

Епизоотиолошка, серолошка и
молекуларна истраживања врста
рода *Trichinella*

Милена Живојиновић

VETERINARSKI SPECIJALISTIČKI INSTITUT "POŽAREVAC"

Tel/fax: +381(0) 12 554 840;
554 940;
554 941;
Dunavska 89
12000 Požarevac
Mail: povetinst@ptt.rs
www.vspipozarevac.com



ISTORIJAT

- Uredba o osnivanju veterinarske stanice dijagnostičkih stanica Sl.glasnik NRS br.11 od 22.03.1952. (Zajecar, Niš, Požarevac, Svetozarevo, Cacak i Šabac)



- 1953. u okviru sto carsko-veterinarske stanice formira se odeljenje dijagnostike zaraznih i parazitskih bolesti
- 1954. prerasta u samostalnu dijagnostičku stanicu a prvi upravnik bila je dipl.vet. Milanka Matejic -Đorđević koja 1960 - god. odlazi za asistenta na Veterinarski i Fakultet u Beogradu i kasnije postaje redovan profesor na Katedri za Patologiju



- 1964 – 1969. veterinarsko dijagnostička stanica radi u okviru Centra za Unapređenje Poljoprivrede Požarevac
- 1969. integriše se sa veterinarskim institutom u Beogradu i u njegovom sastavu ostaje do 1988. godine
- 1989-1992. regionalni veterinarski zavod „Požarevac“ kao samostalna institucija
- 1992. Veterinarski specijalistički institut „Požarevac“
- 2005. novi Zakon o veterinarstvu – Veterinarsko specijalistički zavod
- Decembra 2005.g. uspešno je realizovano uvođenje sistema menadžmenta kvalitetom u skladu sa SRPS ISO 9001:2001
- 2007.g. Sektor za laboratorijska ispitivanja VSI Požarevac dobija Sertifikat o akreditaciji broj 01-196, u skladu sa zahtevima standarda SRPS ISO 17025:2006
- Ukupno je akreditovano 36 laboratorijskih metoda

TERITORIJA

- VSI „Požarevac“ pokriva teritoriju od 5.113km²
 - Braničevski okrug (osam opština)
 - Podunavski okrug (tri opštine)
- Brojno stanje domaćih životinja
 - Goveda (oko 40.000 grla)
 - Ovce (oko 80.000 grla)
 - Koze (oko 5.000)
 - Svinje (200.000 - 250.000 grla)
 - Psi (>60.000 pasa)
 - Živina (1.500.000 - 2.000.000)

EPIZOOTIOLŠKO PODRUČJE VSI POŽAREVAC BRANIČEVSKI I PODUNAVSKI OKRUG (11 OPŠTINA SA 248 NASELJENIH MESTA)



DELATNOST VSI "POŽAREVAC"

- Pracenje epizootološke situacije
- Predlaganje mera za sprečavanje, otkrivanje, suzbijanje i iskorenjivanje zaraznih i parazitskih bolesti
- Laboratorijska dijagnostika u veterini
- Laboratorijska ispitivanja zdravstvene ispravnosti namirnica životinjskog porekla
- Mikrobiološki pregled hrane za životinje
- Sprovođenje mera za povećanje plodnosti životinja
- Promet vet. lekova i medicinskih sredstava

- Подручје Републике Србије чине 12 епизоотолошких јединица
- Центар сваке епизоотолошке јединице је подручни ветеринарски институт

EPIZOOTIOLŠKO PODRUČJE VSI POŽAREVAC BRANIČEVSKI I PODUNAVSKI OKRUG (11 OPŠTINA SA 248 NASELJENIH MESTA)



Veterinarski Specijalistički Institut
"Požarevac" Požarevac

SARADNJA

- Uprava za veterinu
- Terenska služba
- Republička veterinarska inspekcija
- Fakultet veterinarske medicine
- Naučni i Specijalistički veterinarski instituti
- ZZJZ "Požarevac"
- Farmeri i držaoci životinja
- Poljoprivredna služba
- Poljoprivredne škole
- Druge ustanove i organizacije (Stocarsko veterinarski centar Velika Plana, mlekarne, klanice, ergela i dr.)
- Sertifikacione kuće

VSI "POŽAREVAC" danas ... 2013.g.

- Redovno održavanje dva standarda ISO 9001:2008 i SRPS ISO/IEC 17025:2006
- Završene investicije (dogradnja prostorija i pomoćne zgrade)
- Ostvareno učešće kadrova na obukama i simpozijumima u inostranstvu
- Poslednjih 15 godina odbranjeno:
 - jedan specijalistički rad
 - tri magistarska rada
 - dve doktorske teze
- Postavljen web sajt instituta

Jedan od ciljeva poslovne politike jeste permanentno medijsko isticanje značaja rada i postojanja V.S.I. "Požarevac"



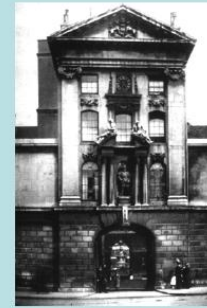
Историјски подаци (1)



Paget

- Доступни историјски списи говоре о причи која почиње једне давне фебруарске зиме 1835.године. James Paget...
- Своје откриће Owen коначно дефинише као паразит и даје му име *Trichinella spiralis*

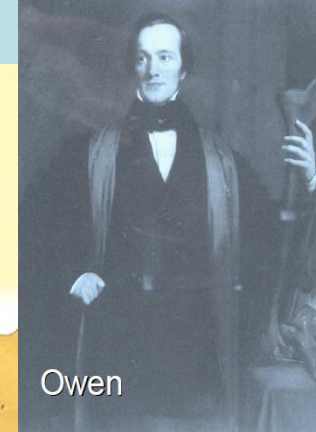
- Прича се из Уједињеног Краљевства сели у Немачку, где је Rudolf Virchow са својим сарадницима у периоду од 1850. до 1870.године низом лабораторијских експеримената успео да разјасни животни циклус паразита *Trichinella* (Campbell, W.C.1983)



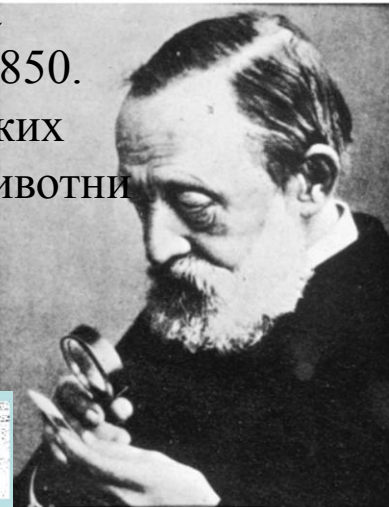
St. Bartholomew's Hospital
Est. 1123



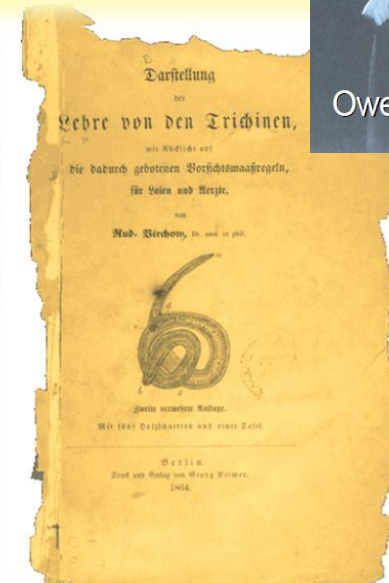
London Hospital Medical School
Est. 1785



Owen

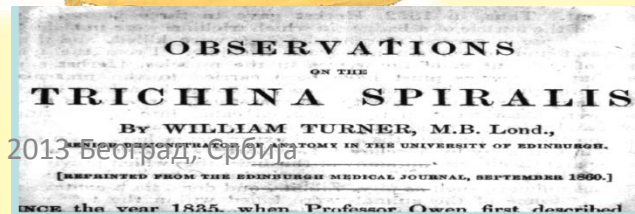


Rudolf Virchow



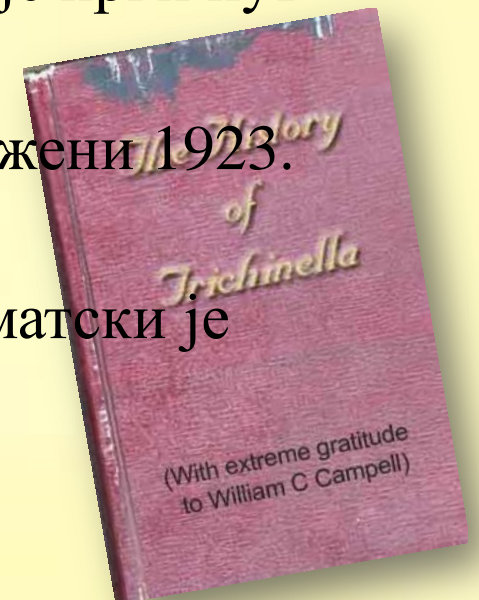
XXXV. Description of a Microscopic Entozoon infesting the Muscles of the Human Body.
By RICHARD OWEN, Esq., F.R.S. & Z.S., Assistant Conservator of the Museum of the
Royal College of Surgeons in London.

Communicated February 24, 1835.



Историјски подаци (2)

- Адаптација *Trichinella* на живот сисара, као домаћина је еволуционо врло стара (*Campbell, W.C. 1983*)
- Постоје подаци о налазу ларви *Trichinellae* у међуребарним мишићима египатских мумија из 1200. године пре Христа (*Superlovic K. et al., 2003*).
- У Србији трихинелоза код свиња откривена је први пут 1918. године
- први случајеви трихинелозе људи су забележени 1923. године (*Superlovic, 1995*)
- Контрола на кланицама у Југославији систематски је уведена 1958. године



Морфологија (1)



Одрастао мужјак 1.5mm ×36 мц

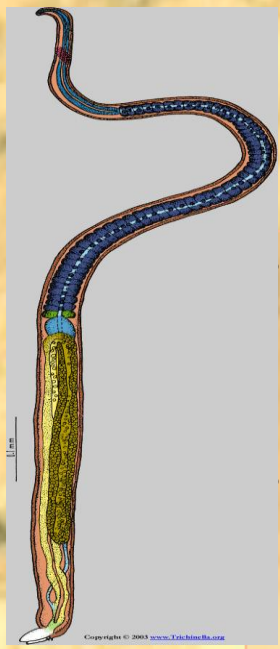
- Све врсте су морфолошки истоветне, тако да се на основу упознавања морфологије једне врсте може упознати морфологија свих осталих врста *Trichinella*
- То је типична нематода чији је предњи део тела тањи у односу на задњи, има глатку, прстенасту и прозачну кутикулу

- Одрасли мужјак и женка су диморфни
- Женка има већу дужину у односу на мужјака
- Поред разлике у дужини, мужјак има видно развијене органе за размножавање и посебно обликован реп који му омогућава држање за женку током парења
- Јајник, јајовод и материца представљају репродуктивне органе. У самој материци из јаја настају ларве, које кроз вулву излазе као новорођене ларве
- Мужјак има један тестис, који је окружен кутикулом
- Дигестивни тракт се састоји од усног отвора, који има стилету само током ране фазе развоја паразита



Одрасла женка 3mm ×36 мц

Морфологија (3)



Мужјак *Trichinella*

На једњаку, који се налази у предњем делу тела, налази се део налик бодезу, који омогућава продирање ларве у ћелију домаћина

У њему су смештене велике ћелије – стихоците, чији секрет имају велики значај у развоју клиничке слике трихинелозе

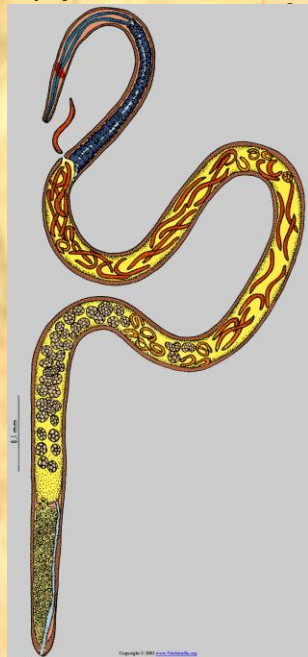
Секрети стихоцита мишићних ларви представљају антигене који се користе у имунодијагностици трихинелозе

Новоформирана ларва је дуга 80µм и широка 7-8µм

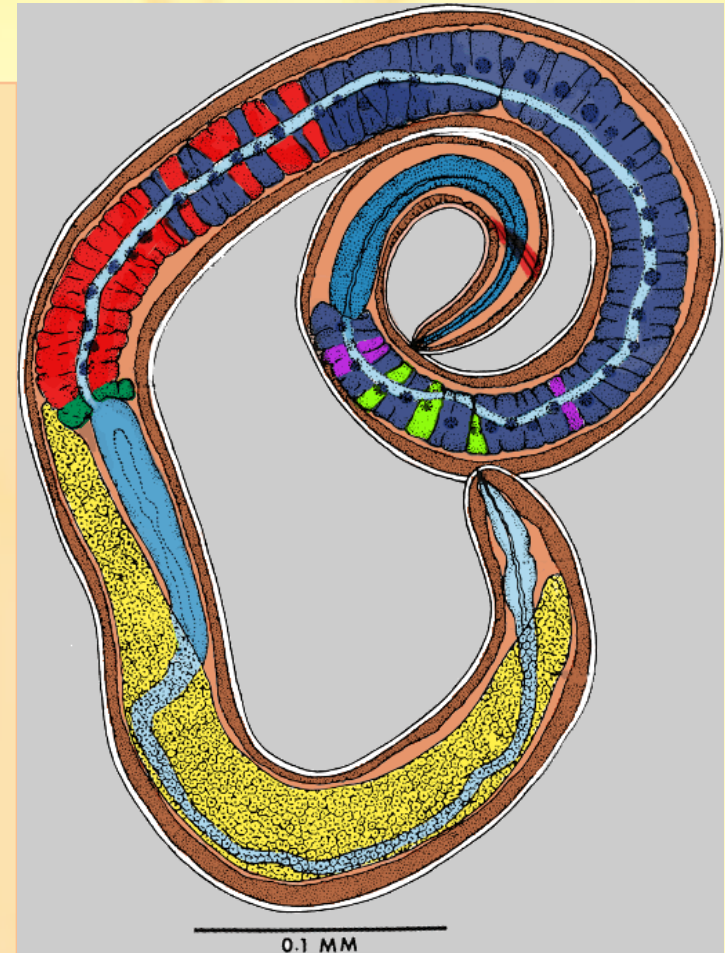
Инфективна ларва је облигатни интрацелуларни паразит

