

# PRIMJENA IMUNOENZIMNOG TESTA ZA DOKAZ VRSTE *TRICHINELLA SPIRALIS* PRI VETERINARSKO-SANITARNOM PREGLEDU MESA SVINJA

Barić, J.<sup>1</sup>, B. Njari<sup>2</sup>, A. Marinculić<sup>3</sup>, R. Beck<sup>3</sup>

## SAŽETAK

Epizootiološka situacija s trihinelozom svinja u Republici Hrvatskoj, posebice u njezinim istočnim županijama nije povoljna. Službena metoda pretrage mesa svinja umjetnom probavom, s obzirom na svoju osjetljivost, može spriječiti oboljenje ljudi, ali je nedostatna u uspješnom suzbijanju lanca širenja trihineloze. ELISA kao osjetljiva metoda pretrage, mora pronaći svoje mjesto u epidemiološkim istraživanjima i monitoringu uzgoja svinja nekih područja Republike Hrvatske, pa i pojedinačnih farmskih uzgoja, radi određivanja epizootiološkog statusa promatrane populacije svinja. Na ovaj se način za života mogu izdvojiti sve sumnjive svinje (pozitivne, lažno pozitivne, ali i lažno negativne), a preostali dio populacije se zatim može klati bilo u registriranim klaonicama, bilo u obiteljskim gospodarstvima, bez bojazni da će se previdjeti svinje s trihinelozom ispod detekcije mogućnosti klasične trihineloskopije.

Uvođenje imunoenzimnog testa na liniji klanja svinja kao jedine metode pretrage nije moguće, i to prvenstveno radi pojave manjeg broja lažno negativnih životinja, koje u epidemiološkom smislu predstavljaju veliki rizik u lancu širenja ove bolesti, a u određenim okolnostima mogu dovesti i do oboljenja ljudi.

**Ključne riječi:** imunoenzimni test, trihineloza, dijagnostika

## UVOD

Posljednjih desetak pa i više godina trihineloza predstavlja značajan javnozdravstveni problem u

Republici Hrvatskoj. Pojavljuje se u obliku epidemija, vezanih na konzumiranje trihineloznog mesa.

Epizootiološki promatrano, glavnim izvorom invazije ljudi, pa tako i domaćih životinja, smatra se meso životinja oboljelih od trihineloze. Meso takvih životinja sadrži invazione larve oblika *T. spiralis*, pa do invadiranosti dolazi uslijed konzumiranja svježeg ili nedovoljno termički obrađenog (kuhanog, pečenog ili dimljenog) mesa i mesnih proizvoda. Zbog prehrambenih navika hrvatskog stanovništva, ali i zbog epizootiološke situacije s trihinelozom, najčešće se radi o mesu i mesnim proizvodima domaćih svinja, a znatno su rjeđi slučajevi oboljenja od trihineloze, nakon konzumiranja mesa podrijetlom od divljih svinja, medvjeda, jazavaca, konja, pa čak i morževa i lisica, te ostalih divljih životinja (Beus, 1999).

U rodu *Trichinella* do danas je poznato deset genotipova (Pozio i sur., 1992.; Nagano i sur., 1999; Pozio i La Rosa, 2000). U Hrvatskoj su do danas pronađena tri genotipa, i to:  $T_1$ ,  $T_3$  i  $T_4$ .

*T. spiralis* (Genotip  $T_1$ ) je uzročnik trihineloze u domaćih i divljih svinja te sinantropnih glodavaca, osobito štakora. U zemljama u kojima se trihineloza u domaćih svinja javlja u endemičnom obliku (Rumunjska, Srbija, Rusija, Bjelorusija, Gruzija), *T. spiralis* se obično javlja i u divljih životinja odnosno u čovjeka (Pozio, 1998). Velika većina invazija u lju-

<sup>1</sup> Mr. sc. Josip Barić, dr.vet.med.;

<sup>2</sup> Dr.sc. Bela Njari, redoviti profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica.

<sup>3</sup> Dr.sc. Albert Marinculić, redoviti profesor; Relja Beck, dr.vet.med., znanstveni novak, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti, Zagreb, Heinzelova 55;

di uzrokovana je upravo ovom, za čovjeka iznimno patogenom vrstom. Brojni literaturni zapisi govore da *T. spiralis*, za razliku od ostalih genotipova ima najveću invazijsku sposobnost za svinje (domaće i divlje), a čini se da je najpatogenija vrsta i u nekih biljoždera poput konja, goveda, ovaca i koza (Kapel, 2000). To potvrđuje da se trihinelozu javlja u ruralnom i silvatičkom ciklusu. Mišićna ličinka iz uzorka mesa manje je, za razliku od ostalih genotipova otporna na povišenu temperaturu, smrzavanja pa i kvarenja mesa. Upravo ta činjenica o većoj podložnosti *T. spiralis* negativnim utjecajima okoline obrlaže njezinu slabiju prisutnost u divljih životinja.

