2006). Global hydrological cycles and world water resources. *Science* (New York, N.Y.), 313(5790), 1068–1072. <https://doi.org/10.1126/science.1128845>.
- Olson, M. E., O'Handley, R. M., Ralston, B. J., McAllister, T. A., & Thompson, R. C. (2004). Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 20(4), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.01.015>,
- Ongerth, J.E., Plutzer, J., Karanis, P. (2018). *Cryptosporidium* and *Giardia* – levels and distribution in surface water throughout Europe.. *Proceedings* 2, 690. <https://doi.org/10.3390/proceedings2110690>.
- Organization for Economic Co-operation and Development. 2008. Environmental performance of agriculture in OECD countries since 1990. https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=ENVPERFINDIC_TAD_2008.
- Paget, T. A., Jarroll, E. L., Manning, P., Lindmark, D. G., & Lloyd, D. (1989). Respiration in the cysts and trophozoites of *Giardia muris*. *Journal of General Microbiology*, 135(1), 145–154. <https://doi.org/10.1099/00221287-135-1-145>.
- Panacer, K., & Whorwell, P. J. (2019). Dietary Lectin exclusion: The next big food trend?. *World Journal of Gastroenterology*, 25(24), 2973–2976. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i24.2973>.
- Paraud, C., & Chartier, C. (2012). Cryptosporidiosis in small ruminants. *Small ruminant research : the Journal of the International Goat Association*, 103(1), 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.023>.
- Patel, C. B., Shanker, R., Gupta, V. K., & Upadhyay, R. S. (2016). Q-PCR based culture-independent enumeration and detection of enterobacter: an emerging environmental human pathogen in riverine systems and potable water. *Frontiers in Microbiology*, 7, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00172>.
- Paunović, M., Čirović, D., & Milenković, M. (2007). Status, management and conservation of large carnivores in Serbia. In *Coexistence of Large Carnivores and Humans: Threat or Benefit?* (pp. 111–117). Belgrade; CIC. Retrieved from https://www.academia.edu/16797772/Status_Management_and_Conservation_of_Large_Carnivores_in_Serbia.
- Pearman, J. K., Keeley, N. B., Wood, S. A., Laroche, O., Zaiko, A., Thomson-Laing, G., Biessy, L., Atalah, J., & Pochon, X. (2020). Comparing sediment DNA extraction methods for assessing organic enrichment associated with marine aquaculture. *PeerJ*, 8, e10231. <https://doi.org/10.7717/peerj.10231>.
- Piekara-Stępińska, A., Piekarska, J., Gorczykowski, M., & Bania, J. (2021). Genotypes of *Giardia duodenalis* in Household Dogs and Cats from Poland. *Acta Parasitologica*, 66(2), 428–435. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00292-1>.
- Pipiková, J., Papajová, I., Majláthová, V., Šoltys, J., Bystrianska, J., Schusterová, I., & Vargová, V. (2020). First report on *Giardia duodenalis* assemblage F in Slovakian children living in poor environmental conditions. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(1), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.04.007>.