Дуга је 1 мм и има пречник од 36µм

Захваљујући овим димензијама све врсте генуса *Trichinella* су познате као примери највећих интрацелуларних паразита

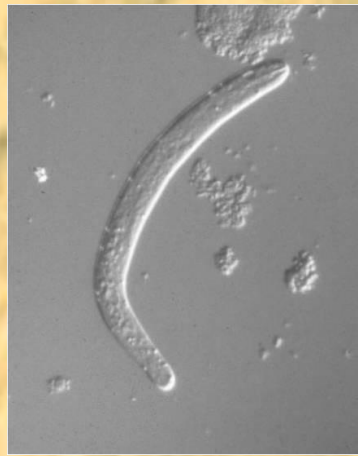


Женка *Trichinella*

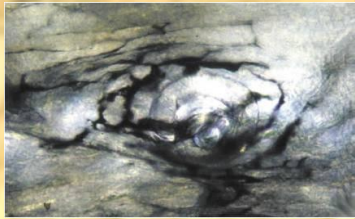


Инфективна мишићна *Trichinella* ларва

Морфологија (4)

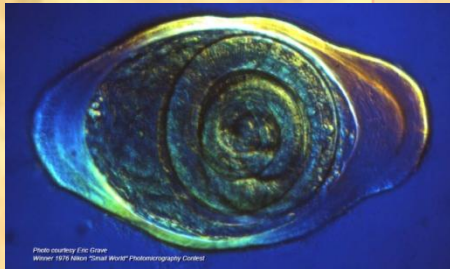


Новорођена ларва *T.spiralis* 70 ×7 mm



Комплекс ћелија-паразит *T.spiralis*.

- У литератури се користе одређени термини како би се дефинисале поједине фазе у току развоја паразита:
- **новорођена ларва (NBL New born larvae)** –новоформирана ларва коју је створила женка паразита (дужине 80µm до 120µm, ширине 5µm до 7µm), када не постоји могућност разликовања мужјака и женке
- **мишићна ларва (Л1)** - прва фаза развоја у мишићној ћелији, инфективна фаза (дужине 0.65-1.45mm, ширине 0.026-0.040mm ширине) која се дешава само после пенетрације ларве у цревну мукозу новог домаћина. Одређене морфолошке карактеристике омогућавају разликовање женке и мужјака
- **ћелија неговатељица** – паразитска мишићна ћелија у којој ларва изазива снажне морфолошке и физиолошке промене, присутна је и код инкапсулираних и код неинкапсулираних врста
- **капсула** – колагена структура која окружује комплекс ларва-ћелија неговатељица код инкапсулираних врста које паразитирају искључиво код сисара



Таксономска позиција рода *Trichinella*

- Род *Trichinella* у фамилији Trichinellidae, се сматра родом који је сестра *Trichuridae* (Capillariinae, Trichurinae и Trichosomoidinae)
- *Trichinella* припада по систематизацији Stewart, 2003

класи Adenophorea

поткласи Enoplia

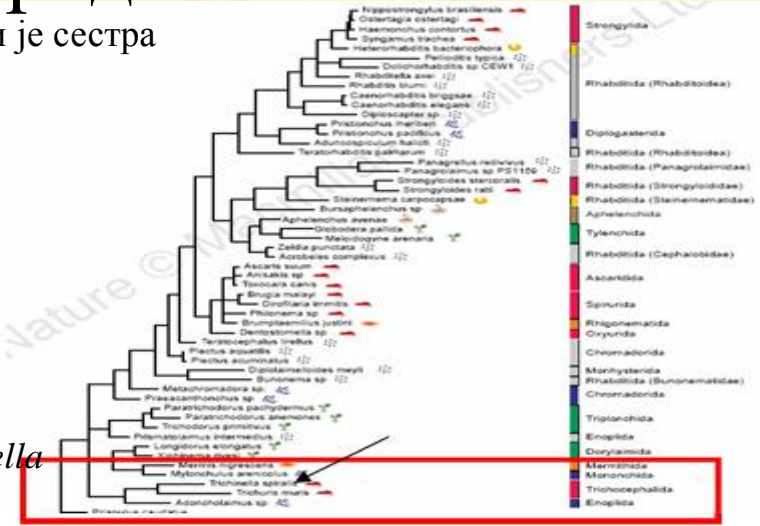
реду Trichurata

супефамилији Trichocephaloidea

фамилији Trichinellide

суперфамилији Trichinelloidea, којој припада *Trichinella*

Дијагностикује се филогенетски по шизостоми, регији жлезданог езофагуса и штапичастим тракама, структурама које нису познате код осталих нематода



Pozio, 2009

Таксономски подела	Домаћини	Распрострањеност
Инкапсулиране врсте	Сисари	Космополитска
<i>Trichinella spiralis</i>	Дивље и домаће свиње, месождери	Космополитска
<i>Trichinella nativa</i>	Дивљи месождери	Арктички и субарктички регион Америке, Азије и Европе
<i>Trichinella T6</i>	Дивљи месождери	Арктички и субарктички регион Америке
<i>Trichinella britovi</i>	Дивљи месождери, дивље и домаће свиње	Регион умерене климе Европе, западне Азије, северне и западне Африке
<i>Trichinella T8</i>	Дивљи месождери	Јужна Африка и Намибија
<i>Trichinella murrelli</i>	Дивљи месождери	Регион умерене климе северне Америке
<i>Trichinella T9</i>	Дивљи месождери	Јапан
<i>Trichinella nelsoni</i>	Дивљи месождери, ретко дивље свиње	Источна и јужна Африка
<i>Trichinella sp. T12</i>	Дивљи месождери	Јужна Америка
Врсте без капсуле	Сисари, птице и рептили	Космополитска
<i>Trichinella pseudospiralis</i>	Дивље и домаће свиње, сисари месождери и птице	Космополитска
<i>Trichinella papuae</i>	Дивље и домаће свиње, крокодили, гајени (фармски) гуштери, корњаче	Папуа-Нова Гвинеја, југо-источна Азија
<i>Trichinella zimbabwensis</i>	Крокодили, гајени (фармски) гуштери и сисари месождери	Део Африке јужно од Сахаре

Таксономска шема генуса *Trichinella* (Pozio E. et al. 2009)

Класификација узрочника трихинелозе

Таксономска подела (2)

- У току првих 150 година научног познавања паразита *Trichinella spp.* као узрочника трихинелозе код више од сто идентификованих врста сисара као домаћина, *T. spiralis* је била једини познат представник рода (*Campbell, 1983b*)
- Тек са развојем молекуларних дијагностичких метода, посебно ланчане реакције полимеразе (PCR), извршена је тачна таксономска подела паразита и дефинисани су остали родови (*Zarlenga et al., 1999*)
- Биохемијске методе које се заснивају на различитости ензима паразита у њиховом аминокиселинском саставу, што за последицу има постојање разлика у покретљивости у електрофоретском пољу, омогућавају разликовање врста *Trichinella* (*Zarlenga i La Rosa, 2000*)

Могућност заражавања једног домаћина са више врста *Trichinella* је описана у регионима у којима је присутан већи број врста овог паразита (*Pozio and Murrell, 2006*)

Разликују се две главне групе у генусу *Trichinella*:

1. једна која обухвата врсте које доводе до стварања капсуле у мишићном ткиву домаћина (*Pozio and Murrell, 2006*)
2. друга група којој припадају врсте које нису инкапсулиране у мишићном ткиву домаћина (*Pozio and Murrell, 2006*)

За сада је идентификовано девет врста и шест генотипова

Инкапсулиране врсте

- *Trichinella spiralis*
- *Trichinella nativa*
- *Trichinella britovi*
- *Trichinella murreli*
- *Trichinella nelsoni*
- *Trichinella 12*

Неинкапсулиране врсте

- *Trichinella pseudospiralis*
- *Trichinella papuae*
- *Trichinella zimbabwensis*

Trichinella spiralis

- Врста која је прва откривена
- Присутна и код домаћих и код дивљих животиња у природи, високо инфективна за лабораторијске животиње, веома често модел у разним биолошким истраживањима
- Ширењу овог паразита, заједно са домаћинима у великој мери је допринела колонизација Европљана на Амерички континент, Нови Зеланд, Хаваје и Египат у току XVI и XX века
- Слаба отпорност на ниске температуре је највероватнији разлог смањеног ширења унутар животињских врста које живе у хладнијем појасу Земље

- У многим деловима света, у трагању за храном, пре свега због могућности приступа отпадима на депонијама, близу људских насеља, где се одлажу отпади са кланица, ова врста је пренета на дивље животиње, као што су:

црни и бели медведи (*Ursus americanus*, *Ursus arctos*)

лисице (*Pseudolopex gracilis*, *Urocyon cinereoargenteus*, *Vulpes vulpes*),

вукови (*Canis lupus*)

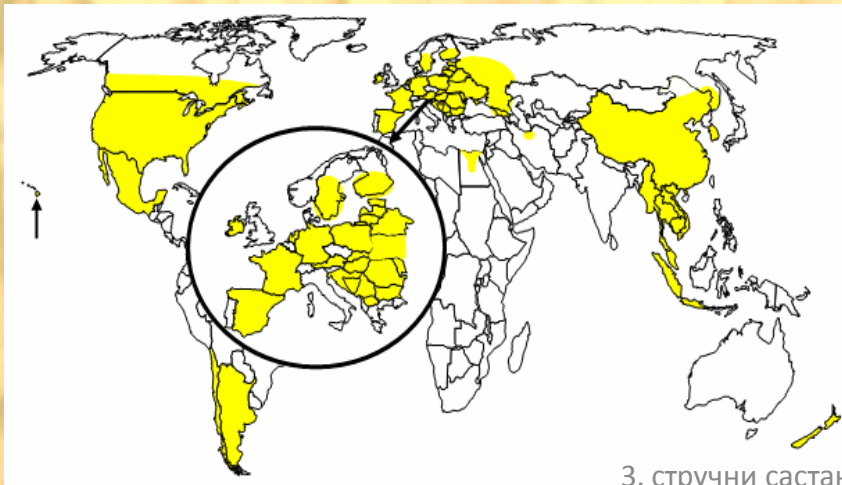
јазавци (*Meles meles*)

пуме (*Puma concolor*)

ракун (*Nyctereutes procyonoides*)

рис (*Lynx rufus*)

- На територији Америке, Европе и Азије *Trichinella spiralis* је паразит дивљих животиња који се одржава у природи у сивлатичном циклусу
- То је врста која је најчешћи етиолошки агенс у случајевима обољења трихинелозе људи и смртних случајева широм света.