***T. britovi*** (Genotip T<sub>3</sub>) dokazana je u divljih životinja umjerenog klimatskog pojasa Europe i Azije. Mišićne ličinke preživljavaju u smrznutom mišiću na -20° do 6 mjeseci (Pozio i sur., 1989), a kod divljih i domaćih svinja (Kapel, 2000), odnosno miševa (Pozio i sur., 1992a.), preživljavanje ličinki ograničeno je na nekoliko tjedana. Glavni rezervoar ove vrste su lisice, no mogu biti i drugi mesožderi, poput vuka, lasice, medvjeda, *T. britovi* ima umjerenu invazijsku sposobnost za domaće svinje, ali je preživljavanje mišićnih ličinki dosta dugo (Kapel i Gamble, 2000). Upravo je ovaj genotip dokazan u mesu konja (Dupouy-Camet i sur., 1999). Invazijska sposobnost u ostalih biljoždera je veoma mala (Theodoropolous i sur., 2000). Meso divljih svinja invadirano ovom vrstom često je uzročnik trihineloze u čovjeka, ali ne u tako velikom obimu kao *T. spiralis*. Inače je u prirodnoj populaciji divljih svinja učestalost invazije s *T. britovi* manja nego s *T. spiralis* u nekim dijelovima Europe gdje je prevalencija *T. britovi* u populaciji lisica 20-25 %, u divljih je svinja istog područja prevalencija manja od 0,001 % (Pozio, 1998).

***T. pseudospiralis*** (Genotip T<sub>4</sub>) ima veliki broj nositelja, a najznačajnije je da se mogu invadirati i ptice. Osnovna biološka karakteristika ove vrste je da mišićna ličinka oko sebe ne stvara kolagenu čahuru u "stanici domaćinu", pa ju je samim time teže detektirati klasičnom kompresijskom metodom pregleda. *T. pseudospiralis* pronađena je kod mesoždera, mesoždernih ptica, tobolčara, glodavaca, svinja i rjeđe čovjeka, i to diljem Europe, Australije, Sjeverne Amerike i Azije.

## OSNOVNE MORFOLOŠKO-BIOLŠKE KARAKTERISTIKE OBLIĆA *T. SPIRALIS*

*T. spiralis* (Owen, 1835) je jedan od najnespecifičnijih nametnika u prirodi u odnosu na domaćina. Od 1835. do 1972. se smatralo da je *T. spiralis* jedina vrsta unutar roda, pa je njezina morfologija najbolje i proučena. Razlikovanje ostalih vrsta s obzirom na morfološke osobitosti nije dalo značajnijih rezultata (Arakawa i Todd, 1971; Sukhedo i Meerovitch, 1977).

Odrasli bezbojni mužjak dugačak je 1,0–1,5 mm, a širok 0,33 mm. Njegova kutikula je glatka te mjestimično isprekidana dorzalnim i ventralnim hipodermalnim žlijezdama. Cijela vanjska stijenka kutikule otporna je na enzime probavnog sustava. Genitalno područje izvedeno je u vidu dva kopulatorna privjeska i akcesornih papila. Probavni sustav se sastoji od usne šupljine, jednjaka, crijeva, rektuma i kloake. U usnoj šupljini nalaze se zubići, a jednjak i crijevo za razliku od rektuma i anusa, obloženi su kutikulom. Stihosom, skupina od pedesetak visokospecijaliziranih stanica – stihocita, leži u prednjem dijelu oblića, a svaki stihocit odlaže svoj sadržaj u jednjak preko vlastitog kanalića. Anus se u vanjsku sredinu otvara preko kloake. Spolni sustav se sastoji od jednog testisa povezanog sa *vas deferens*, koji se proširuje u *vesicula seminalis*. Testis adulta je u obliku šuplje cijevi čiji je cijeli unutrašnji zid pokriven germinativnom zonom. *Vesicula seminalis* se nastavlja u ejakulatorni kanal koji se preko kloake otvara u vanjsku sredinu. Od živčanog sustava bitno je spomenuti živčani prsten, koji je zapravo ganglij, a nalazi se u prednjem dijelu tijela, odmah iza jednjaka i upravlja svim funkcijama u organizmu. Od živčanog prstena proteže se ventralni i dorzalni živčani tračak, koji se na analnom predjelu susreću, nakon prolaska kroz analni ganglij, koji je smješten tik uz vanjsku stjenku crijeva. Mišićni sustav je dobro razvijen unutar vanjske stjenke, raspoređen je po cijelom tijelu u vidi mišićnih vlakana koji omogućuju kretanje čitava tijela i funkcioniranje probavnog sustava.

