

PRIMENA IMUNOHISTOHEMIJSKIH METODA U
DIJAGNOSTICI SARKOCISTIOZE GOVEDA*
*IMPLEMENTATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS
IN DIAGNOSTICS OF BOVINE SARCOCYSTOSIS*

Zorica Novaković, Sofija Katić-Radivojević, Vera Todorović**

Ispitivanje sarkocistioze goveda obavljeno je na tri starosne kategorije goveda primenom direktnih i imunohistohemijskih metoda. Primenjene su direktne metode kompresije, digestija tripsinom i histološka metoda, a od imunohistohemijskih metoda korišćene su peroksidaza anti-peroksidaza (PAP), visoko senzitivna streptavidin biotin imunoperoksidaza kompleksna tehnika (LSAB +) i indirektna imunofluorescencija (IF).

Primarni antiserum kunića dobijen na zoite *Sarcocystis cruzi* syn. *S. bovicanis* korišćen je za sva imunohemijska i imunohistohemijska istraživanja. Za određivanje unakrsne reaktivnosti korišćen je kao primarni antiserum kunića na antigene zoita *S. ovifelis*. Oba primarna antiseruma proizvedena su u laboratoriji, zbog nedostatka komercijalnih preparata na tržištu.

Procena osetljivosti, specifičnosti i efikasnosti imunohistohemijskih metoda izvedena je na bazi poređenja sa direktnim metodama: kompresije, digestije tripsinom i histološkom metodom. Primenjene imunohistohemijske analize su vrlo specifične u dokazivanju sarkocistioze kod goveda, posebno LSAB* tehnika, a po osetljivosti u otkrivanju ove infekcije slične su metodi digestije tripsinom. Dobijeni antiserum kunića na antigene zoita *S. bovicanis* dao je dobre rezultate u dijagnostikovanju homologne vrste. Dokazana unakrsna reaktivnost homolognih i heterolognih antiseruma i antigena, kao imunohemijska reakcija potpunog identiteta u jednom delu antigene strukture, ustanovljena je kod primarnog antiseruma kunića na zoite *S. ovifelis*, što ukazuje da se

* Rad primljen za štampu 30. 6. 2006. godine

** Dr Zorica Novaković, Uprava za veterinu, Ministarstvo poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva R Srbije; dr Sofija Katić-Radivojević, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; dr Vera Todorović, IMI - Institut za medicinska istraživanja, Beograd

i heterologni antiserumi mogu da koriste u imunohistohemijskim reakcijama dijagnostikovanja sarkocistioze goveda.

Ključne reči: goveda, sarkocistoza, dijagnostika, imunohistohemijska metoda

Uvod / Introduction

Paraziti – protozoe koji stvaraju tkivne ciste su uzročnici zoonoza koji intracelularnim parazitizmom omogućavaju sebi biološki ciklus razvoja uglavnom preko lanca ishrane u prirodi. Najzastupljenije vrste iz ove grupe protozoa su kod čoveka i životinja **Toxoplasma gondii**, kao i mnogobrojne vrste iz roda **Sarcocystis**.

Sarkocistioza je jedna od najrasprostranjenijih zooantropozoonoza u svetu [9]. Razlog tome je nesumnjivo obligatni dvodomaćinski biološki ciklus koji ima uzročnik u prirodi. Ciklusom su obuhvaćeni veliki broj vrsta mesojeda i svaštojeda (kao pravi domaćini), i svaštojeda i biljojeda (kao prelazni domaćini) ove protozoe, pri čemu čovek može da bude i pravi i prelazni domaćin zavisno od vrste kojom se inficira [35]. Uzročnici iz roda **Sarcocystis** koji formiraju ciste u mišićnom i nervnom tkivu opisane su kod skoro svih vrsta domaćih i divljih sisara i ptica [7, 35], pa čak i kod velikog broja vrsta vodozemaca, gmizavaca i riba [5, 6]. Do sada je u literaturi opisano više od 400 vrsta iz ovoga roda, od kojih je dvodomaćinski ciklus razvoja objašnjen samo za oko 50 vrsta u prirodi [9].

Generalno posmatrano rasprostranjenost ove infekcije kod pravih domaćina je niska i prema velikom broju istraživanja u svetu kod mačaka je od 4 do 5 posto, kod pasa oko 14 do 15 posto i oko 7 posto kod ljudi. Nasuprot ovim podacima infekcije prelaznih domaćina ustanovljene su u visokom procentima, od 37 do 100 posto pregledanih životinja, što zavisi od vrste životinja, načina ishrane i držanja, uzrasta, imunog statusa, i drugih činilaca [40, 9, 10, 11, 12].