World map of *T. spiralis* distribution-Pozio, 2009

Trichinella nativa (T-2)

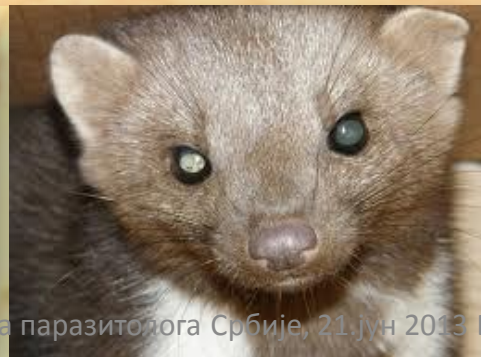
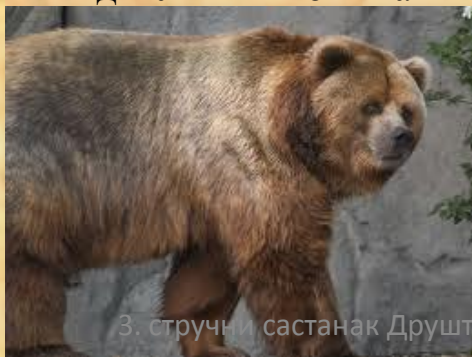
- У арктичком и субарктичком региону Америке, Европе и Азије је узročник трихинелозе људи и широко је распрострањена код дивљих животиња тих регија
- Основна биолошка карактеристика ове врсте је низак репродуктивни индекс код лабораторијских пацова, домаћих и дивљих свиња, као и висока отпорност на смрзавање када се налази у мишићима месоједа



- Пријемчиве врсте су:
 - копнени и морски месоједи који живе у арктичкој и субарктичкој регији: неколико врста куна (*Martes pennant*, *Martes martes*, *Martes zibellina*, *Meles metes*, *Gulo gulo*, *Musteta erminea*, *Mustela nivalis*)
 - арктичка лисица (*Alopex lagopus*)
 - црвена лисица (*Vulpes vulpes*)
 - вук (*Canis lupus*)
 - ракун (*Nyctereutes procyonoides*)
 - домаћа и дивља мачка (*Felis domestica*, *Felis silvestris*, *Felis euptylura*)
 - рис (*Lynx lynx*)
 - сибирски тигар (*Panthera tigris*)
 - црни медвед (*Ursus americanus*), браон медвед (*Ursus arctos*), поларни медвед (*Ursus maritimus*)
 - морж (*Odobenus rosmarus*)
 - неколико врста фока (*Phoca roenlandica*, *Phoca fasciata*, *Erignathus barbatus*, *Pusa hispida*)
- Забележени су случајеви инфекције људи који у конзумирали месо сирове дивљачи (моржева, медведа)

Trichinella britovi (T-3)

- Географски најраспрострањенија врста
- Пријемчиве врсте:
 - домаћа свиња (*Sus scrofa domestica*) у Европи
 - дивља свиња (*Sus scrofa*)
 - црвена лисица (*Vulpes vulpes*)
 - шакал (*Canis aureus*)
 - вук (*Canis lupus*)
 - мрки медвед (*Ursus arctos*)
 - куна (*Meles meles, Martes foina, Martes martes, Lutra lutra*)
 - фамилија Viverrida (*Nandinia binotata, Viverra civetta*)
 - мрки пацов (*Rattus norvegicus*) који живи на фармама или ђубриштима
- Могућност заражавања људи са *T. britovi* постоји код конзумирања меса дивљих животиња



Trichinella murrelli (T-5)



- Присутна код дивљих месоједа:

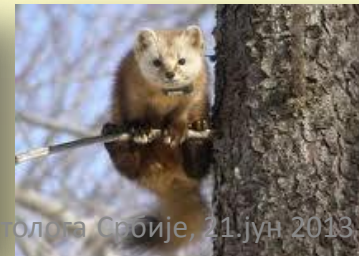
дивља мачка (*Lynx rufus*)
мрки медвед (*Ursus americanus*)
којот (*Canis latrans*)
ракун (*Procyon lotor*)
куна златица (*Martes americana*)
црвена лисица (*Vulpes vulpes*)



али и код домаћих животиња
(пас, коњ, мачка) на територији
Сједињених Америчких Држава

- До сада није забележен случај природног заражавања домаћих свиња, али је код коња утврђена могућност природне инфекције

- Забележени су случајеви мешане инфекција истог домаћина мрког медведа (*Ursus americanus*) са *T. murrelli* и *T. spiralis* (Калифорнија)
- Инфекција људи настаје као последица конзумирања термички необрађеног меса дивљачи, најчешће мрког медведа (*Ursus americanus*) и коњског меса
- Значајне информације о клиничкој манифестацији код људи су прикупљене приликом епидемије у Француској 1985. која је настала као последица конзумирања коњског меса увеженог са територије Сједињених Америчких Држава (*Dipouy-Camet et al., 2007*)



Trichinella nelsoni (T-7)



- Спорадично се проналази код дивљих животиња у источној Африци (од Кеније до Јужне Африке)
- Постоји могућност много шире географске дистрибуције, јер су подаци оскудни и заснивају се само на неколико организованих истраживања
- Као домаћини јављају се:
 - пругаста и пегава хијена (*Hyena hyena*, *Crocuta crocuta*)
 - пругасти шакал (*Canis adustus*)
 - мрки шакал (*Canis mesomelas*)
 - лисица са мишоликим ушима (*Otocyon megalotis*)
 - вук (*Canis lupus*)
 - лав (*Panthera leo*)
 - леопард (*Panthera pardus*)
 - гепард (*Acinonyx jubatus*)
 - афричка дивља мачка (*Leptailurus serval*)
- Утврђена је код врста дивљих свиња, чије је месо било извор заражавања људи у Африци: (*Potamochoerus larvatus*, *Phacochoerus aethiopicus*),



Trichinella T-12

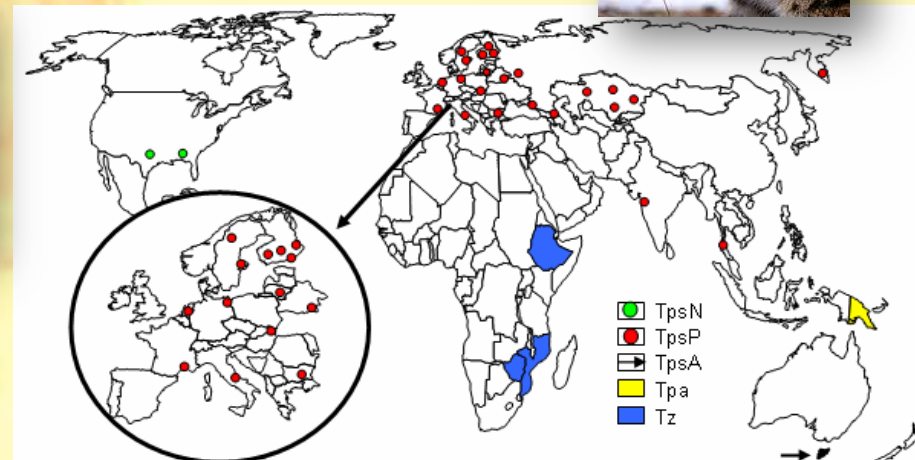
- Новооткривена инкапсулирана vrста kod sisara mesoždera u Južnoj Americi
- Utvrđena je kod kuguaru (*Puma concolor*) u Argentini
- Kao novi genotip je definisana na osnovu molekularnih istraživanja, korišćenjem mitohondrijalnih i ribonukleinskih markera, pri čemu je utvrđena najveća biološka sličnost sa *Trichinella britovi* i *Trichinella murrelli*.



- Regija DNK, poznata kao segment B je pokazala jedinstvenu sekvenču koja se razlikuje od svih do sada poznatih *Trichinella* genotipova.
- Podaci o biološkim, geografskim i molekularnim osobinama dali su osnovu za klasifikaciju novog genotipa *Trichinella* T12 kao nove vrste široko rasprostranjene u Neotropskom regionu, za koju je dat predlog imena: *Trichinella patagoniensis* sp. (Krivokapich SJ et al. 2012)

Trichinella T-6

- **Trichinella T-6** је нађена код месождера браон и мрког медведа (*Ursus americanus*, *Ursus arctos*) вука (*Canis lupus*), сиве лисице (*Urocyon cinereoargenteus*), којота (*Canis latrans*), прождрљивца (*Gulo gulo*), куна златица (*Martes pennanti*), пуме (*Puma concolor*), дивље мачке (*Lynx rufus*)
- Слична је врсти *Trichinella nativa* по неким биолошким карактеристикама, као што је отпорност на температуре смрзавања у мишићима месоједа, ниска инфективност за лабораторијске пацове и мишеве и домаће и дивље свиње



Geographical distribution of non-encapsulated species of

Trichinella T-8

- **Trichinella T-8** је забележена једино у Африци, код лавова (*Panthera leo*) и код пегаве хијене (*Crocuta crocuta*) у Националном парку Кругер у Јужној Африци, где опстаје заједно са *T. nelsoni*
- Слична је *T. britovi*, али се од ње ипак разликује по биохемијским и морфолошким карактеристикама



Trichinella T-9

- **Trichinella T-9** се јавља код дивљих животиња у Јапану и може се јасно разликовати од *T. britovi* молекуларним техникама
- На самом почетку је идентификована као *T. britovi* која је нађена код дивљих животиња у Јапану
- Као домаћини идентификовани су: ракун (*Nyctereutes procyonoides*), јапански мрки медвед (*Ursus thibetanus*), црвена лисица (*Vulpes vulpes*) на острву Хокаидо, где опстаје заједно са *T. nativa*.
- До сада није забележен ни један случај заражавања људи са T-8 или T-9



Врсте *Trichinella* које не доводе до формирања капсуле у домаћинима

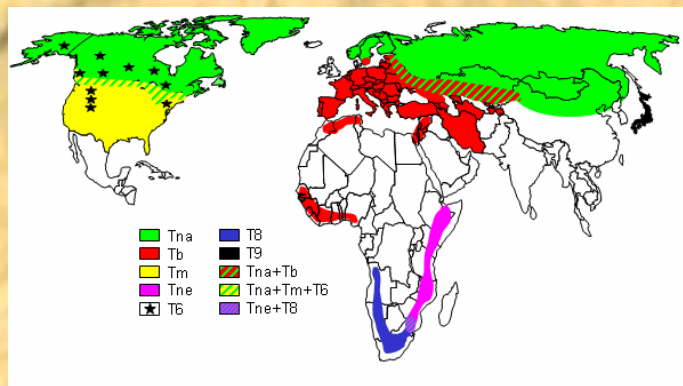


- *Trichinella pseudospiralis* је космополитска врста *Trichinella*, нађена код 14 врста сисара и 13 врста птица
- У литератури је забележен случај заражавања човека
- *Trichinella papuae* је пронађена код домаћих и дивљих свиња (*Sus scrofa*), фармских крокодила (*Crocodylus porosus*) који су храњени сировим свињским месом у Папуа Новој Гвинеји
- Захваљујући способности да доведе до инфекције гмизаваца, представља потенцијални инфективни агенс за људе који конзумирају месо корњача и гуштера

- *Trichinella zimbabwensis* је слична врсти *T. papuae*, пре свега због способности да инфицира и гмизавце и дивље месождере (*Python molurus*, *Pelomedusa subrufa*, *Varanus exanthematicus*, *Caiman crocodylus*)
- Забележени су случајеви природне инфекције у Африци (Зимбабве, Мозамбик, Етиопија) само код фармских гмизаваца (*Crocodylus niloticus*, *Varanus niloticus*), али не и код људи
- Експериментално је доказана инфективност за свињу, миша, пацова, хрчка, лисицу (*Vulpes vulpes*) и мајмуна (*Papio spp.*, *Cercopithecus aethopis*)



Симпатрија – просторни распоред врста *Trichinella*



Geographical distribution of encapsulated species of *Trichinella* transmitted by a sylvatic cycle (Pozio, 2009)

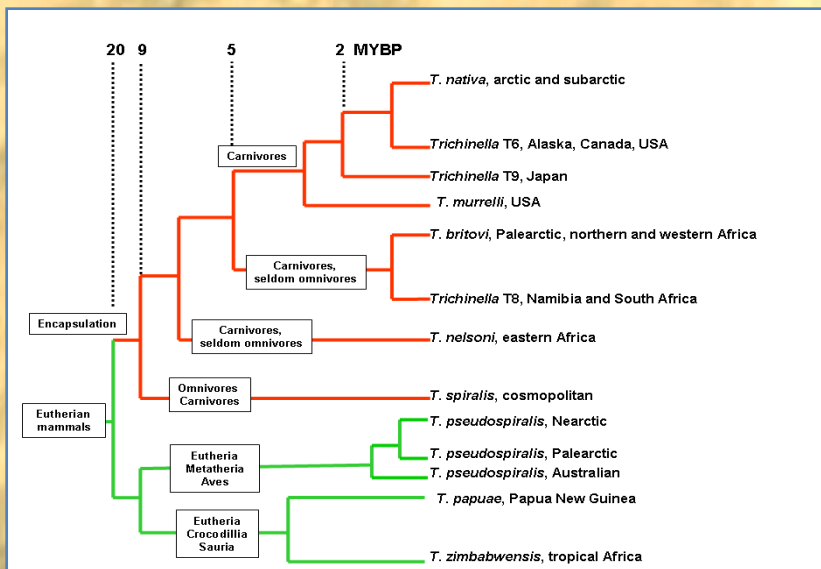
- Заражавање јединки са већим бројем врста указује на висок ниво изложености домаћина могућој инфекцији у одређеним условима
- За неке врсте услови средине у којима бораве пријемчиви домаћини (процент влажности и температура) у великој мери утичу на степен преживљавања ларви у самом домаћину, труповима уинулих домаћина, а самим тим и преношење на новог домаћина (Pozio, 2013)
- Постоји много примера симпатрије између различитих врста *Trichinella*: у САД и Канади *T. nativa* и *T. murrelli*; у Европи и Азији *T. nativa* и *T. britovi*; у Јужној Африци *T. nelsoni* и *Trichinella* T8

- Подручје на коме се простире *T. spiralis*, пасивно пренета људима, домаћим и синантропским животињама се преклапа у многим регијама са присутним врстама *T. nativa*, *T. britovi* и *T. murrelli*
- Присуство неинкапсулиране врста *T. pseudospiralis* је утврђено у истим регијама где се *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* и *T. murrelli* налазе
- Утврђено је присуство *T. spiralis* и *T. pseudospiralis* у узорку пореклом од домаће свиње, као и *T. spiralis* и *T. nativa* у узорку пореклом од дивље свиње са територије Босне (Sofronic 8th Workshop of NRL, Rome, 2013)
- Потребно је још истраживачких података како би се у потпуности потврдила чињеница да се и неинкапсулирана врста *T. zimbabwensis* преклапа са *T. britovi*, *T. nelsoni* и *Trichinella* T8 у неким деловима Африке
- Симпатрија овог паразита има за резултат инфекцију природних домаћина са различитим врстама *Trichinella* истовремено: *T. spiralis* са *T. nativa*, или *T. britovi*, или *T. murrelli*, или *T. pseudospiralis*; *T. nativa* са *T. britovi* или *Trichinella* T6; *T. britovi* са *T. pseudospiralis*

Биогеографија

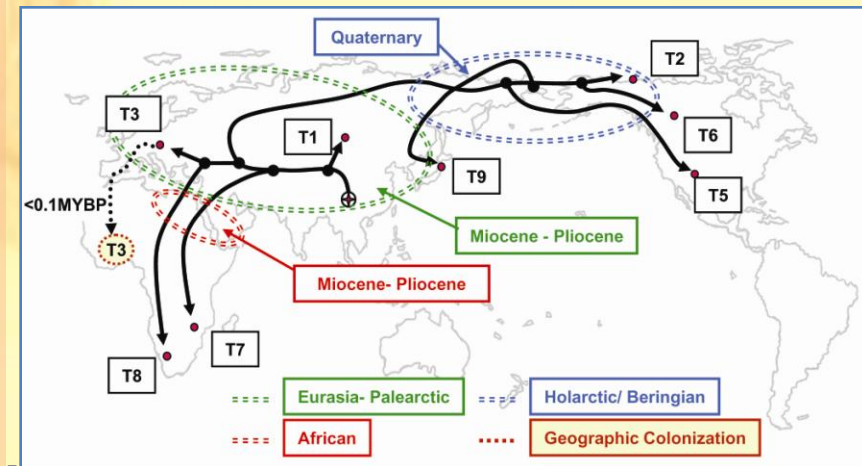
Изучавање биогеографије инкапсулираних врста и генотипова *Trichinella* (Zarlenga et al. 2006) дошло се до закључка да је порекло овог стабла из Источне Азије

У току Раног Миоцена и периода Плеистоцена, дошло је до три независна догађаја спајања континената и преласка *T. nelsoni*, *Trichinella* T8 и *T. britovi* из Евроазије на Афрички континент. На основу биохемијских подударности (Pozio et al., 2005) утврђено је да је пренос *T. britovi* из Западне Европе у северну и западну Африку најскорији догађај.