Nametnik *T. spiralis* je jedini do danas poznati nematod u kojeg se svi razvojni stadiji javljaju u jednom nosiocu. Unutar istoga nosioca svi razvojni stadiji su smješteni intracelularno, izuzev vremena migracije ličinki limfom odnosno krvlju. *T. spiralis* može invadirati gotovo sve vrste sisavaca (Chute

i Covalt, 1960). Izuzetak predstavlja kineski hrčak, koji je jedini neprimljiv sisavac unutar skupine svejeda i mesojeda (Ritterson, 1959).

## DIJAGNOSTIKA TRIHINELOZE U SVINJA

Dijagnostika trihineloze u svinja može se postaviti za života ili, danas uobičajeno i propisano, postmortalnim pregledom mišićnog tkiva, uzetog s predilektacijskih mjesta na trupu zaklanih svinja. Prema Van Knapenu (2000) se dijagnostičke metode dokaza trihineloze u mišićju svinja dijele na izravne metode, koje ličinku vizualno dokazuju u mišićnom tkivu i neizravne metode, kojima se *T. spiralis* dokazuje temeljem specifičnog imunološkog odgovora na prisustvo protutijela odnosno antigena u krvnom serumu ili mišićnom iscrpku.

Neizravne dijagnostičke metode temelje se uglavnom na dokazivanju *Trichinella* specifičnih antitijela IgM i IgG razreda u krvi odnosno serumu, što ne isključuje i druge metode (dokaz antigena u serumu ili tkivu, lančana reakcija polimeraze). Ova skupina dijagnostičkih metoda ima veću osjetljivost, a budući se izvode zaživotno, uglavnom se primjenjuju u humanoj dijagnostici. U novije vrijeme se i u životinja, posebice u svinja ove metode također rabe, ali modificirane pa se za pretragu krvi uzima direktno na liniji klanja, ili eventualno kod preostalih živih svinja u uzgojima gdje je nedavno zabilježena jedna ili više trihineloznih životinja. Danas korištene serodijagnostičke metode su: imunofluorescencija (IF); radioimunoenzimni test (RIA), reakcija vezanja komplementa (RVK); imunoenzimski test (ELISA) i imunobloting.

ELISA se u usporedbi s ostalim neizravnim dijagnostičkim metodama, najviše preferira kao imunodijagnostička rutinska metoda za mnoge invazijske bolesti, pa tako i za trinelozu. Ona je jednostavna za izvođenje, osjetljiva i brza metoda za dokazivanje antitijela u serumu. U dijagnostici trihineloze u svinja prvi je put spominju Ruitenberga i sur. (1974), a Gamble (1996) spominje njezinu osjetljivost (u optimalnim okolnostima) već pri jednoj ličinki/100 grama muskulature.

Svrha ovog rada je utvrditi mogućnost primjene imunoenzimskog testa (ELISA) na samoj liniji klanja kao postupka sa znatno većom osjetljivošću u odnosu na sadašnje izravne metode pretraga. Pri-

marno će se u ispitivanim serumima svinja utvrditi razina specifičnih IgM antitijela, a kontrolno će se provesti umjetna probava svakog uzorka posebno, te se zatim nastojati utvrditi koleracija između nalaza u obje metode.

## MATERIJAL I METODE RADA

Pretraženo je ukupno 256 krvnih seruma, podrijetlom od svinja iz endemičnih područja Vukovarsko-srijemske i Virovitičko-podravske županije. Svinje su potjecale iz aglomeracija u kojima je u kratkom prethodnom periodu utvrđena trihinelozna jedna ili više svinja. Serumi su prikupljeni i dostavljani na Zavod za parazitologiju i invazijske bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kroz tri godine.

Kod klanja svinja u privatnim obiteljskim gospodarstvima, uz uzorke krvi prikupljane u epruvete pri klanju životinja, uzimani su i uzorci poprečno prugaste muskulature dijafragme te su nakon trihineloskopije u područnim veterinarskim ambulancama (bez obzira na pozitivni ili negativni nalaz), poslane na Veterinarski fakultet u Zagrebu, zajedno s pripadajućim serumima.

Također je u nekoliko navrata iz klaonice "Vupik" u Sotinu, uzimana krv zaklanih svinja i pripadajući uzorci mišića dijafragme. Radilo se o ciljanom klanju svinja iz trihineloznih dvorišta te klanju svinja koje potječu iz područja Istočne Slavonije, dakle opet iz endemičnog područja. Serumi su do pretrage pohranjivani na  $-20^{\circ}\text{C}$ , do prikupljena dovoljnog broja, nakon čega su pretraženi na prisustvo specifičnih IgM antitijela, metodom imunoenzimskog testa, uz primjenu ekskretorno sekretornih (E/S) antigena, dobivenih "in vitro" kultiviranjem mišićnih ličinki.

