

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Marija Lj. Gnjatović

**Primena 7C2C5 monoklonskog antitela u razvoju ELISA testova za
otkrivanje infekcije sa *Trichinella spp.* i izolaciju komponenti parazita koji
nose imunodominantni epitop**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Marija Lj. Gnjatović

**Application of 7C2C5 monoclonal antibody in the development of
ELISAs for the detection of *Trichinella* infection
and for the isolation of parasite components that carry an
immunodominant epitope**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018.

Mentor teze:

Dr Branko Bugarski, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Ljiljana Sofronić-Milosavljević, naučni savetnik
Univerziteta u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije - INEP

Članovi komisije:

Dr Zorica Jugović-Knežević, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Alisa Gruden-Movsesijan, viši naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije - INEP

Kandidat:

Marija Gnjatović, diplomirani inženjer tehnologije

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u projektu osnovnih istraživanja (projekat br. 173047B): „Izučavanje mehanizama imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti“, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2018. godine.

Eksperimentalni deo rada doktorske disertacije izveden je u laboratorijama Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu.

Rezime

Trihinelozu je parazitska infekcija izazvana nematodama iz roda *Trichinella*, pre svega *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*). Svi sisari, neke ptice i reptili su prijemčivi na infekciju sa jednom ili više vrsta iz roda *Trichinella*, ali samo ljudi razvijaju kliničku sliku bolesti. Infekcija ima kosmopolitsku distribuciju, prisutna je na svim kontinentima osim Antartika, gde do sada nije zabeležen nijedan slučaj. Do infekcije ljudi dolazi konzumiranjem nepregledanog, sirovog ili nedovoljno termički obradjenog mesa i mesnih prerađevina dobijenih od inficiranih domaćih i divljih životinja, a najčešće su u pitanju domaće svinje, konji i divlje svinje.

Na polju imunoparazitologije, praćenje incidencije i prevalencije infekcije parazitom iz roda *Trichinella* kod ljudi i životinja bazira se, pored ostalog, i na primeni *in vitro* dijagnostičkih testova koji detektuju specifična antitela u serumu inficiranog domaćina. Ovakvo praćenje je od izuzetnog značaja zbog činjenice da ova parazitoza predstavlja ozbiljan zdravstveni i ekonomski problem širom sveta, a naročito u zemljama centralne i istočne Evrope. Ključni problemi u imunodijagnostici infekcije izazvane sa *Trichinella spp.*, kako kod ljudi tako i kod životinja, jesu visok nivo nespecificnosti postojećih testova, zatim nepostojanje univerzalnih testova koji bi bili primenljivi u detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela kod više vrsta domaćina, nepostojanje testova za detekciju infekcije mnogih vrsta potencijalnih domaćina, pre svega različitih vrsta divljači. Takođe, veliki nedostatak postojećih testova jeste i niska senzitivnost testova u početnim fazama infekcije, odnosno visok procenat lažno negativnih rezultata koji se u testu dobijaju u periodu 2-4 nedelje nakon infekcije.

Korišćenjem monoklonskog antitela (mAt) 7C2C5, specifičnog prema epitopu jedinstvenom za mišićne larve roda *Trichinella*, razvijen je kompetitivni enzimski imunoesej (c-ELISA test) koji omogućava brzu detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela u serumima poreklom od različitih vrsta domaćina (ljudi, svinja, konja). Test koristi jedno antitelo - mAt 7C2C5 (HRP-konjugovano), kao kompetitivni i detektujući reagens u isto vreme, bez korišćenja sekundarnih antitela specifičnih prema vrsti koju detektuju, čime je omogućena identifikacija *Trichinella*-specifičnih antitela bez obzira na njihov izotip ili vrstu domaćina koji produkuje antitela od interesa. Primenljivost testa dokazana je na serumima ljudi inficiranih sa *T. spiralis* i *T. britovi*, serumima prirodno i eksperimentalno inficiranih svinja sa *T. spiralis* i *T. pseudospiralis* i serumima eksperimentalno inficiranih konja (*T. spiralis*). Primenljivost testa pokazana je i na limitiranom broju uzoraka eksperimentalno inficiranih

divljih svinja (uzročnik infekcije *T. spiralis*). Ovaj inovativni c-ELISA test pokazuje 100% specifičnosti i senzitivnosti, što je potvrđeno i primenom Western blot testa (WB). Test je jednostavan za korišćenje, a sa vremenom potrebnim za izvođenje testa od 45 minuta predstavlja najbrži format ELISA testa prikazan u literaturi. Ovaj test bi mogao biti koršćen za ispitivanje prisustva i raširenosti infekcije sa *Trichinella spp.*