Pozio, 2009

- Фамилије домаћина, као што су *Ursidae*, *Canidae* и *Felidae* су довеле до ширења *Trichinella* врсте пореклом из земаља северне Земљине полулопте (Холарктичка регија) по Европи, Северној Америци и Русији (Zarlenga et al. 2006)
- Ограничавајуће мали број информација о неинкапсулираним врстама, пре свега због релативно скоријег открића и идентификације малог броја, може дати претпоставку да је *T. pseudospiralis* широм света распрострањена врста, захваљујући пре свега сталној миграцији птица као домаћина



Pozio, 2009

Врсте *Trichinella* и пријемчиве животињске врсте

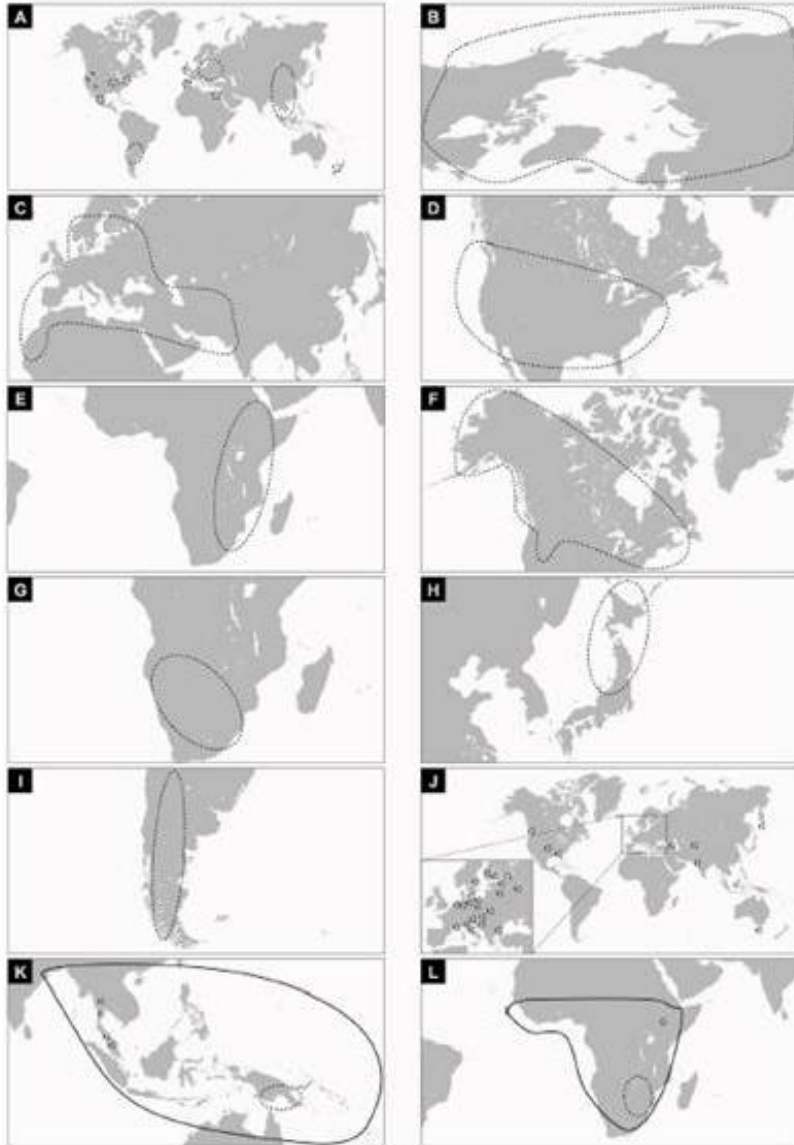
- Постоји значајна разлика у проценту заступљености врста *T. spiralis* и *T. britovi* код различитих домаћина, припадника редова
Carnivora (месоједи)
Artiodactyla (свиње)
Rodentia (глодари)
- Утврђена је разлика између фамилија унутар истог реда и између врста унутар фамилије

- Имуни одговор домаћина код примарних инфекција са *T. spiralis* и *T. britovi* се разликује
- Код инфекција са *T. britovi* не долази до развијања снажног имунолошког одговора, тако да су могуће реинфекције и са *T. britovi* и са *T. spiralis*
- Приликом заражавања домаћина са *T. spiralis* долази до развијања снажних имунолошких механизма те су реинфекције изузетно ретке



Географска распрострањеност различитих врста *Trichinella* код различитих врста животиња (1)

E. Pozio / Veterinary Parasitology 194 (2013) 128–132



Доступни подаци о 3800 изолата (<http://www.iss.it/site/Trichinella/index.asp>) у бази IRLT и осам објављених научних радова (*Shaikenov and Boev, 1983; Kanai et al., 2007; Malakauskas et al., 2007; Burke et al., 2008; Masuoka et al., 2009; Pozio et al., 2009a,b; Gajadhar u Forbes, 2010*) говоре о укупно 4644 изолата који су идентификовани као 44,8% *Trichinella britovi*, 39,9% *T. Spiralis* и 10% *Trichinella nativa*. Осталих шест инкапсулираних врста чини свега 5.16% укупног броја (*Pozio, 2013*)

Број идентификованих неинкапсулираних врста *Trichinella spp.* није довољан за доношење јасних епидемиолошких закључака (улога птица, сисара, гмизаваца)

- Веома је значајна чињеница да су увршћени подаци који се односе и на изолате пореклом из земаља које су на територији Европе, али нису чланице ЕУ, као што су Босна и Херцеговина, Хрватска, Македонија, Норвешка, Белорусија, Русија, Србија, Швајцарска и Украјина.

Дистрибуција врста *Trichinella* (*Pozio, 2013*):

A *T. spiralis*; **B** *T. nativa*; **C** *T. britovi*; **D** *T. murrelli*;

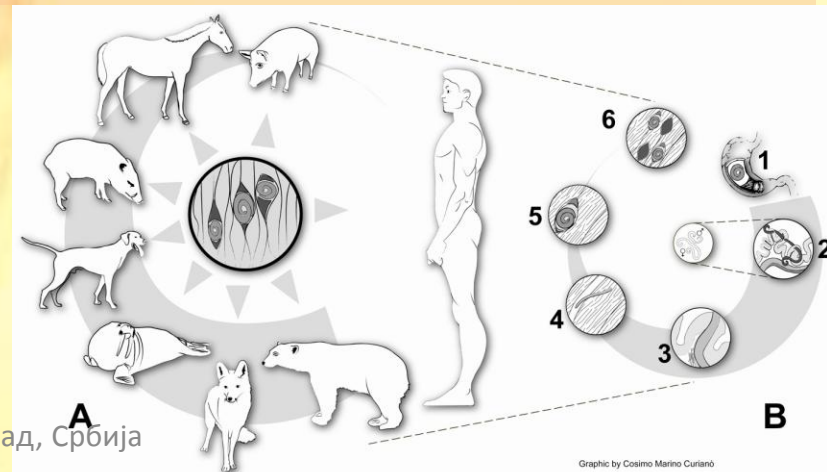
E *T. nelsoni*; **F** *Trichinella T6*; **G** *Trichinella T8*;

H *Trichinella T9*; **I** *Trichinella T12*; **J** *T. pseudospiralis*;

K *T. papuae*; **L** *T. zimbabwensis*

Географска распрострањеност различитих врста *Trichinella* код различитих врста животиња (2)

- Силватични циклус се одвија на свим континентима, са изузетком Антарктика, за који не постоје подаци о истраживању врста животиња на том подручју, као што су морски сисари и птице
- Постоји повезаност између класа кичмењака, њихове телесне температуре и врста *Trichinella*:
 - код рептила са телесном температуром од 25 C до 29 C и птица, код којих је телесна температура 40,5 C-42,5 C паразитирају неинкапсулиране врсте *Trichinella*
 - кичмењаци са телесном температуром која се креће у распону од 37,5 C до 40 C су домаћини и за неинкапсулиране и за инкапсулиране врсте *Trichinella*
- До 60-61° северне географске ширине *Trichinella spiralis* и *Trichinella britovi* су две најраспрострањеније врсте *Trichinella*
- Друге две врсте *Trichinella* које су идентификоване на територији Европе су *Trichinella nativa* и *Trichinella pseudospiralis*
- На подручју целокупне Европе утврђена је шира географска распрострањеност *T. britovi* (62.5 до 100% изолата) у односу на *T. spiralis* (0.0 до 37.5%), за разлику од територије Финске, Немачке, Пољске и Шпаније где је преваленција *T. spiralis* виша (56.3 до 84.2% изолата)
- У Румунији однос утврђених врста је био сличан (49.2% за *T. spiralis* и 50.8% за *T. britovi*) што се објашњава високом преваленцијом присутних жаришта у запатима домаћих свиња (*Blaga et al., 2007*)
- *Trichinella spiralis* је утврђена као доминантна врста у Хрватској и Србији (*Marinculic et al, 2011, Zivojinovic et al. 2010*)
- Постоји недостатак информација о могућем присуству *Trichinella sp.* како код људи, тако и код домаћих и дивљих животиња за многе земље на свету или није утврђено присуство (поједини делови Африке, САД-а, Азије, у Европи: Кипар и Малта, острвске земље Океаније) - то указује само на недостатак истраживања и никако не искључује могуће присуство ове зоонозе



Силватични циклус (1)

- Природна инфекција са *Trichinella spp.* је забележена код више од 100 врста сисара који су сврстани у 11 редова:

Marsupialia

Insectivora

Edentata

Primates

Lagomorpha

Rodentia

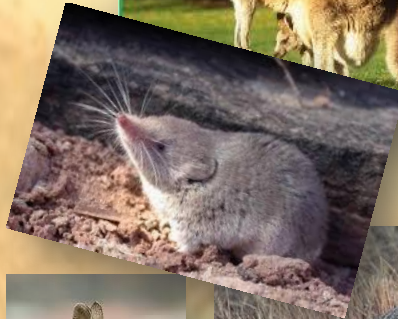
Cetacea

Carnivora

Perissodactyla

Artiodactyla

Tylopoda



- Утицај човека на услове животне околине доводи до промена у епидемиологији многих узрочника заразних обољења животиња и на саме домаћине
- Тако је у последњих 100 година на тлу Европе пораст необрађених површина и шума и смањење броја организованих фарми животиња, праћено повећањем броја дивљих свиња
- Жаришта инфекције у домаћем циклусу са *T. britovi* обично трају током једне генерације свиња или ретко неколико генерација, највероватније због ниске инфективности *T. britovi* за домаће свиње
- Скорашња истраживања биогеографских и филогенетских карактеристика *Trichinella spp* су пружила јаке доказе о месоједима из фамилија *Ursidae*, *Canidae* и *Felidae* као преносиоцима овог паразита у Холарктички екосистем, који се простире кроз целу Европу, преко Беринговог мореуза до Северне Америке
- Приближно 100% домаћина *T. nativa*, *T. murrelli*, *Trichinella T6*, *T8*, *T9* и *T12* су месоједи, док су за *T. britovi* домаћини 63% месоједи и 37% свиње (Pozio, 2013)



Силватични циклус (2)



- Од примата, само је код људи забележено заражавање у природним условима
- Заражавање коња (*Perissodactyla*), глодара (*Rodentia*), оклопника (*Chaetophractus villosus*) забележено је само у случајевима лоших хигијенских услова, када постоји могућност конзумирања зараженог меса
- Торбари (*Marsupialia*) као резервоари су идентификовани на територији Тасманије
- У Северној Америци је потврђено присуство паразита код опосума (*Didelphis virginiana*)
- Упркос потенцијално широком спектру могућих домаћина за *Trichinella spp*, највећи број ових паразита се налазе код месоједа (*Carnivora*) и фамилије *Suidae* (углавном домаћа свиња, различите расе дивље свиње (*Sus scrofa*), пегава свиња (*Potamochoerus spp.*), афрички дивљи вепар (*Phacochoerus ethiopicus*))

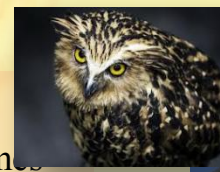
- Спорадичан је налаз природног заражавања биљоједа, како дивљих врста као што је ирвас (*Rangifer tarandus*), срна (*Carreolus capreolus*) тако и домаћих оваца (*Ovis aries*), коза (*Capra aegagrus hircus*) и крава (*Bos taurus*)
- У експерименталним условима је доказана пролазна зараженост говеда, оваца и коза.