- Pivic, R., Josic, D., Dinić, Z., Dželatović, Ž., Maksimović, J., Stanojković Sebić, A. (2014). Water quality of the Drina river as a source of irrigation in agriculture. In Book of proceedings. East Sarajevo; Faculty of Agriculture.
- Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213(5), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>.
- Plutzer, J., & Karanis, P. (2016). Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Research*, 101, 318–332. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.085>.
- Prystajecy, N., Tsui, C. K., Hsiao, W. W., Uyaguari-Diaz, M. I., Ho, J., Tang, P., & Isaac-Renton, J. (2015). *Giardia* spp. are commonly found in mixed assemblages in surface water, as revealed by molecular and whole-genome characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4827–4834. <https://doi.org/10.1128/AEM.00524-15>.
- Remington J. S. (1974). Toxoplasmosis in the adult. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 50(2), 211–227.
- Remington, J. S., Thulliez, P., & Montoya, J. G. (2004). Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 941–945. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.941-945.2004>.
- Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda – 2018, Ministarstvo za zaštitu životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2019.
- Rezultati ispitivanja kvaliteta površinskih i podzemnih voda – 2019, Ministarstvo za zaštitu životne sredine/Agencija za zaštitu životne sredine, Beograd 2020.
- Robertson, L. J., & Gjerde, B. (2001). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scandinavian Journal of Public Health*, 29(3), 200–207.
- Robertson, B., Sinclair, M. I., Forbes, A. B., Veitch, M., Kirk, M., Cunliffe, D., Willis, J., & Fairley, C. K. (2002). Case-control studies of sporadic cryptosporidiosis in Melbourne and Adelaide, Australia. *Epidemiology and Infection*, 128(3), 419–431. <https://doi.org/10.1017/s0950268802006933>.
- Robertson, L. J., & Gjerde, B. K. (2004). Effects of the Norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Microbial Ecology*, 47(4), 359–365. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0003-5>.
- Robertson, L. J., Hermansen, L., & Gjerde, B. K. (2006). Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in sewage in Norway. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5297–5303. <https://doi.org/10.1128/AEM.00464-06>.
- Robertson, L. J., & Gjerde, B. K. (2007). *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries?. *Trends in Parasitology*, 23(8), 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.002>.
- Rochelle, P. A., Fallar, D., Marshall, M. M., Montelone, B. A., Upton, S. J., & Woods, K. (2004). Irreversible UV inactivation of *Cryptosporidium* spp. despite the presence of UV repair genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(5), 553–562. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2004.tb00291.x>.

- Rousseau, A., La Carbona, S., Dumètre, A., Robertson, L. J., Gargala, G., Escotte-Binet, S., Favennec, L., Villena, I., Gérard, C., & Aubert, D. (2018). Estimation de la viabilité et infectiosité des stades (kystes et oocystes) de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. et *Toxoplasma gondii* transmis par la nourriture et l'eau : une revue des méthodes. *Parasite* (Paris, France), 25, 14. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018009>.
- Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., & Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50-year perspective (1971-2021). *International Journal for Parasitology*, S0020-7519(21)00296-4. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A. A., & Pavlasek, I. (2003). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4302–4307. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.4302-4307.2003>.
- Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>.
- Ryan, U., & Hijjawi, N. (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology*, 45(6), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.01.009>.
- Ryan, U., Paparini, A., Monis, P., & Hijjawi, N. (2016). It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?. *Water Research*, 105, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.013>.
- Sakan, S. M., Dordević, D. S., Manojlović, D. D., & Predrag, P. S. (2009). Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments. *Journal of Environmental Management*, 90(11), 3382–3390. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.013>.
- Santín M. (2013). Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/00480169.2012.731681>.
- Santin M. (2020). *Cryptosporidium* and *Giardia* in Ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*, 36(1), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.005>.
- Sarkar, R., Ajjampur, S. S., Prabakaran, A. D., Geetha, J. C., Sowmyanarayanan, T. V., Kane, A., Duara, J., Muliylil, J., Balraj, V., Naumova, E. N., Ward, H., & Kang, G. (2013). Cryptosporidiosis among children in an endemic semiurban community in southern India: does a protected drinking water source decrease infection?. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(3), 398–406. <https://doi.org/10.1093/cid/cit288>.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Shapiro, K., Bahia-Oliveira, L., Dixon, B., Dumètre, A., de Wit, L. A., VanWormer, E., & Villena, I. (2019). Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00049. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>.
- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS-mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>.