Parazit *Trichinella spiralis* (MSUS/PO/60/1593) koji je korišten u radu za pripremu antigena izdvojen je iz domaće svinje (*Sus scrofa L.*) 1960. godine, a dobiven je iz referalnog centra za trihinelozu, pri Laboratoriju za parazitologiju, Istituto Superiore di Sanita, Rim, Italija.

Za održavanje izolata *T. spiralis* korišten je *Sprague-Dawley* soj štakora. Štakori su držani u standardnim uvjetima, uz dvanaestsatnu izmjenu svjetla i mraka, hranjeni peletiranom industrijskom hranom, te napajani po volji.

Mišićne ličinke izdvojene su metodom umjetne

probave. Miševi su invadirani s 400 L<sub>1</sub> i nakon 30 dana eutanazirani. Zatim im je skinuta koža i odstranjeni unutarnji organi, a meso je usitnjeno i inkubirano u umjetnom želučanom soku (1 % HCl, 1 % pepsin), 50 g mesa na 1 L vode, tijekom 2 sata na 37 °C, uz stalno miješanje na mješalici.

### Priprema antigena

U serodijagnostici je korišten ekskretorno-sekretorni (E/S) antigen, a pripremljen je metodologijom koju su opisali Gamble i sur. (1988). Mišićne ličinke dobivene umjetnom probavom su tri puta ispirane u zagrijanoj fiziološkoj otopini (37 °C), uz dodatak antibiotika (100 i.j. penicilina/mL + 100 µg streptomicina), a potom inkubirane 18 sati u MEM-u (engl. *Minimal Esential Medium*), uz dodatak 2 mM L-glutamina, 10 mM HEPES-a, 1 mM natrijeva piruvata i antibiotike (100 i.j. penicilina/mL + 100 µg streptomicina). Po završenoj inkubaciji od 24 sata, medij je pretočen u konusne staklene posude tako da je omogućeno ličinkama da sedimentiraju tijekom 20 minuta. Supernatant s ES antigenom je odpipetiran i smrznut na -18°C. Ekskretorno/sekretorni produkti su zatim koncentrirani preko filtera pod N<sub>2</sub> tlakom. Koncentracija i aktivnost proteina su određivani razrijeđivanjem na mikrotitracijskim pločama. Antigen je alikvotiran na -18 °C do ponovnog korištenja.

### Umjetna probava

Za pretragu tkiva domaće svinje metodom umjetne probave treba uzeti uzorak mišićja s *crura diaphragmatis* ili jezika u najmanjoj količini od 5 g. Kod redovitih pretraga uzoraka mesa svinja ovom metodom na liniji klanja, ne preporuča se više od 50 pojedinačnih uzoraka; preporuča se da u svinja podrijetlom iz endemičnog područja, jedan skupni uzorak ne čini više od 20 pojedinačnih uzoraka. U našem istraživanju je svaki pojedinačni uzorak mišićja pregledavan zasebno, kako bi se direktno povezivao s kasnijim nalazom specifičnih IgG antitijela.

Za dobro usitnjeni uzorak za pretragu umjetnom probavom (ukupne težine 100g) treba pripremiti dvije litre "zakiseljene vode" (16 mL 1 % HCl), te izvagati 10 g pepsina (aktivnosti 30 000 jedinica/g). Moguće je probaviti i manju količinu uzorka, pri čemu je optimalni odnos 50 g tkiva u mješavini

jedne litre zakiseljene vode i 10 g pepsina (1 %w/v). Tkivo treba usitniti zakiseljenom vodom a potom ga se sa pepsinom probaviti na magnetskoj mješalici s grijanjem tijekom slijedećih 30-60 minuta. Najbrža i potpuna probava odvija se pri 43-45 °C. Nakon inkubiranja se mješavina tkiva i soka procjeđuje u za to namijenjenu posudu (separator sa zatvaračem) kroz sito (pore od 180-355 µm). Procijeđenu mješavinu treba sedimentirati tijekom slijedećih 30 minuta. Tako dobijeni sediment se izlije u Petrijevu zdjelicu s ugraviranim oznakama polja, i pažljivo promatra pri povećanju 40x lupom, mikroskopom ili prenamijenjenim trihinoskopom.

### Imunoenzimski test

Uzorci krvi (10 mL) su uzimani na liniji klanja. Serum je izdvojen nakon centrifugiranja koagulirane krvi i zaleđen na -20 °C.