Pored cista u mišićima ciste se kod ovoga uzročnika mogu da stvore i u nervnom tkivu ptica i konja [27, 17, 18, 26], izazivajući oštećenja ovoga tkiva i zapaljenjske reakcije. Kod ljudi uzročnik može da se razmnožava u enteralnoj fazi (kao kod pravih domaćina – gametogonija i sporogomija), ukoliko su inficirani ingestijom sarkocista u termički nedovoljno obrađenom mesu goveda vrstom **S. bovihominis** [Dubey, 1976], i / ili **S. sui hominis** [39] koja se nalazi u mišićnom tkivu svinja. Mišićne ciste kod ljudi ustanovljene **post mortem** na obdukciji su vrsta **S. lindermani**, a opisane su, uglavnom, često u zemljama Jugoistočne Azije i Kine i do 35 posto pregledanih leševa ljudi. Korišćenjem serološkog dijagnostikovanja kod ljudi ukazano je da ova infekcija, uglavnom, ide sa kliničkim simptomima miozitisa i encefalomijelitisa, često udružena sa drugim infekcijama [1, 2, 3, 9]. Ispitivanjem 341 seruma ljudi suspektnih na toksoplazmozu, anti- **Sarcocystis**- antitela su ustanovljena od 22 do 44,4 posto pregledanih seruma ljudi. Metodom digestije tripsinom 112 uzoraka mišićnog tkiva ljudi, cistozoiti ove protozoe

ustanovljeni su u četiri slučaja. Kod ove vrste mišićne sarkocistioze ljudi nije do sada poznat pravi domaćin u biološkom ciklusu u prirodi [9]. Novija istraživanja sarkocistioze ljudi ukazuju da je potvrđeni toksin-sarkocistin glikoprotein, koji je izolovan iz cistozoitne ove protozoe. Ovaj toksin, za koji je utvrđeno da je termolabilan i neurotropan [38, 4], stimuliše stvaranje tumor-nekrozis faktora i da na taj način učestvuje u procesu kancerogeneze [29, 9]. Takođe je eksperimentalno dokazano da sarkocistozu kod životinja u tovu (junad) prati smanjenje prirasta, odnosno telesne mase i do 25 posto, što se objašnjava uticajem uzročnika preko hormona rasta na rast i iskorišćavanje hrane kod ispitivanih životinja, mada se mehanizam delovanja još nije razjasnio [13, 14, 9]. Ljudi i životinje mogu da se inficiraju ovim uzročnikom i kongenitalnim putem [25, 27, Dubey, 1996].

Rasprostranjenost ove infekcije u svetu ukazuje da mali broj inficiranih pravih domaćina omogućava visokoprocentnu infekciju prelaznih domaćina u prirodnim uslovima. Razlozi za ovu pojavu mogu da budu različiti: vrlo mala vrsna specifičnost pravih domaćina u odnosu na prelazne, pravi domaćini sporo i dugo-trajno izlučuju sporociste-oociste (do nekoliko meseci permanentno), slobodno kretanje u prirodi većine domaćih i divljih mesojeda, velika otpornost oocista-sporocista u prirodi na razne fizičke i hemijske faktore, izlučivanje velikog broja oocista-sporocista koje su u momentu izlučivanja već infektivne [15, 28].

Sve ove činjenice navode na zaključak da je rasprostranjenost ove infekcije kod ljudi i životinja vrlo velika zahvaljujući sposobnosti uzročnika da se u pravom i prelaznom domaćinu razmnožava u vidu polimorfni oblika, a da se pri tome izbegnu uticaji faktora spoljašnje sredine na njegovo umnožavanje.

Za dokazivanje uzročnika kod prelaznih domaćina koriste se mnogobrojne direktne i indirektno dijagnostičke metode. Direktne metode (metoda digestije tripsinom, kompresiona metoda i histološke metode) nisu dovoljno precizne zato što nisu u potpunosti poznata predilekciona mesta za razvoj parazita, posebna poteškoća je kod slabih infekcija, kao i zbog uzoraka male veličine [9]. U serološkoj dijagnostici infekcije uzrokovane parazitom **Sarcocystis** najčešće se koriste test indirektno fluorescencije – IFAT [3, 4, 39, 40, 22, 23], test indirektno hemaglutinacije – IHA test [24, 42, 20, 21, 22], a takođe i ELISA test [16, 36] i dot-ELISA [40]. Veliki problem u primeni seroloških testova je nedostatak komercijalnih i standardizovanih antigena u testovima, već ih najčešće za potrebe istraživanja proizvode same laboratorije koje se bave sarkocistozom.