- Siwila, J. (2017). Giardiasis: Livestock and companion animals. *Current Topics in Giardiasis*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70874>.
- Sl. glasnik RS. (n.d.). Strategija poljoprivrede i ruralnog razvoja Republike Srbije za period 2014-2024. godine. Retrieved October 28, 2021, from <http://uap.gov.rs/wp-content/uploads/2016/05/STRATEGIJA-2014-2020-.pdf>.
- Smith, H. V., Nichols, R. A., & Grimason, A. M. (2005). *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.007>.
- Sogin M. L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current opinion in genetics & development*, 1(4), 457–463. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(05\)80192-3](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(05)80192-3).
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D. P., & Crisanti, A. (1997). PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 150(2), 209–217. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(97\)00115-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(97)00115-8).
- Stalheim, O. H., Hubbert, W. T., Boothe, A. D., Zimmermann, W. J., Hughes, D. E., Barnett, D., Riley, J. L., & Foley, J. (1980). Experimental toxoplasmosis in calves and pregnant cows. *American Journal of Veterinary Research*, 41(1), 10–13.
- Stark, D., Barratt, J. L., van Hal, S., Marriott, D., Harkness, J., & Ellis, J. T. (2009). Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 634–650. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-09>.
- Stelzer, S., Basso, W., Benavides Silván, J., Ortega-Mora, L. M., Maksimov, P., Gethmann, J., Conraths, F. J., & Schares, G. (2019). *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00037. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00037>.
- Stibbs, H. H., & Ongerth, J. E. (1986). Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *Journal of Clinical Microbiology*, 24(4), 517–521. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.4.517-521.1986>.
- Stone, W. B., & Manwell, R. D. (1969). Toxoplasmosis in cold-blooded hosts. *The Journal of Protozoology*, 16(1), 99–102. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02239.x>.
- Stopić, M., Štajner, T., Marković-Denić, L., Nikolić, V., Djilas, I., Srzentić, S. J., Djurković-Djaković, O., & Bobić, B. (2022). Epidemiology of Toxoplasmosis in SERBIA: A Cross-Sectional Study on Blood Donors. *Microorganisms*, 10(3), 492. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030492>.
- Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., & Dubey, J. P. (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 137(1), 1–11. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>.
- Sulaiman I.M., Cama V. (2006) The Biology of *Giardia* Parasites. In: Ortega Y.R. (eds) Foodborne Parasites. Food Microbiology And Food Safety Series. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-387-31197-1_2.

- Sullivan, T., Reese, L., Huprikar, S., & Lee, M. (2013). Pulmonary cryptosporidiosis and immune reconstitution inflammatory syndrome: a case report and review. *International journal of STD & AIDS*, 24(4), 333–334. <https://doi.org/10.1177/0956462412472824>.
- Sutlovic, D., Gamulin, S., Definis-Gojanovic, M., Gugic, D., & Andjelinovic, S. (2008). Interaction of humic acids with human DNA: proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis*, 29(7), 1467–1472. <https://doi.org/10.1002/elps.200700699>.
- Templeton, T. J., Lancto, C. A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N. R., Hadsall, K. Z., & Abrahamsen, M. S. (2004). The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infection and Immunity*, 72(2), 980–987. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.980-987.2004>.
- Thompson, A. (2008). Review of "*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis" by Ronald Fayer and Lihua Xiao (eds.). *Parasites & Vectors*, 1(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-47>.
- Thompson, R. C., & Monis, P. T. (2004). Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58, 69–137. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)58002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)58002-8),
- Thompson, R. C. A., Koh, W. H., & Clode, P. L. (2016). *Cryptosporidium* — what is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.08.004>.
- Thompson, R. C., & Smith, A. (2011). Zoonotic enteric protozoa. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.016>.
- Thompson, R. C., & Monis, P. (2012). *Giardia*--from genome to proteome. *Advances in Parasitology*, 78, 57–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394303-3.00003-7>.
- Thompson, R., & Ash, A. (2019). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections - What's new? *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 75, 103951. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103951>.
- Tumwine, J. K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D. E., & Tzipori, S. (2005). Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(5), 921–925.
- Tyzzer E. E. (1910). An extracellular Coccidium, *Cryptosporidium muris* (Gen. Et Sp. Nov.), of the gastric Glands of the Common Mouse. *The Journal of Medical Research*, 23(3), 487–510.3.
- Tyzzer, E. E. (1912). *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a Coccidium. *Archiv für Protistenkunde*, 26, 394.
- Tzipori, S., & Widmer, G. (2008). A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 24(4), 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.01.002>.
- Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F., Wagenaar, J. A., Mughini-Gras, L., Koop, G., & Ploeger, H. W. (2018). Comparing four diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in dogs using latent class analysis. *Parasites & Vectors*, 11(1), 439. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3014-2>.
- United States Environmental Protection Agency, 2005a. Method 1622: *Cryptosporidium* in Water by Filtration/IMS/IFA, vol. 4607 Office of Water EPA 815-R-05-001.