Pojedinačni uzorci seruma su pretraživani metodom imunoenzimskog testa na prisustvo protutijela oblića iz roda *Trichinella* koristeći se E/S antigenom. Bunarčići za imunoenzimni test (96 ukupno) su napunjeni s E/S antigenom, razrijeđenim u omjeru 1:1000 u karbonatnom puferu (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) i zatim inkubirani u termostatu na 37 °C tijekom 60 minuta. Nakon što je sadržaj izbačen bunarčići su blokirani s 5 % BSA tijekom 30 minuta, na istoj temperaturi. Ploče su zatim ispirane tri puta (svako ispiranje traje 5 minuta) s puferom za ispiranje (PBS i Twin 0,05 %). Serumi (100 µL) su razrijeđeni u omjeru 1:100 u puferu za ispiranje, te zatim inkubirani kroz 30 min. na 37 °C i isprani tri puta. U svaki bunarčić je zatim dodano 100 µL kozjih protu svinjskih IgG konjugiranih s peroksidazom iz hrena (SEROTEC) u razrijeđenju 1:10000 s puferom za ispiranje. Nakon inkubacije u termostatu na 37 °C tijekom 1 sata isprani su tri puta (5 min. svako pranje). Po zadnjem inkubiranju i ispiranju dodano je 100 µL supstrata (50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 50 µL ABTS u 10 mL citratnog pufera pH 4).

Vrijednosti su očitavane pri valnoj duljini od 405 nm na automatskom čitaču (Labsystem, Multiskan EX). Na svakoj mikrotitracijskoj ploči su dodani referentno pozitivni i negativni serumi tako da su ploče očitovane u učestalim intervalima dok vrijednosti pozitivnih nisu dosegle oko 1.0. Reakciju smo stopirali dodavanjem 2 % natrijevog dodecil sulfata.

## REZULTATI I RASPRAVA

Pretragom uzoraka seruma i mesa svinja utvrđeno je da je najveći broj dostavljenih seruma bio negativan, što je potvrđeno i umjetnom probavom. Nije utvrđena niti jedna larva u pretraživanom uzorku mesa koji je potjecao od svinja kojima je uzeta krv. Tako se od 256 dostavljenih seruma rezultat serološke pretrage i umjetne probave podudara i negativan je u 228 slučajeva ili 89,1 %.

Serološki pozitivni nalazi potvrđeni su pretragom umjetnom probavom 19 slučajeva ili 7,4 % (tabl. 1.).

Serološki pozitivne životinje uz istovremeni negativan nalaz umjetnom probavom su zabilježene u 5 uzoraka ili 1,9 %. Međutim, umjetnom probavom nije dokazana niti jedna ličinka. To, međutim, ne znači da ne bismo našli invazijske ličinke da je bilo moguće pretražiti znatno veću količinu mišića dotične životinje. Ovu skupinu životinja možemo proglasiti "lažno pozitivnima", a u epidemiološkom smislu ne predstavljaju problem, jer bi se zapravo zdrave životinje deklarirale kao invadirane trihinelom, i osim ekonomske štete u visini tržišne vrijednosti dotične svinje, nikakvih drugih posljedica ne bi bilo.

U dijelu ispitivanih uzoraka serološki je nalaz bio negativan, ali je naknadni nalaz ličinki u postupku umjetne probave u pripadajućem uzorku bio pozitivan. Ovu skupinu možemo deklarirati kao "lažno negativnu", a zabilježeno ih je ukupno 13 ili 1,2 %. Radi se o uzorcima seruma koji su nakon pretrage imunoenzimskim testom imali ekstinkcijske vrijednosti u rasponu srednje vrijednosti ( $0,15034 \pm 0,10269$ ), odnosno čija ekstinkcija nije prelazila vrijednost 0,2-5303, ali su naknadnom kontrolnom pretragom pripadajućeg uzorka mišića utvrđene ličinke trihinele. Da bi se izbjegla sumnja vezana na moguće morfološko zamjenjivanje ličinki *T. spiralis* i drugih vrsta parazita, u svakom slučaju pozitivnog nalaza umjetnom probavom je, pomoću "Multiplex-PCR" metode potvrđeno da se doista radi o toj vrsti parazita.

Pretragom 803 seruma svinja iz Republike Koreje metodom imunoenzimskog testa Wee i sur. (2001) detektirali su ukupno devet seruma kao sumnjive i svega jedan kao pozitivni. No naknadna *western blotting* metoda, kao metoda potvrde, nije pokazala pozitivnu reakciju niti u jednom od deset prethodno spomenutih seruma, tj. nije bilo reakcije na larval-

ne E/S antigene, što navodi autore na zaključak da su pretraženi uzgoji svinja sigurno slobodni od trihineloze. Monroy i sur. (2001) su pretražili 539 seruma svinja metodom ELISA i zatim *western blotting* metodom kao potvrdom, te također 539 pripadajućih uzoraka mišića dijafragme. U 12,4 % pretraženih seruma utvrđena su specifična protutijela, dok istovremeno direktnim metodama pretrage pripadajućih 539 mišića nije utvrđena u niti jednom uzorku larva *T. spiralis*.