Zbog savladavanja problema u vizualizaciji i identifikaciji vrsta protozoa na histološkim presecima, imunohistohemijske metode bojenja dobijaju sve veći značaj. U našoj zemlji za sada nema podataka o primeni ovih metoda dijagnostikovanja kod ljudi i životinja, čije se meso koristi za ishranu ljudi. Zbog mikroskopskih veličina i intracelularne lokalizacije proliferativnih oblika **Sarcocystis spp.** i njihove relativno teške kultivacije u laboratorijskim uslovima, razvoj imunodijagnostičkih postupaka među kojima su serološke i imunohistohemijske analize, veoma je značajan za dokazivanje navedenih infekcija, posebno sa stanovišta ove zoonoze koja nije dovoljno proučena na našim prostorima.

Materijal i metode rada / Materials and methods

Eksperimentalne životinje / Experimental animals

Dijagnostikovanje sarkocistioze obavljeno je na govedima (30 teladi, 35 junadi i 35 odraslih goveda) zaklanih na klanicama, a koja su poticala sa Šabačkog i Sremsko-Mitrovačkog okruga.

Za dokazivanje vrsta iz roda **Sarcocystis** iz muskulature ispitivanih kategorija goveda, obavljen je biološki ogled na pet pasa i tri mačke, uzrasta od pet nedelja. Od ukupnog broja pasa i mačaka, za biološki ogled korišćena su četiri psa i dve mačke, dok su kao kontrolne životinje u ogledu bile jedan pas i jedna mačka. Ove životinje poticale su iz individualnog uzgoja.

Pre stavljanja u ogled životinje su boravile 21 dan u karantinu, tokom kojeg su dehelmintisane i svakodnevno kontrolisane na prisustvo parazita. Životinje su hranjene gotovom hranom za pse i mačke „Chappy” i „Wiscas”, držane u kavezima uz odgovarajuće zoohigijenske mere.

Posle završetka karantina eksperimentalne životinje inficirane su hranjenjem svežim mesom goveda koje je sadržavalo 630 sarkocista po gramu muskulature, dok su kontrolne životinje držane i hranjene kao u karantinu tokom 75 dana, koliko je trajao eksperiment. U toku eksperimenta svakodnevno je obavljan koprološki pregled na prisustvo oocista protozoa i drugih parazitoloških elemenata. Od jedanaestog dana posle prve infekcije psi su počeli da izlučuju oociste / sporociste sve do 75. dana kada su sve životinje žrtvovane.

Koprološki pregled na oociste / sporociste **Sarcocystis spp.** rađen je po postupku flotacije Rommela i saradnika [34], rezultati flotacije posmatrani su korišćenjem svetlosnog mikroskopa uz povećanje x100.

Kod žrtvovanih životinja (pasa i mačaka) ogledne i kontrolne grupe, tanka creva su ispitivana na prisustvo enteralnih razvojnih oblika ovih protozoa po metodi Dubeyja [9]. Pored toga, histološkim ispitivanjem na parafinskim presecima uzoraka duodenuma, jejunuma i ileuma bojenim Hematoksilinom – eozinom, u crevima su dokazivani razvojni oblici **Sarcocystis spp.**

Priprema antigena Sarcocystis spp. i dobijanje antiseruma

Preparation of Sarcocystis spp. antigen and obtaining of antiserum

Polazni materijal za izolovanje antigena **Sarcocystis ovifelis**, bile su makrociste iz jednjaka kod ovaca, prema opisu postupka izolovanja i prečišćavanja antigena zoita ove protozoe [20]. Muskulatura dijafagme, srca i interkostalnih mišića goveda, bila je polazni materijal za izolovanje mikrocista **Sarcocystis bovicanis**, a postupak izolovanja i prečišćavanja zoita ove vrste iz goveđeg mesa obavljeno je postupkom digestije Dubeyja i sar [10].

Da bi se dobili primarni antiserumi koji bi se koristili u imunohistohemijskim metodama, imunizacija je izvedena na kunićima po postupku Habroe i Ingrida [19] i Dubeyja i sar [10]. Inokulacija je izvedena potkožno sa 0.2 mg antigena. Busterizacija je rađena antigenom u kompletnom Freundovim adjuvansom.

Krv je od kunića uzimana punkcijom iz srca kod delimičnog ili potpunog iskrvarenja. Izolovani serum se dalje čuvao na temperaturi od -20°C stepeni do vremena upotrebe.