- The Universal Protein Resource. UniProt Consortium, European Bioinformatics Institute, SIB Swiss Institute of Bioinformatics. (n.d.). *Giardia*. Retrieved January 28, 2022, from <https://www.uniprot.org/taxonomy/5741>.
- US EPA, 2012. Method 1623.1 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/ IMS/FA. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C.
- Veljković N, Petrović Z, Šotić, A, Cibulić, Violeta. (2010). Perspective on implementation of the eu urban waste water treatment directive in Serbia. In: Serbian. [Perspektiva primene evropske direktive o prečišćavanju komunalnih otpadnih voda u Srbiji], pp. 1–11. <http://www.sepa.gov.rs/download/>. UDK: 628.3:006.063(4-672EU). Accessed on 01 Oct 2019.
- Vieira, F. P., Alves, M., Martins, L. M., Rangel, A. L., Dubey, J. P., Hill, D., & Bahia-Oliveira, L. M. (2015). Waterborne toxoplasmosis investigated and analysed under hydrogeological assessment: new data and perspectives for further research. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(7), 929–935. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150262>.
- Visbeck, M. (2018). Ocean science research is key for a sustainable future. *Nature Communications*, 9(1), 690. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03158-3>.
- Vujanić, M., Ivović, V., Kataranovski, M., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Villena, I., Kataranovski, D., & Djurković-Djaković, O. (2011). Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(8), 1209–1211. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0119>.
- Weiss, L. M., & Dubey, J. P. (2009). Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39(8), 895–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>.
- Weller, D., Wiedmann, M., & Strawn, L. K. (2015). Spatial and Temporal Factors Associated with an Increased Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Spinach Fields in New York State. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 6059–6069. <https://doi.org/10.1128/AEM.01286-15>.
- Wells, B., Shaw, H., Innocent, G., Guido, S., Hotchkiss, E., Parigi, M., Opsteegh, M., Green, J., Gillespie, S., Innes, E. A., & Katzer, F. (2015). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in water samples from Scotland and a comparison between the 529bp real-time PCR and ITS1 nested PCR. *Water Research*, 87, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.015>.
- WHO. (2009). Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks: World Health Organization.
- Widerström, M., Schönning, C., Lilja, M., Lebbad, M., Ljung, T., Allestam, G., Ferm, M., Björkholm, B., Hansen, A., Hiltula, J., Långmark, J., Löfdahl, M., Omberg, M., Reuterwall, C., Samuelsson, E., Widgren, K., Wallensten, A., & Lindh, J. (2014). Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 20(4), 581–589. <https://doi.org/10.3201/eid2004.121415>.
- Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>.
- Wilson, A. G., Wilson, S., Alavi, N., & Lapen, D. R. (2021). Human density is associated with the increased prevalence of a generalist zoonotic parasite in mammalian wildlife. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1961). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1724>.

- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality, (2011). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>.
- Xiao, L., Morgan, U. M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R. C., Fayer, R., & Lal, A. A. (1999). Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3386–3391. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.8.3386-3391.1999>.
- Xiao, L., Bern, C., Limor, J., Sulaiman, I., Roberts, J., Checkley, W., Cabrera, L., Gilman, R. H., & Lal, A. A. (2001). Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(3), 492–497. <https://doi.org/10.1086/318090>.
- Xiao, L., & Feng, Y. (2017). Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitology*, 8-9, 14–32. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>.
- Xiao L., Cama V.A. (2018) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: Ortega Y., Sterling C. (eds) *Foodborne Parasites. Food Microbiology and Food Safety*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67664-7_5.
- Yang, W., Lindquist, H. D., Cama, V., Schaefer, F. W., 3rd, Villegas, E., Fayer, R., Lewis, E. J., Feng, Y., & Xiao, L. (2009). Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in water sample concentrates by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3477–3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.00285-09>.
- Yilmaz, S. M., & Hopkins, S. H. (1972). Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 58(5), 938–939.
- Yu, J. R., Lee, S. U., & Park, W. Y. (2009). Comparative sensitivity of PCR primer sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(3), 293–297. <https://doi.org/10.3347/kjp.2009.47.3.293>.
- Zahedi, A., & Ryan, U. (2020). *Cryptosporidium* - An update with an emphasis on foodborne and waterborne transmission. *Research in Veterinary Science*, 132, 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.002>.
- Zarlenga, D. S., & Trout, J. M. (2004). Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 195–217. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.001>.