U procjeni vjerodostojnosti imunoenzimnog testa, u našem istraživanju upada u oči relativno veliko učešće lažno pozitivnih (5 seruma ili 1,9 %) i lažno negativnih seruma (3 seruma ili 1,2 %). To možemo objasniti činjenicom da su svi pretraženi pojedinačni uzorci (256) seruma i mišićja podrijetlom iz endemičnog trihineloznog područja Vukovarsko-srijemske županije pri čemu je znatni dio uzoraka potjecao od svinja iz dvorišta koja su se nalazila pod upravnom mjerom vezanom na sanitaciju trihineloze. Nameće se dojam da bi u konačnoj prosudbi osjetljivosti tj. specifičnosti imunoenzimskog testa trebalo pretražiti puno više uzoraka (serum i mišićno tkivo) podrijetlom i od svinja iz neendemičnih područja. Valjalo bi osigurati veću masu mišićja, posebice u serološki sumnjivih životinja, da bi se naknadna umjetna probava mogla provesti na znatno većem uzorku mesa. U našim istraživanjima mi smo bili ograničeni samo na mišićje s predilekcijskog mjesta.

Noeckler (2000) smatra da se pojava lažno pozitivnih seruma može očekivati kod neadekvatno uzetih i pohranjenih uzoraka. Uzorak se može kontaminirati mikroorganizmima s površine tijela svinje, pri čemu često posjeduju snažne proteolitičke enzime, naročito aktivne na sobnim temperaturama. Hemoliza, kao posljedica enzimatske aktivnosti također pridonosi manjoj specifičnosti testa.

Nasuprot tome, Gamble (1998), iznosi podatak o osjetljivosti imunoenzimskog testa već pri 0,02 ličinki/gramu. Najmanja oštećenja kutikule ličinke trihinele omogućuju ulazak pepsina i totalnu destrukciju tijela, koja time biva nevidljiva umjetnom digestijom, ali serološki nalaz, dakako, može biti pozitivan, zahvaljujući njegovoj velikoj osjetljivosti.

Imunoenzimski test je vrlo osjetljiva metoda, posebice u odnosu na umjetnu probavu i trihineloskopiju, koje se u našim uvjetima rabe kao službeno propisa-

▼ **Tablica 1.** Rezultati seroloških pretraga i pretraga mišića umjetnom probavom▼ **Table 1.** Results of serological tests and trichinella digestion muscles tests

Redni broj* / Ordinal number*	Ekstinkcijska vrijednost (ELISA) / Extinction value (ELISA)	Nalaz umjetnom probavom / Finding - digestion	Broj ličinki po gramu / Number of larva/g
Vukovarsko-srijemska županija			
1.	<b>0,529</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>325,3</b>
2.	<b>0,669</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>78,1</b>
3.	<b>0,601</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>156,5</b>
4.	<b>1,118</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>319,8</b>
5.	0,132	<b>pozitivno/positive</b>	<b>0,22</b>
6.	0,199	<b>pozitivno/positive</b>	<b>0,17</b>
7.	<b>0,417</b>	negativno/negative	<b>0</b>
8.	<b>0,679</b>	negativno/negative	<b>0</b>
9.	nedostupan s.	negativno/negative	<b>0</b>
10.	0,582	<b>pozitivno/positive</b>	<b>695,8</b>
11.	0,186	<b>pozitivno/positive</b>	<b>0,38</b>
12.	<b>0,400</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>22,1</b>
Virovitičko-podravka županija			
13.	<b>1,097</b>	negativno/negative	<b>0</b>
14.	<b>0,258</b>	negativno/negative	<b>0</b>
15.	<b>0,648</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>25,1</b>
16.	<b>0,534</b>	negativno/negative	<b>0</b>
17.	<b>0,776</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>29,95</b>
18.	<b>0,556</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>21,3</b>
19.	<b>0,798</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>789,6</b>
20.	<b>0,577</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>345,2</b>
21.	<b>0,865</b>	<b>pozitivno/positive</b>	45,25
22.	<b>0,784</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>13,7</b>
23.	<b>0,448</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>22,8</b>
24.	<b>0,716</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>564,5</b>
25.	<b>0,541</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>45,8</b>
26.	<b>0,623</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>78,8</b>
27.	<b>1,012</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>91,3</b>
28.	<b>0,827</b>	<b>pozitivno/positive</b>	<b>11,4</b>

\* ukupno 228 pretraženih uzoraka pokazalo je negativnu reakciju u obje metode pa rezultati nisu prikazani u ovoj tablici

\* total 228 samples showed negative reactions in both methods so results are not shown in this table

• srednja vrijednost ekstinkcije 10 referentno negativnih uzoraka je 0,15034 /mean extinction value of 10 referent negative samples is 0,15034

• serološki negativni uzorci od 0,04765 do 0,25303 / serological negative samples from 0,04765 to 0,25303

• sumnjivi uzorci od 0,25303 do 0,35572/ suspicious samples from 0,25303 to 0,35572

• pozitivni – s ekstinkcijskim vrijednostima višim od 0,35572 / positive samples- with extinction values over 0,35572

ne metode. Međutim, moguća pojava lažno negativnih rezultata predstavlja ogroman javnozdravstveni rizik, te se ovaj test kao jedina metoda pretrage na liniji klanja svinja ne dozvoljava. Posebice riskantno bi bilo implementiranje ove metode pretrage kod ispitivanja seruma svinja iz endemičnih područja.