Tabela 1. Pregled primarnih i sekundarnih antiseruma korišćenih u odgovarajućim imunohistohemijskim tehnikama primenjenim za dokazivanje *Sarcocystis spp.* u inficiranim mišićima goveda /

Table 1. Review of primary and secondary antiserums used in corresponding immunohistochemical techniques applied for proving *Sarcocystis spp.* in infected cattle muscles

Kataloški broj – proizvođač / Catalogue number – Manufacturer	Antiserum (primarni i sekundarni) / Antiserum (primary and secondary)	Razblaživač – razređenje / Solvent dilution	Imunohisto- hemijska tehnika / Immunohistochemi- cal technique
Katić-Radivojević Sofija 1/606; INEP Zemun	Kunićev antiserum na <i>S. bovicanis</i> zoite / <i>Rabbit antiserum to</i> <i>S. bovicanis</i> zoites	PBS, pH 7.4 sa (with) 1% BSA (1 : 100)	IF
	Ovca anti-kunićev IgG- konjugovan FITC-om <i>Sheep anti-rabbit</i> <i>IgG-conjugated with FITC</i>	PBS, pH 7.4 sa (with) 1% BSA (1 : 20)	
Katić-Radivojević Sofija A 509; DAKO Co, Denmark	Kunićev antiserum na <i>S. bovicanis</i> zoite <i>Rabbit antiserum to</i> <i>S. bovicanis</i> zoites	PBS, pH 7.4 sa (with) 1% BSA (1 : 100)	PAP
	Svinjski anti-kunićev IgG <i>Swine anti-rabbit IgG</i>	PBS, pH 7.4 sa (with) 1% BSA (1 : 100)	
Katić-Radivojević Sofija KO 690, DACO Co, Denmark	Kunićev antiserum na <i>S. bovicanis</i> zoite / <i>Rabbit antiserum to S. bo-</i> <i>vicanis</i> zoites	PBS, pH 7.4 sa (with) 1% BSA (1 : 500)	DAKO LSAB+ kit
	Biotinizirani anti-kunićevi imunoglobulini / <i>Biotinized anti-rabbit</i> <i>immunoglobulins</i>	Fabrički prediluirano <i>Prediluted product</i>	

Metode ispitivanja / Investigation methods

Direktne metode dijagnostikovanja sarkocistioze goveda: metoda kompresije, histološka metoda i metoda digestije tripsinom rađene su po opisu Lunde i Fayera [24] i Novaković [30].

Imunohistohemijske metode koje su primenjivane u dijagnostici sarkocistioze kod goveda rađene su prema preporuci firme DAKO [8, 33, 37].

Tehnika indirektno imunofluorescencije (IF) primenjena je modifikovana tehnika po opisu Osborna i Isenberga [31].

Peroksidaza – antiperoksidaza (PAP) metoda rađena je kao trostepena indirektna PAP procedura po Stenbergu [8].

LSAB + tehnika je DAKO LSAB + kit, obeležen peroksidazom, bazira se na SAB (streptavidin biotin) metodi. Jak afinitet avidina za biotin, čine ovu metodu senzitivnijom od svih ranije opisanih direktnih ili indirektnih imunohistohemijskih postupaka.

Specifične kontrole u toku imunohistohemijskih procedura / Specific controls during immunohistochemical procedures

Kao pozitivne kontrole služili su uzorci tkiva mišića inficiranih goveda, koji sigurno sadrže sarkociste **S. bovicanis**. Ovi uzorci su procesirani na isti način kao i ispitivani uzorci koji sadrže antigene koje je moguće vizuelizovati primenjenim tehnikama. Kao negativna kontrola služili su uzorci tkiva koji ne sadrže antigene koji se ispituju (peritonealno masno tkivo). Kontrola reagenasa je obavljena na dodatnoj pločici sa ispitivanim tkivom tretiranim neimunim serumom umesto primarnog antitela.

Rezultati rada i diskusija / Results and discussion

Rezultati-biološkog oglada radi dokazivanja vrste uzročnika iz roda *Sarcocystis* iz muskulature goveda, potvrdili su da se radi o vrsti *S. bovicanis*, na bazi nalaza da su samo inficirani psi u ogledu izlučivali oociste i/ili sporociste izmetom od 11. dana posle infekcije, što nije bio nalaz kod inficiranih mačića. Slične rezultate nalaza u biološkom ogledu imali su i drugi autori [9, 10, 11, 17].

U ispitivanju rasprostranjenosti sarkocistioze goveda primenjenim direktnim i imunohistohemijskim metodama, ustanovljeno je da je ona prisutna u 35 posto pregledanih grla, a njena prevalencija, zavisno od starosne kategorije goveda, prikazana je u tabeli 2. Jasno se uočava da na rezultate prevalencije sarkocistioze goveda, starost goveda ima uticaja na učestalost pojavljivanja ove infekcije. Ovi rezultati slažu se sa nalazima i drugih autora za goveda i druge vrste životinja u prirodi [3, 7, 9, 10, 11, 15, 20, 34, 40].

Primenom direktnih metoda najniži stepen prevalencije ustanovljen je metodom kompresije, a najviši metodom digestije tripsinom (tabela 2), što se podudara sa nalazima mnogobrojnih autora [9, 10, 11, 12, 15, 22, 24, 34, 35, 39].