Analiza jednog od potencijalnih markera rane dijagnostike humane trihineloze bila bi omogućena razvojem pouzdanog testa za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima, pošto takvi testovi nisu komercijalno dostupni, dok je senzitivnost testova razvijenih za potrebe naučnog rada, na nezadovoljavajućem nivou (35-75%). Detekcija parazit-specifičnih IgE antitela u velikoj meri je otežana činjenicom da je koncentracija ovih antitela u serumima pacijenata dosta niska i da je udeo ovih antitela u odnosu na druge klase parazit specifičnih antitela zanemarljiv. U klasičnom indirektnom ELISA testu, dolazi do blokiranja vezujućih mesta na antigenima vezanim za čvrstu fazu od strane koncentracijski dominantnijih klasa antitela, što u potpunosti onemogućava pouzdanu i reproducibilnu detekciju IgE specifičnih antitela. Ovde prikazano istraživanje fokusirano je na kreiranje novog ELISA testa koji bi omogućio pouzdanu detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u serumima pacijenata, tzv. "capture" ELISA testa za detekciju specifičnih IgE antitela. "Capture" *Trichinella* IgE ELISA test baziran je na primeni para monoklonskih antitela, anti humanih IgE antitela i 7C2C5 anti-*Trichinella* antitela. Dobijeni rezultati ukazuju na veliku pouzdanost testa u detekciji *Trichinella* specifičnih IgE antitela u humanim serumima. Na osnovu ROC analize i usvojene cut-off vrednosti (0.185 OD), postignute su dijagnostička senzitivnost i specifičnost testa od 97.6% i 97.5%, respektivno. Nijedan od korišćenih seruma za definisanje analitičke specifičnosti testa nije dao lažno pozitivan rezultat u testu (analitička specifičnost testa iznosila je 100%).

Hronična infekcija parazitom *T. spiralis* karakteriše se produkcijom poliklonskih antitela specifičnih prema antigenima *T. spiralis* od strane B limfocita koji su pod kontrolom T ćelija. Taj T-ćelijski odgovor u hroničnoj fazi infekcije predstavlja mešoviti Th1/Th2 tip imunskog odgovora uz predominaciju Th2 tipa, praćenu pokretanjem regulatorne mreže imunskog odgovora. Smatra se da se ovakav profil odgovora postiže dejstvom ekskretorno-sekretornih produkata mišićnih larvi (ES L1 antigen) parazita koji se proizvode u hroničnoj fazi infekcije, pomoću kojih parazit moduliše imunski odgovor domaćina i time obezbeđuje svoj dugotrajan opstanak u istom organizmu. Imunoblot analizom seruma ljudi i životinja inficiranih parazitom iz roda *Trichinella* utvrđeno je da, bez obzira na poreklo, svi serumi reaguju sa tri proteinske trake iz sastava ES L1 Ag (45, 49 i 53 kDa), što ukazuje da ovi

proteini nose immunodominantni epitop koji pokreće stvaranje specifičnih antitela sa jedne strane, odnosno utiče na pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora domaćina sa druge strane. Isti epitop na pomenutim proteinskim trakama prepoznaje i monoklonsko antitelo 7C2C5 (mAt) te je ono u ovom radu korišćeno za izolaciju 3 navedene proteinske frakcije (7C2C5 antigen), koje su se dalje koristile za ispitivanje potencijala da pokrenu imunski odgovor koji odgovara profilu odgovora aktiviranog sa ukupnim ES L1 antigenom. S obzirom da su dendritske ćelije (DĆ) najpotentnije antigen-prezentujuće ćelije u organizmu domaćina, korišćene su kao model sistem za in-vitro ispitivanje uloge ES L1 Ag i 7C2C5Ag u pokretanju imunskog odgovora. Stimulacija DĆ izolovanih iz periferne krvi kako sa ES L1 Ag *T. spiralis* tako i sa 7C2C5Ag, rezultira delimičnim sazrevanjem DĆ. Ovakve, delimično zrele DĆ imaju karakterističan fenotip, tj na njihovoj površini se detektuje niska ekspresija molekula važnih za interakciju sa T limfocitima i to i molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa antigena (HLA-DR) kao i kostimulatornih molekula CD83, CD86, kao značajna ekspresija kostimulatornih molekula iz grupe CD40. Analizom funkcionalnih karakteristika ovako tretiranih DĆ, dobijeni su jasani anti-inflamatorni citokinski profili u oba slučaja, a koje karakteriše nizak nivo produkcije IL-12 zajedno sa povećanom produkcijom anti-inflamatornog/regulatornog citokina IL-10. Rezultati su pokazali da stepen ekspresije površinskih markera pod uticajem 7C2C5 Ag odgovara stepenu ekspresije navedenih markera na DĆ stimulisanih ukupnim ES L1 Ag *T. spiralis*. Analiziranjem citokinskog profila uočeno je da DĆ stimulisane sa 7C2C5Ag proizvode isti nivo citokina IL-10 i IL-12p70 ali ne i citokina TGF- β kao i DĆ tretirane ES L1 antigenima. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da 7C2C5 Ag uzima značajno učešće u ukupnom efektu koji ES L1 Ag proizvodi na DĆ.