Силватични циклус (3)

• Птице

Седам врста птица које припадају редовима Strigiformes, Ciconiformes и Passeriformes су описане као домаћини *Trichinella pseudospiralis* (Pozio, 2005), док је код шест осталих врста само постављена сумња која још увек није до краја потврђена



Гмизавци

- Само је код три врсте рептила утврђена природна инфекција са *Trichinella pseudospiralis*
 - код крокодила Нила (*Crocodylus niloticus*)
 - гуштера Нила (*Varanus niloticus*)
 - крокодила сланих вода у Папуа Новој Гвинеји (*Crocodylus porosus*) (Pozio et al., 2005, 2007)
- Забележене су две епидемије људи на Тајланду који су конзумирали месо гуштера (*Varanus nebulosus*) и корњаче (Testudines) (Kambounruang, 1991)



Водоземци и рибе

- Описан је један случај експерименталне инфекције водоземаца:
 - жабе (*Salientia*)
 - мексички саламандер (*Ambystoma mexicanum*) са *T. spiralis*, при чему је развој ларве у мишићним ћелијама био некомплетан
- Покушај заражавања риба са *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis* је такође био неуспешан



Бескичмењаци

- Проучавана је и могућа улога бескичмењака као домаћина за одрасли и ларвени облик
- Опстанак ларви *Trichinella* у овим домаћинима директно зависи од спољашње температуре
- Ниже температуре омогућавају дужи опстанак
- Резултати истраживања указују да је улога бескичмењака као домаћина и резервоара *Trichinella* веома ограничена у природним условима



Силватични циклус (4)



- *Trichinella nativa* је утврђена код **морских сисара** у арктичком региону, код малог броја врста домаћина
- Обично се налази код поларних медведа (*Ursus maritimus*), још више код моржева (*Odobenus rosmarus*), када представља и могући извор заразе за људе. Зато су уведени програми контроле на присуство *Trichinella* ларви у ланцу мера провере здравствене исправности меса пореклом од гајених моржева намењених за људску исхрану у неким од земаља Арктичке регије (*Proulx et al., 2002*)
- Код брадатих фока (*Erignathus barbatus*) и прстенастих фока (*Phoca hispida*) ретко се налазе ларве *Trichinella*. Забележен је један налаз код белог кита (*Delphinapterus leucas*) (*Pozio 2007*)
- Код месоједа који су настањени у Арктичкој регији, као што су поларни медвед (*Ursus maritimus*), поларна лисица (*Alopex lagopus*), поларни пси преваленца инфекције са *T.nativa* је висока
- Лешеве угинулих животиња врло често доспевају у океан, па тако моржеви као стрвождери бивају изложени инфекцији
- Фоке и китови се највероватније заражавају или конзумирањем заражених трупова или индиректно конзумирањем амфипода (мали морски ракови) који су се хранили остацима заражених животиња



Утицај човека на силватични циклус

- Уобичајна навика ловаца да остављају трупове одстрелене дивљачи у природи довела је до могућности заражавања животиња и појаве нових домаћина (*Pozio and Murrell, 2006*)
- Резултати епизоотиолошких истраживања спроведених на територији Европе, Северне Америке и Африке указују на већу преваленцију *Trichinella* код дивљих животиња које живе у природи, као што су Национални паркови, шуме, планински предели, резервати (*Pozio, 1998*)
- Могуће објашњење било би да на ова три континента егзистирају животиње домаћини који су претежно стрвинари и канибали, док су активности људи изражене у смислу високе свести о очувању животне средине (адекватно одлагање отпада, месних остатака, делова трупова закраних и уловљених животиња)
- У последњих сто година, на територији Европе дошло је повећања необрађених површина и шума, а смањења броја фарми, што је погодовало ширењу популације дивљих свиња (*Sus scrofa*) и повећању броја случајева заражавања људи





Домаћи циклус фактори ризика



- 1) исхрана домаћих животиња са отпацама, помијама (Gamble *et al.*, 2000), труповима уинулих или закланих свиња и/или дивљачи, што је уобичајно код свиња које се слободно гаје (*Pozio and Murrell, 2006*)
- 2) могући приступ домаћих животиња ђубриштима и депонијама
- 3) исхрана домаћих животиња са месом дивљачи, као и отпацама заосталим од изловљене дивљачи
- 4) исхрана коња са отпацама пореклом од свиња или делова трупова крзнашица
- 5) исхрана паса за вучу санки са деловима трупова других паса или дивљачи на Арктику
- 6) коришћење трупова закланих крзнашица за исхрану других фармски гајених крзнашица
- 7) коришћење меса закланих крокодила за исхрану фармски гајених крокодила у Африци
- 8) коришћење свињских помија за исхрану младих крокодила у Папуа Новој Гвинеји





Домаћи циклус



- Најчешћи врста *Trichinella* у домаћем циклусу је *T. spiralis*, која је веома добро адаптирана на свиње и синантропске врсте као домаћине
- Она опстаје у домаћинима, показујући врло висок репродуктивни ниво, не изазивајући тешке патолошке промене, осим код врло високог нивоа инфекције
- *T. britovi* се повремено јавља у домаћем циклусу у случајевима исхране свиња отпацама пореклом од изловљене дивљачи, као и код свиња које се гаје слободно и имају приступ депонијама на којима се налазе делови трупова угинуле дивљачи
- На територији Русије и Словачке Републике забележени су случајеви инфекције домаћих свиња са *Trichinella pseudospiralis*
- У Африци је дошло до преношења *T. parva* и *T. zimbabwensis* у популацију крокодила који живе у мору и Нилу (*Crocodylus porosus* и *Crocodylus niloticus*) као и врста које се гаје фармски

Пацови

- У домаћим стаништима где *Trichinella* кружи унутар популације домаћих животиња, чест је налаз *T. spiralis*, ређе *T. britovi* или *T. pseudospiralis* код мрког пацова (*Rattus norvegicus*) (Pozio and Zarlenga, 2005)
- Улога ове врсте животиња је и даље предмет дебата: да ли је то прави резервоар *Trichinella* (одржавање инфекције унутар врсте без укључивања других врста домаћина) или је вектор (због случајних инфекција) за пренос до домаћих животиња
- Позната је Леукартова “Пацовска теорија“ из 19.века, која поставља пацове као главне резервоаре *T.spiralis* за инфекцију домаћих свиња
- Друга теорија коју је развио Зенкер 1871. говори о пацовима само као индикаторима присутности *Trichinella* врста и заступа мишљење да прави извор инфекције и за свиње и за пацове представљају остаци и отпаци настали после клања заражених свиња
- Не постоје забележени случајеви инфекције популације мрког пацова (*Rattus norvegicus*) са *T.spiralis* на фармама на којима су свиње за које је утврђено да нису заражене или уопште нема свиња
- Приступ биосигурносним мерама које се морају примењивати мора бити широк, не само на самим фармама, већ на ширем околном подручју како би се спречило могуће ширење популације заражених пацова на околне фарме и насеља
- Неправилна употреба средстава за дератизацију може подстаћи преношење инфекције, јер се отровани пацови успорено крећу и постају лак плен за свиње

Trichinella sp. КОД КОЊА



- Иако припадају биљоједима 32% коња конзумира месо када им се понуди у исхрани, док је у неким земљама је још увек пракса исхране коња производима животињског порекла (*Murrell et al., 2004*)
- Становништво ЕУ је конзумирало близу седам милиона закланих коња у периоду од 1975 до 2005 године, од којих је код 28 утврђена инфекција са врстама *Trichinella* (сви заражени коњи су потицали из земаља са високом преваленцијом трихинелозе свиња и/или дивљих животиња, *Pozio, 2001; Murrell et al., 2004*)
- У Француској је заражено 2.296 људи у осам епидемија, у Италији 1.038 заражених људи у седам епидемија у периоду од 1975 до 2005.године
- Захваљујући новим прописима (обавезни преглед 5-100 грама одговарајућег мишићног ткива, уместо дотадашње количине од 1 грама меса пореклом од коња) утврђено је присуство ларви *Trichinella* код 18 коња пореклом из Мексика, Пољске, Румуније и територије бивше Југославије (*Pozio and Zarlenga, 2005*)
- Посебан епидемиолошки значај имају инфекције људи зараженим коњским месом, јер заражавања већег броја особа може бити последица конзумирања меса пореклом од само једног коња
- Последице су далекосежне не само на здравље, већ и на трошкове лечења, продају коњског меса која увек опадне после епидемија. Неминовне последице су промене у законским и административним регулативама, како у земљама где се епидемије одвијају, тако и на међународном нивоу(*Ancelle, 1998*)

Трихинелоза код људи

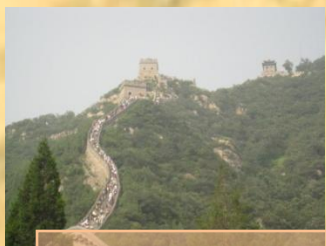


- Заражавање људи је повезано са културолошким обичајима, начином спремања хране, који укључују сирову или термички недовољно обрађена јела која себи садрже месо пореклом од сисара, птица и рептила сваштоједа и месоједа
- Стално присуство *Trichinella* у популацији дивљих животиња и повремено код домаћих животиња, не значи сигурну појаву код људи, што се објашњава пре свега традиционалном исхраном људи само добро термички обрађеним месом
- Верски закони не дозвољавају Муслиманима исхрану свињским и месом пореклом од месоједа, те се трихинелоза припадника ове популације сматра изузетним случајевима
- Нажалост, недостатак законске регулативе о контроли приликом клања или изловљавања дивљачи у тим земљама, има за последицу велики број епидемија људи осталих вероисповести

- Просечна годишња инциденција код људи у свету је приближно десет хиљада случајева, са стопом морталитета од 0.2% (број непријављених случајева је сигурно већи)
- Како се трихинелоза људи у већини земаља ЕУ ретко јавља, чест је случај непрепознавања обољења и кашњења у дијагностици (недостатак одговарајућих серолошких тестова, неискуство лекара), што дозвољава *Trichinella* ларвама продор у мишићно ткиво, формирање колагене капсуле и самим тим стицање отпорности на лекове (*Dipouy-Samet et al., 2002*)
- Свеукупно, свињско месо и производи од свињског меса остају главни извор инфекције за људе



Трихинелоза код људи



- Трихинелоза људи је присутна у неким од урбаних делова Народне Републике Кине где постоји традиционално спремање термички необрађених јела од свињског меса (месне кнедле)
- Људи пореклом из земаља Источне Европе који раде у ЕУ, након повратка са одмора у својим домовинама, доносећи производе од свињског меса које је било заражено, својим пријатељима у Немачку, Италију, Велику Британију су довели у више наврата до епидемија трихинелозе (*Pozio and Zarlenga, 2006*)
- Миграција људи је често имала за резултат прихватање нових обичаја у начину спремања хране (јела од сировог или термички недовољно обрађеног свињског меса и производа од свињског меса) и директну изложеност могућем заражавању, што је за последицу имало епидемију у имигрантским комунама у подручјима где је трихинелоза ендемски присутна (посебно ризичне су популације имиграната из Камбоџе, Лаоса, Тајланда и Вијетнама, на територији САД и Израела где контрола домаћих и дивљих свиња није законски обавезна) (*Pozio and Murrell, 2006*).
- Стално повећање броја туриста који се баве ловом и посећују ендемска подручја, често је за последицу имало развијање клиничке слике као последице *Trichinella* инфекције код људи после повратка у њихове земље
- Дијагностика је била посебно отежана јер су се јављали као појединачни случајеви са неспецифичном симптоматологијом, без породичних и/или већих епидемија (*Pozio and Murrell, 2006*)
- Тако је забележена трихинелоза туриста који су приликом посете Африци конзумирали месо брадавичасте свиње (*Phacochoerus aethiopicus*), месо медведа у Канади и Гренланду, свињско месо у Народној Републици Кини, Египту, Индонезији (Острво Бали), Лаос и Малезија, месо дивље свиње (*Sus scrofa*) у Турској и Алжиру (*Pozio and Murrell, 2006*)



Лабораторијска дијагностика трихинелозе (1)



- Дијагностика трихинелозе зависи од крајњег циља који се жели постићи. Да ли је месо које се прегледа намењено за исхрану људи или се врше епидемиолошка испитивања код појединачних јединки, групе домаћих и/или дивљих животиња. У складу са Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (ОИЕ, 2008) дијагностика трихинелозе код животиња се дели у две категорије:

-директне методе: идентификација и визуелно препознавање првог развојног стадијума мишићне инкапсулиране или слободне ларве у попречно пругастим мишићима

-индиректне методе: утврђивање инфекције на основу присуства специфичних антитела у узорцима крвног срума