Ispitujući predilekciona mesta u muskulaturi goveda ustanovljeno je da se sarkociste kod goveda najčešće nalaze u muskulaturi dijafragme, zatim jednjaka, a ređe u muskulaturi interkostalnih mišića i srčanom mišiću, nezavisno da li se primenjuju direktne (digestija) i/ili imunohistohemijske metode (tabele 6 i 7). Ovi rezultati nalaza sarkocista u predilekcionim mestima su isti kod svih kategorija goveda koja su ispitivana i slažu se sa do sada objavljenim radovima o sarkocistiozi kod goveda i ovaca [3, 4, 6, 9, 10, 11, 20, 21, 22, 24, 28]. Predilekciona mesta sarkocista kod ljudi, konja, divljih životinja i zmija su različita u odnosu na preživare [1, 2, 5, 6, 12, 17, 18].

Tabela 2. Sarkocistioza goveda po kategorijama utvrđena metodom digestije tripsinom
Table 2. Sarcocystosis in cattle according to categories established by trypsin digestion method

Kategorija / Category	Ukupno pregledano / Totally examined	Pozitivni / Positive	Procenat / Percent %
Telad / Calves	30	2	6,66
Junad / Young cows	35	13	37,14
Odrasli / Adult animals	35	20	57,14
Ukupno / Total	100	35	35,00

Tabela 3. Sarkocistioza goveda po kategorijama utvrđena metodom kompresije
Table 3. Sarcocystosis in examined cattle according to categories established by compression method

Kategorija / Category	Ukupno pregledano / Totally examined	Pozitivni / Positive	Procenat / Percent %
Telad / Calves	30	0	0
Junad / Young cows	35	2	5,71
Odrasli / Adult animals	35	2	5,71
Ukupno / Total	100	4	4,00

Tabela 4. Sarkocistioza pregledanih goveda po kategorijama histološkom metodom
Table 4. Sarcocystosis in examined cattle by categories established by histological method

Kategorija / Category	Ukupno pregledani / Totally examined	Pozitivni / Positive	Procenat / Percent %
Telad / Calves	30	1	2,85
Junad / Young cows	35	3	8,57
Odrasli / Adult animals	35	5	14,28
Ukupno / Total	100	9	9

Ustanovljene razlike rezultata nalaza sarkocistioze u mesu goveda prikazane su u tabeli 5. Međutim, statistička značajnost razlika je ustanovljena samo u rezultatima dobijenih metodom kompresije i digestije tripsinom i to kod odraslih goveda i junadi. Nalazi značajnosti razlika rezultat, zavisno od primenjenih metoda dijagnostike su manje ispitivani, a dobijeni rezultati u saglasnosti su sa nekim rezultatima ranijih istraživanja [7, 10, 30].

Tabela 5. Prikaz statističke značajnosti razlika u dokazivanju sarkocistioze metodom digestije tripsinom, histološkom i kompresionom metodom kod različitih kategorija goveda / Table 5. Statistical significance of differences in proving sarcocystosis using method of trypsin digestion, histological method and compression method in different categories of cattle

Kategorija / Category	Broj grla / Number of examined animals	Digestija / Digest.	Histološka metoda / Histol. method	Kompresija / Compress.	Statistička značajnost / Statistical significance (p)
Telad / Calves	30	2	1	0	nsz / not st.sign.
Junad / Young cows	35	13*	2	3	p<0,01*
Odrasli / Adult animals	35	20*	4	2	p<0,01*
Ukupno / Total	100	35	7	5	

nsz = nema statističke značajnosti razlika / no statistical significance in differences

* razlike između histološke i kompresionne metode u odnosu na metodu digestije / differences between histological and compression method in relation to digestion method

Tabela 6. Nalaz sarkocista na različitim predilekcionim mestima kod ispitivanih kategorija životinja na osnovu digestije tripsinom

Table 6. Sarcocyst findings in different predilection sites in examined categories of animals based on trypsin digestion

Kategorija / Category	Broj grla / Number of examined animals	Broj pozitivnih uzoraka / Number of positive samples of			
		Dijafragma / Diaphragm	Jednjak / Oesophagus	Int. mišić / Intercostal muscles	Srce / Heart
Telad / Calves	30	2	1	0	0
Junad / Young cows	30	13	11	5	5
Odrasli / Adult animals	35	20	20	16	15
Ukupno / Total	100	35	32	21	20

Tabela 7. Prikaz efikasnosti uporednih metoda za dokazivanje infekcije sa *Sarcocystis* spp. u pojedinim predilekcionim mestima u kategoriji teladi
 Table 7. Efficacy of comparative methods for proving *Sarcocystis* spp. infection in certain predilection sites in young cows category