Imunoenzimski test je metoda izbora u serološkom monitoringu i određivanju statusa većih ili manjih uzgoja svinja. U uvjetima pogoršane epizootiološke situacije s trihinelozom svinja u Istočnoj Hrvatskoj, test bi mogao biti dobro iskorišten u detektiranju najvećeg broja serološki sumnjivih svinja, koje bi se izdvajale i klale u kontroliranim uvjetima u registriranim klaonicama. Sve ostale svinje bi se zatim mogle klati i u privatnim domaćinstvima, ali i uz utemeljena očekivanja da se radi o trihinelozu negativnim svinjama.

## ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata istraživanja može se zaključiti da je imunoenzimski test izuzetno osjetljiva metoda, kojom se detektira imunostimulacija veoma malim brojem parazita.

U našem istraživanju uočili smo relativno veliko učešće lažno pozitivnih (5 seruma ili 1,9 %) i lažno negativnih (3 seruma ili 1,2 %), što možemo objasniti činjenicom da su svi pretraženi pojedinačni uzorci (256) seruma i mišića podrijetlom iz endemičnog trihineloznog područja, te se nameće dojam da bi u konačnoj prosudbi osjetljivosti tj. specifičnosti imunoenzimskog testa trebalo pretražiti puno više uzoraka (serum i mišićno tkivo) podrijetlom i od svinja iz neendemičnih područja.

U 96,9 % slučajeva dokazana je korelacija između nalaza imunoenzimnim testom i umjetnom probavom. Nije utvrđena korelacija između ekstinckijske vrijednosti i stvarnog broja ličinki u gramu mišićnog tkiva.

Imunoenzimski test bi se zbog svoje visoke osjetljivosti mogao primjenjivati u endemskim područjima, temeljem čega bi se *ante mortem* izdvojile sumnjive životinje, i pojednostavnila postmortalna pretraga preostalih svinja. Primjena ove metode bi pridonijela eradikaciji trihineloze svinja na način da bi se najveći dio sumnjivih svinja morao zaklati u kontroliranim uvjetima registriranih klaonica, čime bi se rizici širenja uslijed neadekvatne sanitacije pro-

stora klanja sveli na minimum, a time i lanac daljnjeg širenja ove bolesti.

## SUMMARY

### **USE OF ELISA FOR DETECTION OF TRICHINELLA SPIRALIS DURING VETERINARY-SANITARY INSPECTION OF MEAT OF PIGS**

*Epizootiological situation with trichinellosis of pigs in the Republic of Croatia, especially in its Eastern counties, is not favourable. The currently prescribed official method of classical trichinelloscopy, with respect to its sensibility, can prevent the infection of people, but it is definitely insufficient for an efficient prevention of the spreading chain of trichinellosis. ELISA, as a more sensitive method of inspection, has to find its place in epidemiological researches and monitoring of pig breeding in some regions of Croatia, as well as in individual farm breeding, in order to determine the epizootiological status of the pig population that is being monitored. In this way it would be possible to separate all suspicious pigs while alive (positive, false-positive, but false-negative, too), and the remaining part of the population could be then slaughtered in the registered slaughter-houses, as well as on family farms, without fear that the infected pigs would be overlooked because it is beyond the detecting possibilities of classical trichinelloscopy.*

*The introduction of ELISA on a range of pig slaughters as the only method of inspection is not possible, firstly because of the occurrence of a smaller number of falsely negative animals, which, in epidemiological sense, represent a great risk in the spreading chain of this disease, which can lead in certain circumstances to infection of people.*

**Key words:** ELISA, trichinellosis, diagnostic

## LITERATURA

- Arakawa, A., A.C. Todd (1971):** Comparative development of temperate zone and arctic isolates of *Trichinella spiralis* in the white mouse. *Journal of Parasitology* 57, 526-530.
- Beus, A. (1999):** Trihinelozu u čovjeka. *Praxis veterinaria*, 69-76.
- Chute, R.M., D.B. Covalt (1960):** The effect of body temperature on the development of *Trichinella spiralis* in bats. *Journal of Parasitology* 46, 852-855.
- Dupouy-Camet, J., C. Soule, T. Ancelle (1999):** Is a human trichinellosis an emerging zoonosis in the European community. *Helminthologia* 36: 201-204.
- Gamble, H.R., D. Rapić, A. Marinculić, K.D. Murrel (1988):** Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Veterinary Parasitology* 30, 131-137.
- Gamble, H.R. (1996):** Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *Journal of Food Protection* 59, 295-298.