PRILOZI

Georeferentni podaci za lokacije uzorkovanja vodnih tela sa koordinatama, kreirani u OziExplorer softveru:

1	44.770920, 19.698898	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
2	44.752518, 19.716768	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
3	44.731655, 20.311835	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
4	44.848846, 20.411830	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
5	44.768414, 20.620448	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
6	44.693658, 20.959222	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
7	44.007699, 21.296089	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
8	44.148020, 21.053718	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
9	44.586730, 21.132873	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
10	44.716730, 21.536147	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
11	44.645713, 21.220110	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
12	44.068452, 21.197887	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
13	44.784687, 19.350366	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
14	43.975092, 19.541425	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
15	45.052255, 19.169406	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
16	44.633342, 19.273094	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
17	44.593385, 19.298004	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
18	44.914416, 19.743549	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
19	44.878088, 19.084065	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
20	44.229567, 21.146498	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
21	44.237895, 21.176878	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
22	44.417803, 21.364797	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
23	43.457960, 20.596822	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
24	44.538151, 20.209328	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
25	44.391790, 21.402819	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
26	44.032513, 20.943257	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
27	44.981024, 19.283683	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
28	44.709786, 19.799873	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
29	44.700123, 22.418538	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
30	44.652027, 20.216726	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
31	44.423018, 22.173043	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
32	43.843835, 19.706695	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
33	43.415932, 21.183962	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
34	45.594014, 20.107228	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
35	45.854052, 18.859036	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
36	45.919732, 18.986591	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
37	45.206210, 20.315213	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60

38	45.266293, 19.872312	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
39	45.999523, 20.347688	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
40	45.535999, 20.021837	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
41	45.415278, 19.227500	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
42	43.227578, 22.705207	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
43	43.322022, 21.893254	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
44	43.698540, 21.405655	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
45	45.351078, 20.383610	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
46	43.624541, 20.895836	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
47	44.254591, 20.087812	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60
48	44.784371, 20.386957	00000.0000000, 0, 0, 3, 0, 65535,, 0, 0, 0, -777, 6, 0,17,0,10.0,2,,,,,60

Biografija autora

Vladimir S. Ćirković rođen je 5. jula 1987. godine u Šapcu, gde je završio osnovnu i srednju (medicinsku) školu – smer sanitarno-ekološki tehničar. Integrisane akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je školske 2006/07. godine, i diplomirao 28. januara 2015. Doktorske akademske studije, modul Hidroekologija, upisao je oktobra 2016. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od novembra 2016. godine zaposlen je u Centru izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, gde je bio angažovan na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Kontrola infekcija apikompleksnim patogenima: od novih mesta delovanja leka do predikcije“ (III 41019). Od 2016-2019. bio je učesnik COST akcije FA1408 – *A European Network for Foodborne Parasites* (Euro-FBP), u okviru programa kratkoročnih naučnih boravaka (STSM) tokom 2017. godine proveo je ukupno četiri nedelje na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Oslu, na Katedri za sigurnost hrane, biologiju infekcije i parazitologiju. U Oslu je završio obuku pod nazivom „Detekcija *Cryptosporidium* spp., *Giardia* spp. i *Toxoplasma gondii* u vodi“. Naredne, 2018. godine bio je na stručnom usavršavanju na Institutu za bezbednost hrane, zdravlje životinja i životnu sredinu u Rigi, Letonija, na kursu pod nazivom „*Molecular Methods used for Foodborne Parasite Diagnostics in Different Matrices*“. Do sada je u časopisima kategorije M₂₀ u saradnji sa koautorima objavio devet radova, od kojih je u tri, iz oblasti detekcije protozoa u vodi, prvi autor. Izlagao je na više međunarodnih i nacionalnih naučnih skupova. Član je Društva parazitologa Srbije od 2016. god.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Владимир Ђирковић**

Број индекса **E2016/3005**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије резултат сопственог истраживачког рада;

- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Владимир Ђирковић**

Број индекса **E2016/3005**

Студијски програм **Екологија**

Наслов рада **Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium spp.* и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије**

Ментори **др Ивана Клун, научни саветник**
Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања - Институт од националног значаја за Републику Србију
др Драгана Миличић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.