Predilekciono mesto / Predilection site	Digestija (broj uzoraka) Digestion	Histološka metoda / Hist. method	Kompresija / Comp.	Imunohistohemijske metode / Immunohistochemical methods		
				PAP	IF	LSAB+
Dijafragma / <i>Diaphragm</i>	2 (30)	1	0	1	1	1
Jednjak / <i>Oesophagus</i>	1 (30)	0	0	0	0	0
Inter. mišići / <i>Intercost.</i>	0 (30)	0	0	0	0	0
Srce / <i>Heart</i>	1 (30)	0	0	0	0	0

Literatura / References

- Bordoški A., Conić V.: Novija istraživanja sarkosporidioze ljudi, Acta parazitologica Yugoslavica, 4, 99-106, 1974. - 2. Bordjochki A., Conich V., Budimir Milica, Savin Z.: Etide serologique de la sarcosporidiose chez l'homme par la reaction du complement, proseeding of Second European Multicolloqui of Parasitology, Trogir, 43-47, 1975. - 3. Bordjochki A., Conitch V., Savin Ž., Khanfar H., Katich Sofija: Valeur de la fixation du complement et de l'immunofluorescence indirect dans la detection des anticorps specifiques de plusieurs especes de sarcosporidies, Bull. Acad. Vet. de France, 51, 189-195, 1978. - 4. Bordjochki A., Conich V., Savin Z., Katich Sofija, Khanfar H. M.: Les proprietes toxiques et immunogenes de la sarcocystine et sa sensibilite a des temperatures differentes, Bull. Acad. Vet. de France, 52, 423-427, 1979. - 5. Bledsoe B.: Sporogony of *S. idahoensis* in the gopher snake *Pituophis melanoleucus* (Dandini), J. Parasitol., 65, 875-879, 1979. - 6. Bledsoe B.: *S. idahoensis* Sp. n. in deer, mice, peramyscus maniculatus (Wagner) and gopher snakes, pituophis melanoleucus (Dandini), J. parasitology, 27, 93-102, 1980. - 7. Boch J., Supperer R.: 4. Auflage, Veterinarmedizinische Parasitologie, Verlage, Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1994. - 8. DAKO – Your Reference in Immunohistochemistry. A Guide to Demasking of Antigen on Formalin – Fixed, Paraffin- Embedded Tissue. II Edition. Schultz Grafisk A / S, Denmark, 1997. - 9. Dubey J. P., Speer C. A., Fayer R.: Sarcocystosis of Animal and Man, Boca Raton, Florida, 1989. - 10. Dubey J. P., Udtujan R. M., Cannon L., Lindsay D. S.: Condemnation of beef because of *Sarcocystis hirsuta* infection, JAVMA 196, 1095-1096, 1990. - 11. Dubey J. P.: *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other tissue cysts forming coccidia of humans and animals in: Parasitic Protozoa, Kreier J. P., 6: 1-158, (ed.) Academic Press, San Diego, CA, USA, 1993. - 12. Dubey J. P., Topper M. J., Nutter F. B.: Muscular *Sarcocystis* infection in a bear (*Ursus americanus*). J. Parasitol., 84, 452-454, 1998. - 13. Elasser T. H., Hammond A. C., Rumsey T. S., Fayer R.: Perturbed metabolism and hormonal profiles in calves infected with *Sarcocystis cruzi*. Domest. Animal. Endocrinology, 3, 277-298, 1986. - 14. Elasser T. H., Rumsey T. S., Hammond A. C., Fayer R.: Influence of parasitism on plasma concentration of growth hormone, somatomedin - C and somatomedin binding proteins in calve. J. Endocrinology, 115, 191-208, 1988. - 15. Fayer R., Lunde M.: Change in serum and plasma proteins and IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs, J. Parasitology, 63, 438-441, 1977. - 16. Gasbare L., Suter P., Fayer R.: Humoral and celular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. Amer. J. Vet. Res., 45, 1592-1596, 1984. - 17. Granstrom D. E., Giles R. C., Tuttle P. A., Williams M. N., Poonacha K. B., Petries-Murphy M. B.,