- Идентификација *Trichinella* ларви је дијагностичка метода ограничена на post mortem испитивања
- Ово је уједно и метода која је законски обавезна у многим земљама света, за месо намењено за конзумирање, са циљем превенције трихинелозе људи. (Gamble *et al.*, 2000)
- Веома се често примењује и епизоотиолошким истраживањима код дивљих животиња, као могућих извора заразе за домаће свиње
- Откривање такозваних индикатор животиња омогућава вршење процене ризика за могућу преваленцију *Trichinella* у природи (Nockler *et al.*, 2000)
- Осетљивост директних дијагностичких метода за откривање присуства *Trichinella* ларви у мишићном ткиву уско је повезана са врстом и величином узорка који се прегледа (Nöckler *et al.*, 2000)
- Још у XIX веку, од 1860. године у почетку употребом микроскопа, а затим **трихинелоскопа** започео је систематски преглед закраних свиња на кланицама (Nockler *et al.*, 2000)
- Када је извођење методе адекватно, искуство прегледача велико, поузданост методе осигурава откривање инфекција од 3 ларве по граму, што се сматра инфективном дозом за клинички манифестно обољење код људи
- Ларве неинкапсулираних врста је тешко открити методом трихинелоскопије
- Управо због ове ограничавајуће околности, као и мање осетљивости трихинелоскопије и сличних компресионих метода у односу на вештачку дигестију, оне нису препоручене методе за преглед меса намењеног за људску употребу (ОИЕ, 2008)

Лабораторијска дијагностика трихинелозе (2)

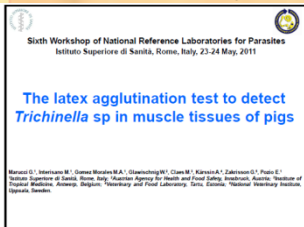
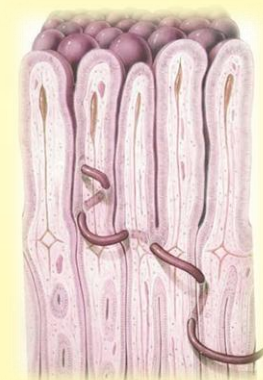
- **Метода вештачке дигестије** је дијагностичка метода која се примењује код испитивања узорака мишићног ткива пореклом од домаћих и дивљих животиња које су пријемчиве за инфекцију нематодама рода *Trichinella*
- Омогућава утврђивање присуства ларви *Trichinella* у фази налажења у мишићном ткиву
- Заснива се на ослобађању ларви из мишићног ткива након дигестије, односно деловања раствора пепсина и хлороводоничне киселине у одређеном временском периоду и под одређеним температурним режимом
- Може се употребљавати за преглед индивидуалних или збирних узорака, који се накнадно раздвајају у случају позитивног налаза
- Утврђене ларве се даље могу молекуларним техникама идентификовати

- У складу са садашњим европским регулативама могу се примењивати четири методе вештачке дигестије:
 - метод са магнетном мешалицом
 - седиментациони метод са стомахером
 - седиментациони метод са филтрацијом
 - Трихоматик 35 аутоматски метод дигестије
- Метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом која се сматра златним стандардом, као посебно дизајнирана метода за преглед збирних узорака била је предмет бројних валидација (*Kapel et al., 2005*)

• **Латекс аглутинациони тест** за откривања *Trichinella* ларви у узорцима мишићног ткива пореклом од свиња

Врло једноставна метода, високе осетљивости и поновљивости, скраћује време испитивања

Слабост: смањена специфичност услед контаминације одређеним хемикалијама(испирач)





Индиректне дијагностичке методе (1)

- Индиректне методе дијагностике подразумевају откривање присуства специфичних антитела против *Trichinella* (OIE, 2008) у серуму, крви или ткивној течности.
- Тестови као што је: имунофлуоресценција, Western blot тест, реакција везивања комплемента и хем-аглутинациони тест се користе ређе и то у хуманој медицини као потврдни тестови (*Nockler et al., 2000*)
- **ELISA тест** је најчешће коришћени тест за детекцију антитела против *Trichinella*, препоручена од стране ЕУ према Директиви број 2075/2005, поуздан, стандардизован, обезбеђује задовољавајући ниво осетљивости и специфичности и економски је исплатив (*OIE, 2008*)
- Осетљивост ове методе је висока, (могуће је открити и 1 ларву у 100 грама мишићног ткива (*Gamble et al., 1983*))

- Ларве *Trichinella* у организму домаћина доводе до сложеног ћелијског и хуморалног имунског одговора у току цревне фазе, као и фазе миграције кроз организам, све до периода боравка ларви у мишићима
- Специфична антитела IgA, IgM и IgG могуће је утврдити две до три недеље после уношења ларви у организам (IgG показују највиши ниво имуноглобулина и могу се открити у току дужег временског периода)
- Фактори као што су специфичност животињске врсе која се испитује, разлике у индивидуалном имунском одговору јединки, присуство матерналних антитела, синдром имунодефицијенције могу компромитовати резултате теста (*Nockler et al., 2000*)
- “дијагностички прозор“ најранији период инфекције *Trichinella* ларвама, током кога долази до инкапсулирања ларви, завршава се најраније за 17 дана, али се тада антитела још увек не могу утврдити (могући лажно негативни серолошки резултати)

Индијектне дијагностичке методе (2)

Имуноблот (Western blot)

- Ова дијагностичка метода је врло значајна за откривање заражених животиња са *Trichinella* spp. и њихово разликовање од оних јединки заражених неким другим хелминтима
- Постоје подаци о унакрсној реакцији са *Anisakidae* (Yera *et al.*, 2003)
- У дијагностичке сврхе, често се користи као потврдни тест за ELISA-позитивне серуме пореклом од људи или свиња, али се може користити и као основни тест.

- **Имуноелектрофореза или латекс аглутинација** се препоручују само у ситуацијама када је неопходна брза дијагноза (резултат потребан за мање од 1 сата)
- Њихово коришћење није уобичајно, јер им је осетљивост и специфичност мања у поређењу са ELISA тестом
- **Реакција везивања комплемента** је поуздана дијагностичка метода, али се изузетно ретко користи у дијагностиковању трихинелозе (Ivanovska *et al.*, 1989)



Мултиплекс PCR у молекуларној идентификацији врсте паразита из рода *Trichinella* (1)

- Са биолошког и епизоотиолошког становишта изузетно је значајно идентификовати врсту унутар рода *Trichinella* и пратити њено кружење у природи
- Ова метода је врло значајна јер се њеном применом може на брз, једноставан и поуздан начин установити врста ларви *Trichinella* нађених у узорку меса применом метода вештачке дигестије, што има научни, стручни и практични значај
- Коришћењем мултиплекс PCR технике са 5 олигонуклеотидних парова, могуће је идентификовати појединачну ларву коришћењем само једног амплификационог теста на нивоу врсте и генотипа

	<i>T.spiralis</i>	<i>T.nativa</i>	<i>T.britovi</i>	<i>T.pseudospiralis</i>	<i>T.mureli</i>	<i>Trichinella T6</i>	<i>T.nelsoni</i>	<i>T.papuae</i>	<i>T.zimbabwensis</i>
ESB	173	127	127	310-350	127	127	155	240	264
ITS 1			253			210			
ITS 2					316		404		

Димензије очекиваних амплификационих продуката (у базним паровима) за сваки таксон

Мултиплекс РСР у молекуларној идентификацији врсте паразита из рода *Trichinella* (3)

- Данас су као припадници рода *Trichinella* идентификовани 9 сродних врста *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, *Trichinella T 12* и 3 генотипа *Trichinella-T6*, *Trichinella-T8* и *Trichinella-T9*
- Све врсте се међусобно разликују на основу састава и/или димензија нуклеотидне секвенце различитог локуса
- Компаративном анализом три нуклеотидне секвенце утврђено је да припадају ITS1, ITS2 и ESB, што омогућава једнозначну идентификацију већине епизоотиолошки значајних врста: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* и *Trichinella-T6*.

Олигонуклеотидне секвенце	ознака	Умножена секвенца
5'-GTT.CCA.TGT.GAA.CAG.CAG.Ғ3' 5'-CGA.AAA.CAT.ACG.ACA.ACT.GG3'	cp-I.F cp-I.R	ESB
5'-GCT.ACA.TCC.TTT.TGA.TCT.GTҒ3' 5'-AGA.CAC.AAT.ATC.AAC.CAC.AGT.ACA3'	cp-II.F cp-II.R	ITS 1
5'-GCG.GAA.GGA.TCA.TTA.TCG.TGT.A3' 5'-TGG.ATT.ACA.AAG.AAA.ACC.ATC.ACT3'	cp-III.F cp-III.R	ITS 1
5'-GTG.AGC.GTA.ATA.AAG.GTG.CAG3' 5'-TTC.ATC.ACA.CAT.CTT.CCA.CTA3'	cp-IV.F cp-IV.R	ITS 2
5'-CAA.TTG.AAA.ACC.GCT.TAG.CGT.GTT.Ғ3' 5'-TGA.TCT.GAG.GTC.GAC.ATT.TCG3'	cp-V.F cp-V.R	ITS 2

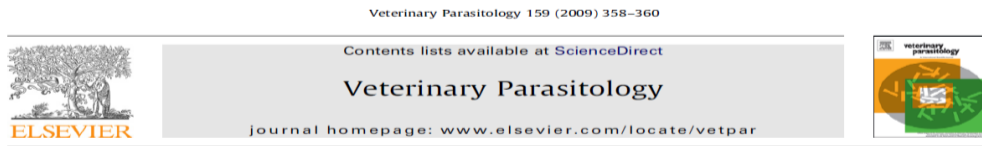
Олигонуклеотидне секвенце са ознакама комплета за умножавање секвенци Референтне паразитолошке лабораторије ЕУ

Трихинелоза у Србији



- На Балканском полуострву где се трихинелоза ендемски јавља у популацији домаћих свиња *Trichinella spiralis* и *Trichinella britovi* су две најзаступљеније врсте у земљама са којима се граничи Србија (Хрватска, Мађарска, Румунија, Бугарска и Македонија) (*Pozio, 2007*)
- Трихинелоза људи и животиња као озбиљан здравствени, економски и социјални проблем у Србији и њена ендемска стационараност у појединим регијама земље је препозната још крајем прошлог века (*Superlovic et al., 2005*)
- На територији Србије преваленција трихинелоза свиња је у евидентном паду (од 0.14% до 0.02% за период 2001-2010.година) (*Sofronic et al., 2013*)
- За последњих пет година највиша преваленција (преко 0.05%) се бележи у три округа: Поморавски, Сремски и Браничевски.
- У популацији људи у истом периоду забележено је 2257 случајева оболелих особа од трихинелозе, укључујући 3 смртна исхода, са значајно смањеним бројем оболелих за последњих 5 година (мање од 200/годишње) (*Sofronic et al., 2013*)
- За сада је у популацији домаћих и дивљих животиња на територији Србије идентификовано присуство *T. spiralis* и *Trichinella britovi*, као појединачне инфекције (*Cvetkovic et al., 2011*) и као мешане инфекције код заражених јединки (*Zivojinovic et al., 2013*)

- У складу са ЕУ прописом 2075/2005, потребно је спровести анализу ризика у подручјима где се жели доказати статус „слободан“ од појаве трихинелозе у популацији дивљих и домаћих животиња или за регионе где се ризик од појаве трихинелозе у популацији домаћих свиња дефинише као занемарљив
- На територији епизоотиолошког подручја Браничевског и Подунавског округа трихинелоза представља једну од најзначајнијих зооноза које су присутне на овом епизоотиолошком подручју
- Број дијагностикованих случајева и локација оболелих животиња даје основу за оправдану сумњу о стационираности појединих зооноза, као што је трихинелоза, на неким општинама у одређеној календарској години или временском периоду
- Шест општина је званично проглашено зараженим трихинелозом домаћих свиња 2003.године (Пожаревац, Велико Градиште, Кучево, Жабари, Голубац и Мало Црниће) од када се званично спроводи програм сузбијања ове зоопаразитозе (Zivojinovic et al., 2009)