Ključne reči: *Trichinella spiralis*; 7C2C5 monoklonsko antitelo; ELISA test; imunski odgovor, dendritske ćelije.

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj:

Summary

Trichinellosis is parasitic infection caused by nematodes from the genus *Trichinella*, predominantly *T. spiralis*. A broad range of mammals, birds and reptiles are susceptible to infection with one or more species of the genus *Trichinella*, but only humans become clinically affected. The infection has a cosmopolitan distribution except Antarctica, where no case has been recorded so far. The main sources of human disease (trichinellosis) are pork, game and horse meat (or products) that contain infective muscle larvae.

In the field of immunoparasitology, estimation of incidence and prevalence of *Trichinella* infection in humans and animals, is of extreme importance having in mind the fact that this infection presents serious problem worldwide, and especially in countries of Central and East Europe. The key problems in immunodiagnosis of *Trichinella* spp. infection in humans as well as in animals are low specificity of commercially available tests and lackness of universal tests that can be applied for detection of *Trichinella*-specific antibodies in multiple host species. Also, the important weakness of the existing tests is their low sensitivity in the initial stage of the infection, since the high percentage of false negative results is obtained during the period of 2-4 weeks post infection (p.i).

Application of the monoclonal antibody (mAb) 7C2C5, specific for an epitope unique to the muscle larvae of the whole *Trichinella* genus (epitope is present on molecular triplet with 45, 49 and 53 kDa), we have developed a competitive (c)-ELISA that enables a rapid detection of *Trichinella*-specific antibodies in the sera originating from different host species (human, swine and horse). The test employs a single antibody, mAb 7C2C5 (HRP labeled), as both the competing and detecting reagent, which allows the detection of specific antibodies irrespective of their isotype or host origin and infected with either *Trichinella spiralis* or *Trichinella britovi*. This novel c-ELISA exhibited 100% specificity and sensitivity, as confirmed by the Western blot test. The assay is easy-to-use (one incubation step), and the 45-minute time required for the procedure is shorter than in any other ELISA format. The applicability of the test was demonstrated on sera from humans infected with *T. spiralis* and *T. britovi*, pigs infected with *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* and sera of experimentally infected horses (*T. spiralis*). The applicability of the test was also demonstrated on the limited number of sera from experimental infected wild boars (*T. spiralis* infection). This test could be useful for both the detection and surveillance of *Trichinella* infections.

An analysis of one of the potential markers for early diagnosis of human trichinosis such as *Trichinella*-specific IgE antibodies in human sera would be possible by the development of a reliable test for its detection. Namely, such tests are not commercially

available, while the sensitivity of the tests developed for scientific need is not at the satisfactory level (35- 75%). Problems in the detection of *Trichinella*-specific IgE antibodies by a classical indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) arise from its unfavorable competition with IgG antibodies for binding to antigen coated wells. This is a consequence of the naturally low concentration of IgE in sera, compared to the many times higher concentration of IgG. This does not mean that *Trichinella*-specific IgE antibodies in the sera could not be detected, but the probability for their detection with classical ELISA is very low, due to reduced sensitivity of the technique, which causes false negative (FN) results. The research presented here focuses on the creation of a new ELISA that would enable the reliable detection of *Trichinella*-specific IgE antibodies in human sera – “capture” ELISA test for the detection of specific IgE antibodies. “Capture” *Trichinella* IgE ELISA test is based on the application of two monoclonal antibodies, anti human IgE antibodies as capture, and 7C2C5 anti-*Trichinella* as detection antibodies. The obtained results indicate the high reliability of the test in the detection of *Trichinella* specific IgE antibodies in human sera. Based on ROC analysis and adopted cut-off values which was 0.185 OD, obtained diagnostic sensitivity and specificity were 97.6% and 97.5%, respectively. None of the sera used to define the analytical specificity of the test did not give a false positive result in the test (analytical specificity of the test was 100%).