- Tramontin R. R., Swerczek T. W., Hong C. B., Rezabek G. B., Lyons E. T., Drugde J. H.: Immunohistochemical diagnosis of protozoan parasites in lesions of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 75-77, 1991. - 18. Granstrom D. E., Alvarez O., Dubey J. P., Comer P. F., Williams N. M.: Equine protozoal myelitis in Panamanian horses and isolation of *Sarcocystis neurona*. *J. Parasitol.*, 78, 909-912, 1992. - 19. Habroe N., Ingland A.: Isolation of immunoglobulins and estimation of antibody titre, *Scand. J. Immunol.*, 12 (Suppl. 1), 161-169, 1973. - 20. Katić-Radojević S., Ispitivanje mogućnosti dijagnostike sarkosporidioze domaćih životinja *in vivo*, Doktorska disertacija, Beograd, 1990. - 21. Katić-Radojević S., Đuričić B., Savin Ž., Dimitrijević D.: Primena reakcije IHA u dijagnostici sarkosporidioze ovaca, *Vet. glasnik*, 8-9, 699-705, 1990 a. - 22. Katić-Radojević S., Gadanski-Omerović G., Savin Ž.: Some diagnostic aspects of ovine sarcocystosis, *Acta veterinaria (Bgd)*, 41, 197-204, 1991. - 23. Katić-Radojević S., Gadanski-Omerović G.: Immuno-chemical and physico-chemical characterization of antigens of *Sarcocystis ovifelis*, *Acta Veterinaria (Bgd)*, 5-6, 46, 299-306, 1996. - 24. Lunde M. N., Fayer R.: Serologic test for antibody to sarcocystosis in cattle. *J. Parasitology* 63, 222-225. - 25. Mackie J. T., Rahaley R. S., Nugent R.: Suspected *Sarcocystis* encephalitis in a stillborn kid. *Aus. Vet. J.*, 69, 114-115, 1992. - 26. March A. E., Barr B. C., Madigan J., Lakritz J., Conrad P. A.: Sequence analysis and polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA from *S. neurona*. *Am. J. Vet. Res.*, 57, 975-981. - 27. Masri D., Lopez de Alida J., Dubey J. P.: *Sarcocystis neurona*- associated with ataxia in horses in Brazil. *Vet. Parasitol.*, 44, 311-314, 1992. - 28. Mc Kenna P. B., Charleston W. A.: The outdoor survival of *Sarcocystis gigantea* sporocysts. *Vet. Parasitol.*, 55, 1-2, 21-27, 1994. - 29. Montage T., Thietz H. J., Brose E., Liembetal C., Mann W., Hiepe F., Coupek J.: The mitogenicity of extracts from *S. gigantea* macrocysts is due to lectin(s). *Parasitol. Res.*, 74, 112-121, 1987. - 30. Novaković Z.: Sarkocistioza goveda u različitim uslovima držanja, Magistarski rad, Veterinarski fakultet, Beograd, 1997. - 31. Osborn M., Isenberg S.: Immunocytochemistry of frozen and of paraffin tissue sections. In *Cell Biology*, Celis J. E., ed. Second edition, Academic Press, San Diego, California, USA, 2, 486-492, 1998. - 32. Ouchterlony O.: Double diffusion in gel technique. *Prof. Alergy*, 5, 1-78, 1958. - 33. Pireli S. A., Roncador G., Ceccarelli C., Piccioli M., Briskomatis A., Sabattini E.: Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry comparison of different methods. *J. Pathol.*, 183, 116-123, 1997. - 34. Rommel M., Heydorn A. O., Gruber F.: Betrage zum Lebenszyklus der Sarkosporidien I. Die Sporocyste von *S. tenella* in ten fazes der Katze, *Berl Munch. Tierarztl Wschr.*, 85, 101-108, 1972. - 35. Smyth J. D.: Tissue cyst-forming coccidia in Introduction to animal parasitology, III edition, Cambridge University Press, 1994. - 36. Smith T. S., Herbert J. V.: Experimental microcysts sarcocystis infection in lambs: serology and immunohistochemistry. *Vet Rec.*, 119, 547-550, 1986. - 37. Shi R. S., Cote R. J., Young L. L., Taylor C. R.: Antigen retrieval immunohistochemistry: practice and development. *J. Histotechnology*, 20, 145-154, 1997. - 38. Senaud J., Vendrely R., Trounche P.: Sur la nature de la substance toxique des kystes de sarcosporidies du mouton active sur le lapin. *C.R. Acad. Sc. Paris*. 1968. - 39. Tadros W., Larman J.: Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst forming Eimeriid coccidia. *Adv. Parasitol.*, 20, 293-468, 1982. - 40. Tenter A. M.: Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Vet. Parasitol.*, 29, 89-104, 1988. - 41. Weibel E. R.: Stereological Methods, Academic Press, London. 1979. - 42. Weiland G., Reiter I., Boch J.: Möglichkeiten und Grenzen des serologischen Nachweises von Sarkosporidieninfektion. *Berl. Munch. tierarztl. Wschr.* 95, 378-392, 1982.