**Gamble, H.R. (1998):** Sensitivity of artificial digestion and enzyme immunoassay methods of inspection for trichinae in pigs. *Journal of Food Protection* 61, 339-343.

**Kapel, C.M.O., H.R. Gamble (2000):** Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *International Journal of Parasitology* 30, 215-221.

**Monroy, H., M. Flores-Trujillo, E. Benitez, C. Arriaga (2001):** Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. *Parasite* 8, 249-251.

**Nagano, I., Z. Wu, A. Matsuo, E. Pozio, Y. Takahashi (1999):** Identification of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. *International Journal of Parasitology* 29, 1113-1120.

**Noeckler, K., E. Pozio, W.P. Voigt, J. Heidrich (2000):** Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary parasitology* 93, 335-350.

**Owen, R. (1835):** Description of a microscopic toad infesting the muscles of the human body. *Trans. Zool. Soc. London*, 1:315-323.

**Pozio, E., G. La Rosa, P. Rossi, R. Fico (1989):** Survival of *Trichinella* muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. *Journal of Parasitology* 75, 472-473.

**Pozio, E., G. La Rosa, K.D. Murrel, J.R. Lichtenfels (1992):** Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology* 78, 654-659.

**Pozio, E., G. La Rosa, W. Mignone, M. Amati, C. Ercolini (1992a):** Survival of muscle larvae of *Trichinella* britovi in frozen muscle tissues of wild boar. *Arch. Vet. Ital.* 43, 57-60.

**Pozio, E. (1998):** *Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact.* *Parasitology today* 14, 35-38.

**Pozio, E., G. La Rosa (2000):** *Trichinella murreli* n. spp.: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *Journal of Parasitology* 86, 134-139.

**Ritterson, A.L. (1959):** Innate resistance of species of hamster to *Trichinella spiralis* and its reversal by cortisone. *Journal Infect. Dis.* 105, 253-266.

**Ruitenbergh, E.J., A. Steerenberg, B.J. Brosi, J. Buys (1974):** Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bull. W.H.O.* 51, 108-109.

**Sukhedo, M.V.K., E. Meerovitch (1977):** Comparison of three geographical isolates of *Trichinella*. *Canadian Journal of Zoology* 55, 2060-2064.

**Theodoropoulos, G., C.M.O. Kapel, P. Webster, L. Saravanos, J. Zaki, K. Koutsotolis (2000):** Infectivity, predilection sites and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. *Parasitology Research*. 86, 401-405.

**Van Knapen, F. (2000):** Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. *Veterinary Parasitology* 93 (3-4): 385-392.

**Wee, S.H., C.G. Lee, H.G. Joo, Y.B. Kang (2001):** Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Trichinella spiralis* antibodies and the surveillance of selected pig breeding farms in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 39, 261-264.

Prispjelo/Received 4.1.2007.

Prihvaćeno/Accepted 18.1.2007. ■

# POSTUPAK BOKONZERVIRANJA U PROIZVODNJI FERMENTIRANIH KOBASICA

Zdolec<sup>1</sup>, N., M. Hadžiosmanović<sup>1</sup>, L. Kozačinski<sup>1</sup>, Ž. Cvrtila<sup>1</sup>, I. Filipović<sup>1</sup>

## SAŽETAK

Proizvodnja zdravstveno ispravnih i kvalitetnih animalnih namirnica osniva se na primjeni suvremenih higijensko-tehnoloških postupaka. U okviru tzv. zaštitnog koncepta primjenjuju se zaštitne kulture mikroorganizama tj. antagonističke kulture koje inhibiraju patogene mikroorganizme i/ili produžuju održivost hrane uz istovremeno očuvanje

senzornih svojstava proizvoda. Uz inhibicijsko djelovanje organskih kiselina na patogene mikroorganizme, posebice gram-negativne bakterije, drugi vid antagonizma očituje se u sintetiziranju antimikrobnih peptida ili proteina – bakteriocina. Primjena sojeva koji sintetiziraju bakteriocine (bakteriocinogeni sojevi) kao zaštitnih kultura te izravna primjena spomenutih tzv. prirodnih zaštitnih tvari

<sup>1</sup> Nevjio Zdolec, dr.vet.med., znanstveni novak - asistent, dr.sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; dr. sc. Lidija Kozačinski, izvanredni profesor, dr. sc. Željka Cvrtila, viši asistent; Ivana Filipović, dr. vet. med, znanstveni novak – asistent; Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, Zagreb; kontakt e-mail: nzdolec@vef.hr