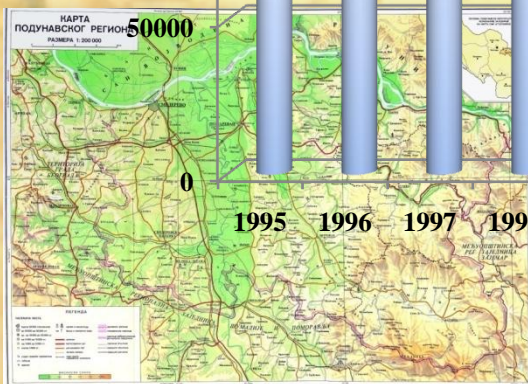
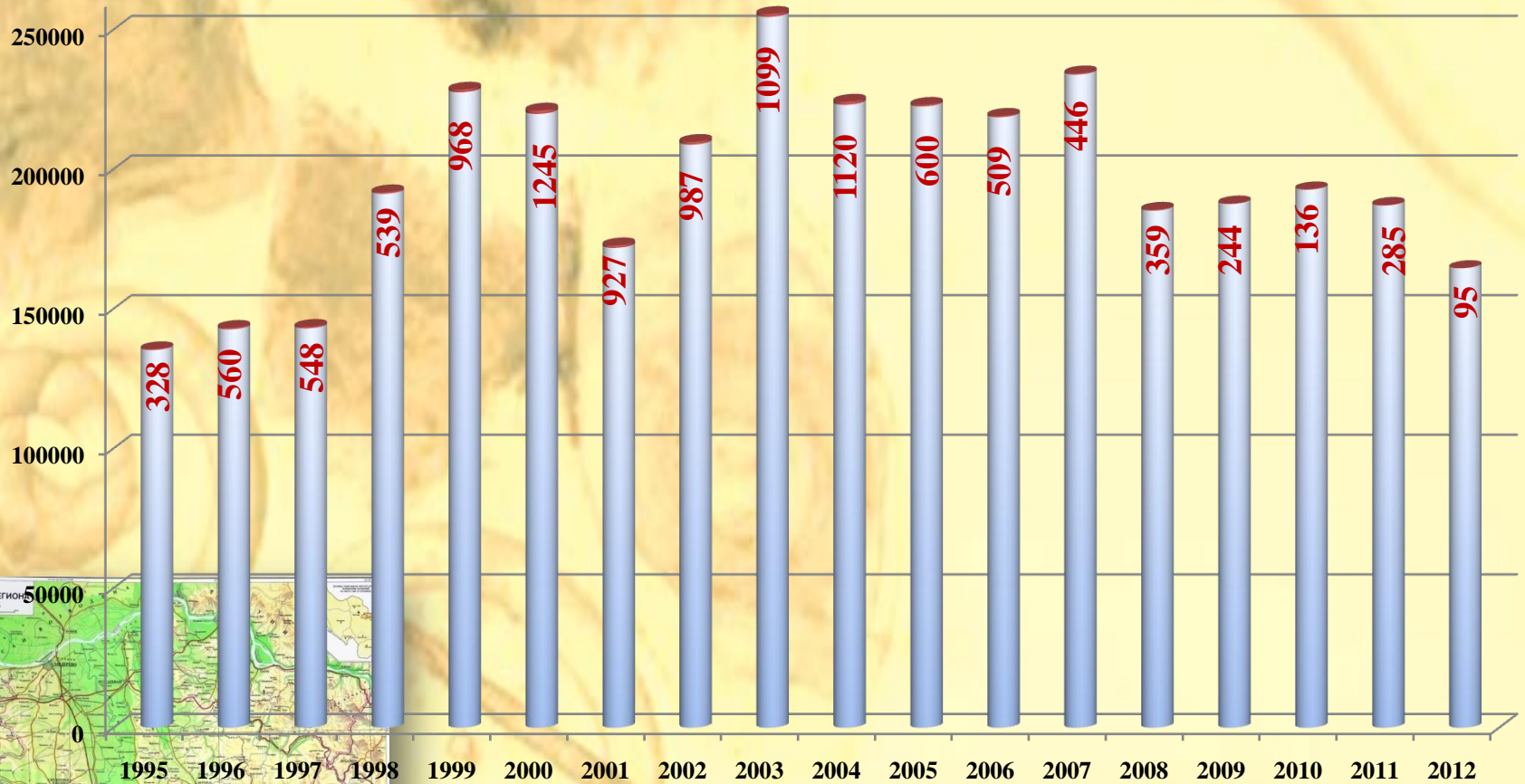
Trichinella prevalence in swine in an endemic district in Serbia: Epidemiology and control

M. Zivojinovic^{a,*}, G. Dimitrijevic^a, M. Lazic^a, M. Petrovic^b, Lj. Sofronic-Milosavljevic^b

^a Veterinary Specialistic Institute "Požarevac", Dunavska 89, 12000 Požarevac, Serbia

^b Institute for the Application of Nuclear Energy - INEP, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

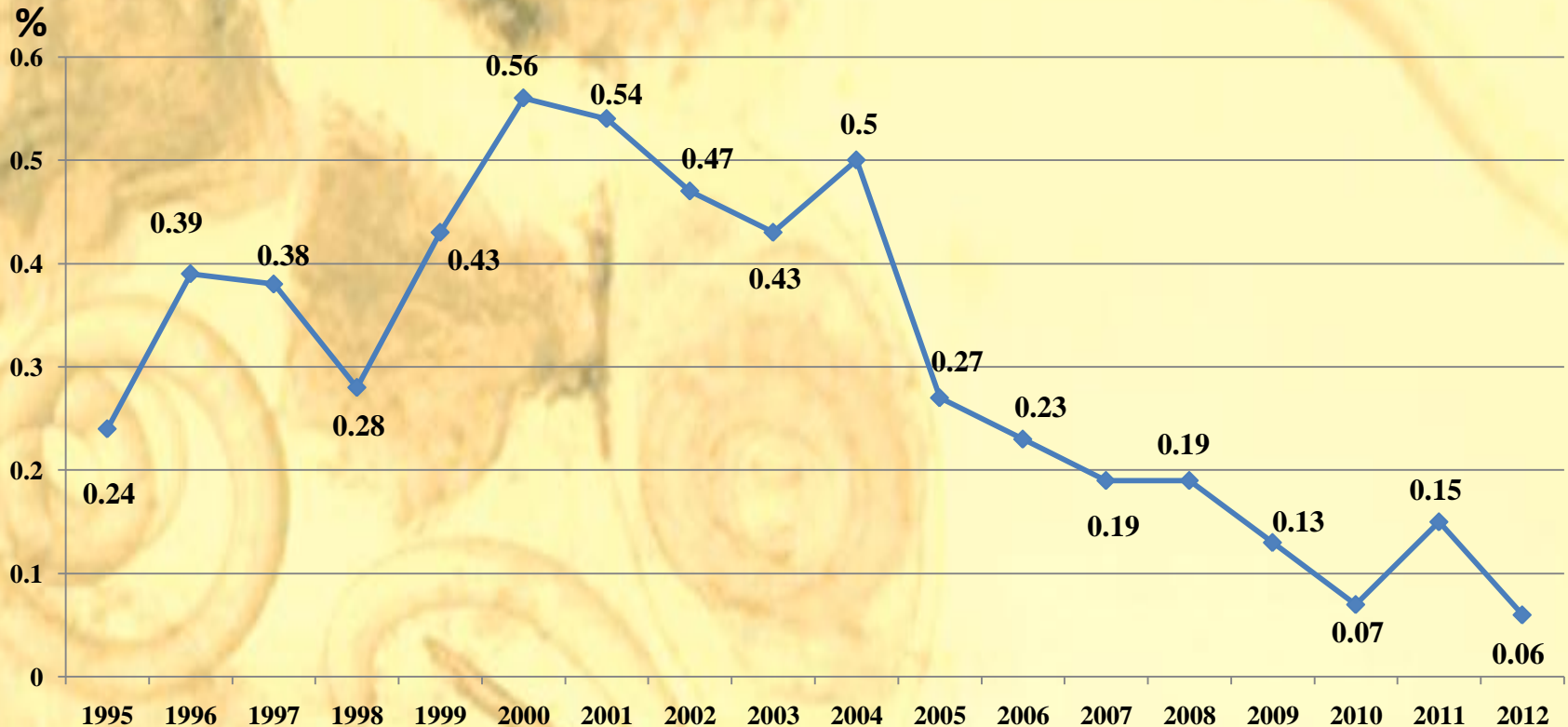
Trichinella инфекција домаћих свиња на територији Браничевског и Подунавског округа



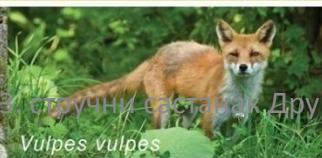
■ Број прегледаних свиња

■ Број заражених свиња

Географска распрострањеност *Trichinella* инфекције код домаћих свиња на територији Браничевског и Подунавског округа



% насељених места у којима је утврђено присуство *Trichinella* инфекције код домаћих свиња



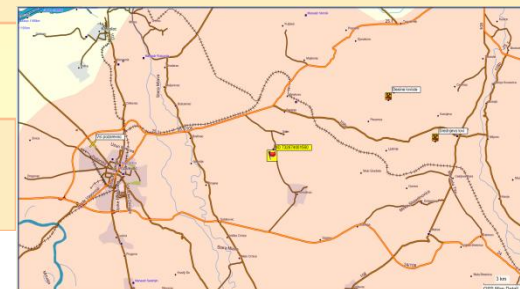
Географска распрострањеност различитих врста *Trichinella* на територији Браничевског и Подунавског округа



- Географски информациони системи имају значај у мапирању тренутне дистрибуције истраживане врсте агенса
- Идентификацијом тачне географске области у којој су заступљени паразитски зоонозни агенси, могу се унапредити епизоотиолошка и епидемиолошка истраживања, што би допринело развоју ефикасне превентивне стратегије
- На територији Србије први пут се ГИС користи 2010. године (*Zivojinovic et al., 2010*) за проучавање појаве трихинелозе у регији Браничевског округа

Дефинишу се следећи подаци за добијене резултате:

- а) назив домаћина (уобичајан и научни)
- б) старост домаћина и пол
- в) место порекла (насеље, општина, округ)
- г) географске координате (географска дужина и ширина)
- д) датум узимања узорка
- њ) врста испитиваног мишићног ткива

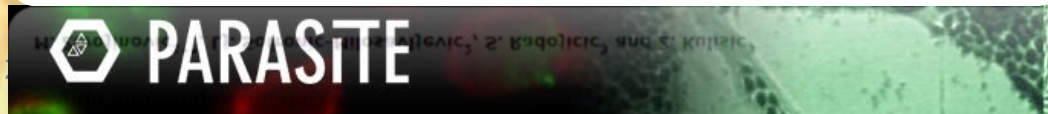
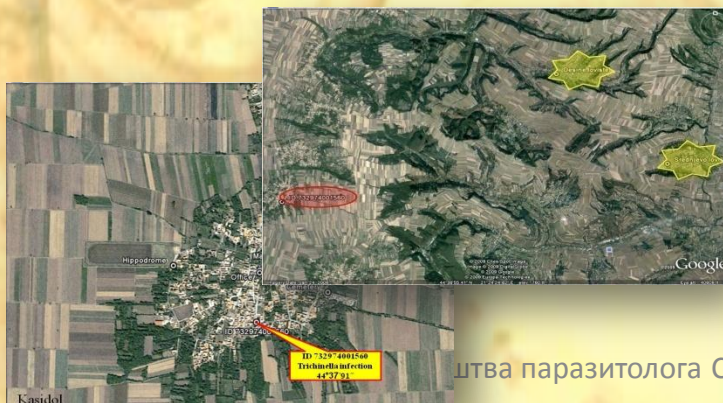


Parasite, 2010, 17, 369-373
Parasitic zoonoses in Europe

Application of GIS in epizootiological surveillance of swine trichinellosis in one endemic district in Serbia*

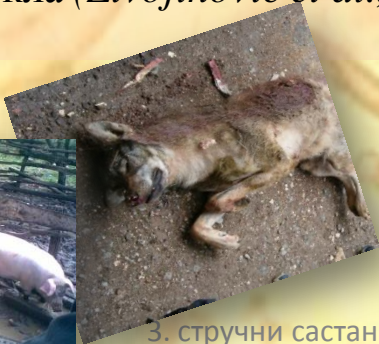
Utilisation du SIG dans la surveillance épidémiologique de la trichinellose du porc dans une région endémique de Serbie

M. Zivojinovic^{1}, Lj. Sofronic-Milosavljevic², S. Radojicic³ and Z. Kulisic³**



Географска распрострањеност различитих врста *Trichinella* на територији Браничевског и Подунавског округа

- присуство *T. spiralis* у популацији домаћих животиња, као и дивљих животиња уловљених близу насељених места, може се објаснити навикама у гајењу свиња на овој територији, где се свиње пуштају на испашу близу река Дунав, Морава, Млава, Пек, као и потока и стајаћих вода где лако могу доћи у контакт са дивљим животињама
- Постоји могућност директног додира са депонијама на којима свиње рију и конзумирају отпатке животињског порекла (*Zivojinovic et al., 2010*)
- Чест је случај неадекватног уништавања и одлагања животињских лешева и трупова у природи
- Десет од 256 насеља ове територије је одвојено Дунавом, као природном границом са Румунијом, где је забележено присуство и *T. spiralis* и *T. britovi* у популацији домаћих и дивљих животиња (*Blaga et al., 2009*)
- Услови држања у 90% газдинстава на којима је утврђена трихинелоза домаћих свиња су лоши. Свиње се хране отпаcima које садрже термички необрађене отпатке животињског порекла (*Zivojinovic et al., 2013*)



3. стручни састанак Друш



Trichinella infections in different host species of an endemic district of Serbia

M. Zivojinovic^{a,*}, Lj. Sofronic-Milosavljevic^b, J. Cvetkovic^b, E. Pozio^c,
M. Interisano^c, B. Plavsic^d, S. Radojicic^e, Z. Kulisic^e

^a Veterinary Specialist Institute, Pozarevac, Serbia

^b Institute for the Application of Nuclear Energy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

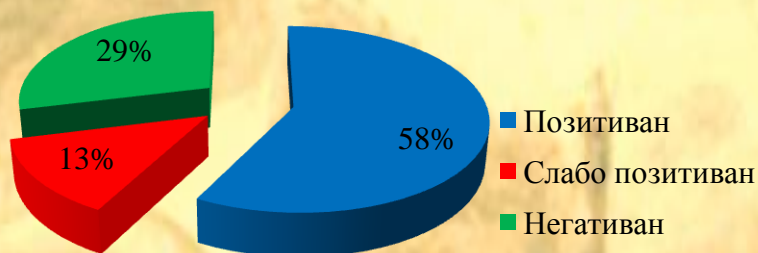
^c Department of Infectious, Parasitic, and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy

^d Veterinary Directorate, Ministry of Agriculture, Trade, Forestry and Water Management, Serbia

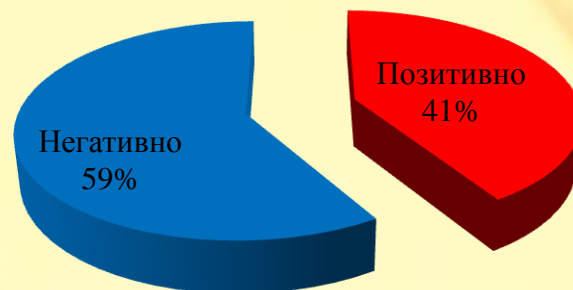
^e Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Серолошка испитивања на територији Браничевског и Подунавског округа