Zaključak / Conclusion

Dobijeni primarni antiserum kunića na zoite *S. bovicanis* pokazao se kao adekvatni serum za detekciju zoita u mišićnim sarkocistama goveda, što je potvrđeno u svim imunohistohemijskim postupcima koji su korišćeni u istraživanju. Unakrsna reaktivnost homolognih i heterolognih antiseruma i antigena postoji kao imunohemijska reakcija potpunog identiteta u jednom delu antigene strukture. Primenjene imunohistohemijske analize su osetljivije u otkrivanju učestalosti sarkocistioze goveda do histoloških metoda, i po osetljivosti su kao i metod digestije tripsinom. Najčešće predilekciono mesto nalaza sarkocista kod goveda su miškulatura dijafragme, jednaka i interkostalnih mišića. Infekcija je kod starijih goveda češće ustanovljena nego kod mlađih, kod svih metoda dijagnostike. Imunohistohemijske metode dijagnostike su po osetljivosti, specifičnosti i tačnosti dijagnostike kao i metod dijagnostike digestije tripsinom, ali daju mogućnost trajne dokumentacije i diferencijalne dijagnostike, i od posebnog su značaja za forenzičke slučajeve.

ENGLISH

IMPLEMENTATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS IN DIAGNOSTICS OF BOVINE SARCOCYSTOSIS

Zorica Novakovic, Sofija Katic-Radivojevic, Vera Todorovic

Bovine sarcocystosis was examined in three age categories of cattle using direct and immunohistochemical methods. The direct methods of compression, trypsin digestion and a histological method were applied, and the applied immunohistochemical methods included peroxidase anti-peroxidase (PAP), the highly sensitive streptavidin biotin immunoperoxidase complex technique (LSAB+) and indirect immunofluorescence (IF). Primary rabbit antiserum obtained for the zoites *Sarcocystis cruzi* syn. *S. bovicanis* was used for all immunochemical and immunohistochemical examinations. Cross reactivity was determined using primary rabbit antiserum to antigens of *S. ovifelis* zoites. Both primary antisera were produced in the laboratory, as no commercial preparations were available on the market.

The evaluation of the sensitivity and efficacy of the immunohistochemical methods was performed on the grounds of comparisons with the direct methods: compression, trypsin digestion and a histological method. The applied immunohistochemical analyses are very specific in proving sarcocystosis in cattle, especially the LSAB+ technique, and, according to their sensitivity in detecting this infection, they are similar to the method of trypsin digestion. The obtained rabbit antiserum against antigens of *S. bovicanis* zoites yielded good results in the diagnosis of the homologous species. Proven cross reactivity of the homologous and heterologous antisera and antigens, as an immunochemical reaction of complete identity in one part to the antigen structure, was established in primary rabbit antiserum to *S. ovifelis* zoites, which indicates that heterologous antisera can also be used in immunohistochemical reactions in the diagnostics of bovine sarcocystosis.

Key words: bovine sarcocystosis, diagnostic, immunohistochemical method

РУССКИЙ

ПРИМЕНЕНИЕ ИМУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ САРКОЦИСТОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Зорица Новакович, София Катич-Радивоевич, Вера Тодорович

Испытание саркоцистоза крупного рогатого скота сделано нами на три возрастные категории крупного рогатого скота применением прямых иммуногистохимических методов. Применены прямые методы коимпрессии, дигестия трипсином и гистологический метод, а из иммуногистохимических методов ползованы пероксидаза анти-пероксидаза (ПАП), высоко чувствительная стрептавидин биотин иммунопероксидаза комплексная техника (ЛСАБ+) и косвенная иммунофлуоресценция (ИФ). Первичный антисерум кроликов получен на зоиты *Sarcocystis cruzi syn. S. bovicanis* пользован для всех иммунохимических и иммуногистологических исследований. Для определения крестообразной реактивности пользован как первичный антисерум кроликов на антигены зоита *S. ovifelis*. Оба первичных антисерума произведены в лаборатории, из-за недостатка коммерческих препаратов на рынке.

Оценка чувствительности, специфичности и эффективности иммуногистохимических методов совершена на базе сравнения с прямыми методама: коимпрессии, дигестии трипсином и гистологическим методом. Применённые иммуногистохимические анализы очень специфические в доказывании саркоцистоза у крупного рогатого скота, отдельно ЛСАБ техника, а по чувствительности в открывании этой инфекции подобные методу дигестии трипсином. Полученный антисерум кроликов на антигены зоита *S. bovicanis* дал хорошие результаты в диагностике гемологического вида. Доказана крестообразная реактивность гомологических и гетерогомологических антисерумов и антигенов, как иммунохимическая реакция полного идентитета в одной части антигенной структуры, установлена нами у первичного антисерума кроликов на зоиты *S. ovifelis*, что указывает, что и гетерологические антисерумы могут пользоваться в иммуногистохимических реакциях диагностики саркоцистоза крупного рогатого скота.

Ключевые слова: саркоцистоза крупного рогатого скота, диагностика, иммуногистохимически метод