Број испитиваних узорака крвних серума домаћих свиња (ELISA тест)



Број испитиваних узорака месног сока пореклом од дивљих животиња (ELISA тест)



- Серолошки позитивне свиње су потицале са индивидуалних газдинстава на којима је утврђено присуство *Trichinella* инфекције након клања свиња
- Испитивањем су обухваћене и свиње пореклом са великих фарми – негативан резултат
- Сви испитивани узорци су показали исте резултата и након испитивања WB тестом

International Journal for Parasitology 42 (2012) 1017–1023

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect



International Journal for Parasitology

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara



A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs

Maria Angeles Gómez-Morales^{a,*}, Alessandra Ludovisi^a, Marco Amati^a, Radu Blaga^b, Milena Zivojinovic^c, Mabel Ribicich^d, Edoardo Pozio^a

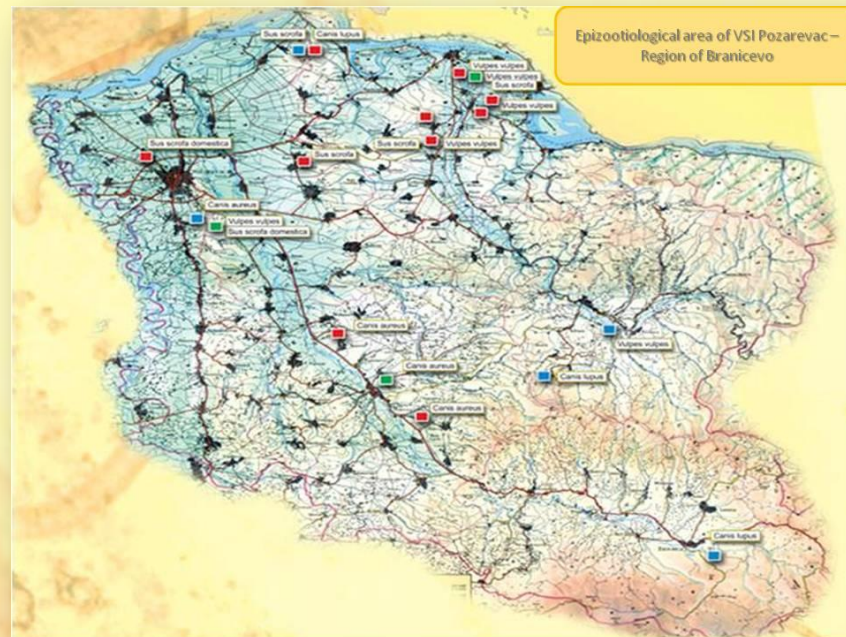
^a European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 Rome, Italy

^b Service de Parasitologie–Mycologie, ENVA, AFSSA, UMR BIPAR, USC INRA, Maisons-Alfort, France

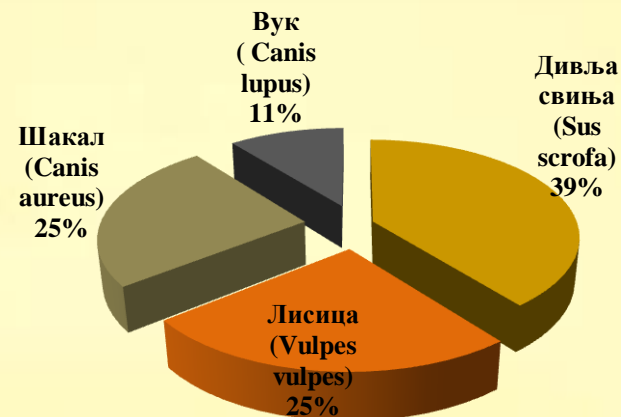
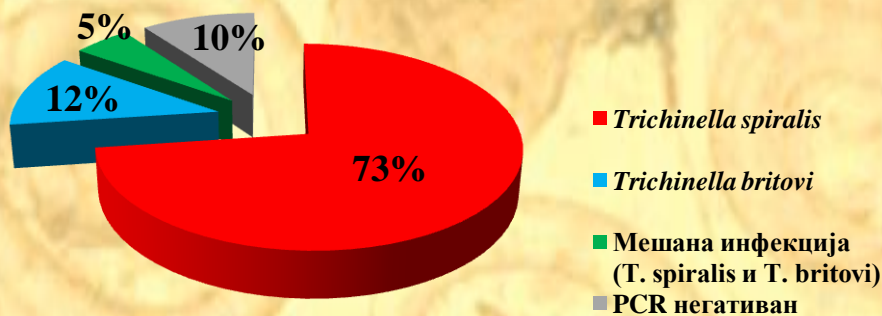
^c Veterinary Specialist Institute Pozarevac, Pozarevac, Serbia

^d Facultad de Ciencias Veterinarias, Buenos Aires, Argentina

Идентификоване врсте *Trichinella* код различитих домаћина на територији Браничевског и Подунавског округа



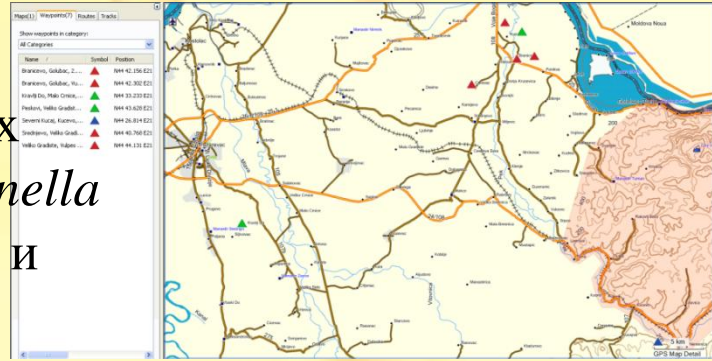
● *T. spiralis* ● *T. britovi* ● *T. spiralis* & *T. britovi*



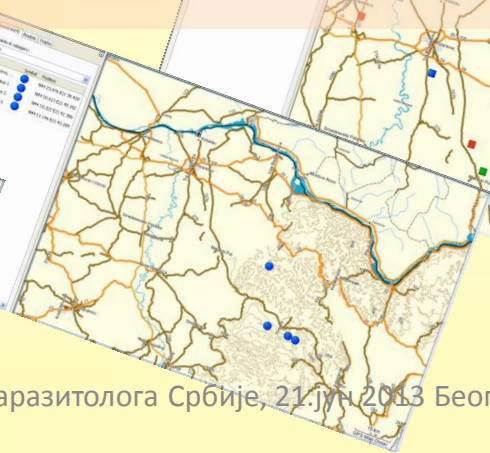
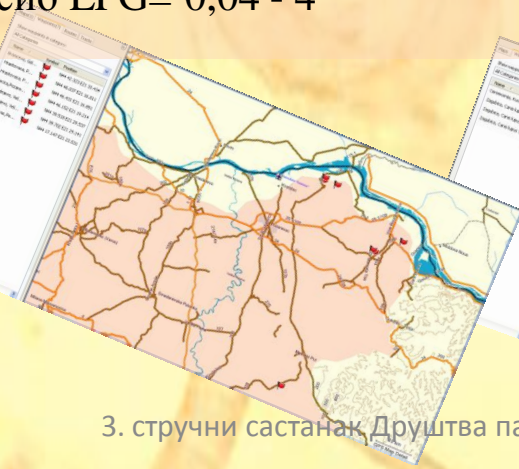
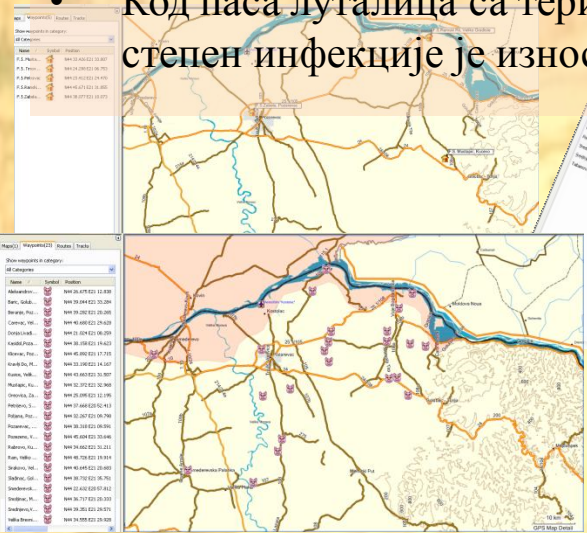
- *T. spiralis* је утврђена код лисица, шакала, дивље свиње, паса и домаћих свиња.
- *T. britovi* је утврђена код дивље свиње, шакала, лисице и вука.
- Присуство **обе врсте истовремено (*T. spiralis* и *T. britovi*)** у узорку пореклом од једног домаћина утврђено је код лисице и шакала.



Резултати епизоотиолошких истраживања врста рода *Tricninella* на територији Браничевског и Подунавског округа



- У односу на све испитиване узорке и добијене резултате најнижи ниво инфекције је утврђен у популацији домаћих свиња (LPG=0,03)
- Највећи број ларви по граму прегледаног узорка утврђен је у узорку мишићног ткива домаће свиње, које је било намењено за сушење и употребу као производ од меса (сушено месо) са територије општине Пожаревац (LPG=20)
- У популацији дивљих животиња степен инфекције се кретао од 0,11 код дивље свиње са територије општине Пожаревац и утврђеном *T.spiralis* до највећег LPG=19,45 код шакала са идентификованом врстом *T.britovi*
- Код паса луталица са територије општине Пожаревац утврђена је инфекција са *T.spiralis* и степен инфекције је износио LPG= 0,04 - 4



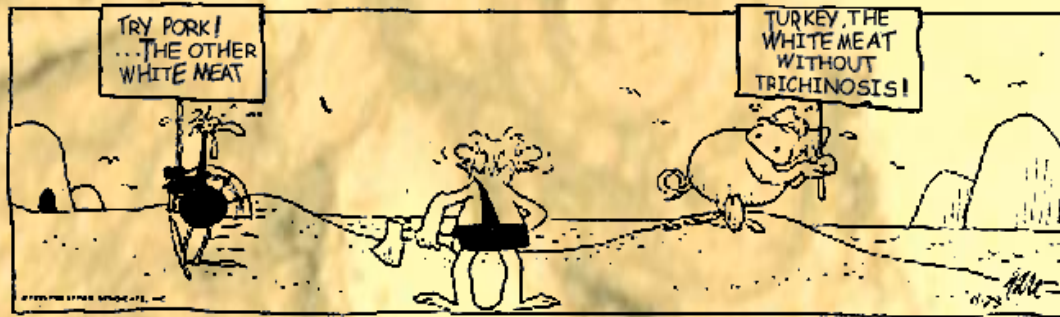
Географска распрострањеност различитих врста *Trichinella* на територији Браничевског и Подунавског округа

- Веома је значајно истаћи присуство инфекција *Trichinella* ларвама у популацији дивљих животиња на територији општина које нису препознате као ендемска подручја за трихинелозу домаћих свиња што указује на сталну угроженост домаћих свиња
- Потпуна је оправданост потребе мониторинга популације дивљих животиња за одређивање степена ризика од појаве трихинелозе у популацији животиња (домаће свиње и дивљач) намењених за људску употребу, као и сталне едукације ловаца
- На територији Србије налаз *T. britovi* у популацији дивљих животиња указује на њено присуство само унутар дивљег циклуса
- Неопходан је наставак систематске инспекцијске контроле меса намењеног за људску исхрану, као и сталне сарадње ветеринарске службе, хумане медицине, ловаца и држаоца животиња
- Нажалост и поред предузимања свих наведених мера трихинелоза људи је и даље присутна, зато је неопходно пре свега радити на едукацији потрошача, субјеката у производњи хране животињског порекла и ловаца



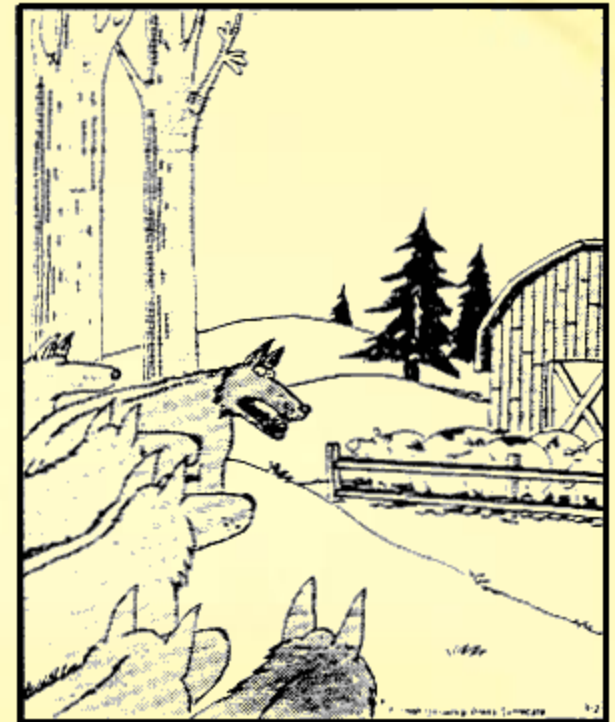
B. C.

BY JOHNNY HART



Хвала на пажњи

THE FAR SIDE



3. стручни saстанак Друштва паразитолога Србије, 21. јун 2013 Београд, Србија