Chronic infection with *T. spiralis* is characterized by the production of polyclonal antibodies specific for *T. spiralis* by B lymphocytes during the adoptive phase of immune response and in the context of T-dependent B cell activation. This T-cell response in the chronic phase of *Trichinella* infection is very characteristic since it encompasses a mixed Th1/Th2 type of immune response with predomination of Th2 type, followed by the initiation of the strong regulatory network of the immune response. It is believed that this profile of the response is provided by the presence of the ES L1 antigen, produced in the chronic phase of *Trichinella*-infection and by which the parasite modulates the immune response of the host, thereby ensuring its long-term survival in the same organism. By immunoblot analysis of the sera from humans and animals infected with parasite from the *Trichinella* genus, it was found that, regardless of the origin, all sera react with three protein bands of ES L1 Ag (45, 49, and 53 kDa), indicating that these proteins carry an immunodominant epitope which initiates the production of specific antibodies on the one hand and probably affects the initiation of the host's immune response on the other. The same epitope on the aforementioned protein bands is also recognized by the 7C2C5 mAb thus used for isolation of particular protein fractions (e.g. triplet designated as 7C2C5 Ag), which were further tested for the potential to trigger an

immune response comparing that one initiated with ES L1. Since the dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells in the host organism, they were used as a model system for in-vitro testing the role of ES L1 and 7C2C5Ag in initiating the immune response. Stimulation of DCs isolated from peripheral blood, with ES L1 Ag and 7C2C5Ag from *T. spiralis* resulted in incomplete DCs maturation (e.g. semi mature status of DCs with tolerogenic properties) characterized by low expression of HLA-DR and co-stimulatory molecules CD83, CD86, as well with significant expression of CD40 co-stimulatory molecules. By the analysis of the functional characteristics of the treated DCs, a clear anti-inflammatory cytokine profile in both cases was obtained, characterized by a low level of IL-12 production along with increased production of anti-inflammatory/regulatory cytokine IL-10. The results showed that the degree of expression of surface markers under the influence of 7C2C5Ag corresponds to the degree of expression of the same markers on the DCs stimulated by the total ES L1 Ag of *T. spiralis*. Analyzing the cytokine profile it was observed that DCs stimulated with 7C2C5Ag produces the same level of cytokines IL-10, IL-12p70 but not TGF- β as well as DCs treated with ES L1 antigens. According to the presented results it can be concluded that 7C2C5Ag takes a significant role in the total effect on DCs that was produced by ES L1 Ag of *T. spiralis*.

Key words: *Trichinella spiralis*; 7C2C5 monoclonal antibody; ELISA; immune response; dendritic cells.

Scientific field: Chemistry and Chemical technology

Scientific discipline: Biochemical engineering and biotechnology

UDC number:

Skraćenice:**2-DE - dvo-dimenzionalna elektroforeza****7C2C5Ag - 7C2C5 antigen *Trichinella spiralis* izolovan na 7C2C5 koloni****Ag - antigen****ANOVA - analiza varijanse (engl. analysis of variance)****APĆ - antigen-prezentujuća ćelija****AUC – površina ispod ROC krive (eng. Area under the roc curve****c-ELISA – kompetitivni imunoenzimski test na čvrstoj fazi (engl. enzyme-Linked Immunosorbent Assay)****CI – interval pouzdanosti (engl. confidence interval)****CV – koeficijent varijacije (eng. coefficient of variation)****DA - Dark Agouti****DĆ – Dendritska ćelija****DSe – dijagnostička senzitivnost****DSp – dijagnostička specifičnost****EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis****ELISA - imunoenzimski test na čvrstoj fazi (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent****ES L1 - ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi *Trichinella spiralis*****FN – lažno negativni rezultati (eng. false negative)****FP – lažno pozitivni rezultati (eng. false positive)****HLA-DR - sistem leukocitnih antigena (eng. human leukocyte antigen)****HRP – peroksidaza rena (eng. horseradish peroxidase)****ICAM – unutarćelijski adhezivni molekul (engl. Intracellular Adhesion Molecule)****IFN- γ - interferon- γ** **IIF – Indirektna imunofluorescencija****IL - interleukin****LPS - lipopolisaharid****mAt- monoklonsko antitelo****MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. major histocompatibility Complex)****NBL - novorođena larva (engl. new born larvae)****NK – ćelije ubice (ng. natural killer cells)****NPV – negativna prediktivna vrednost****OD – optička gustina (eng. optical density)**

- OIE – svetska organizacija za zdravlje životinja (eng. World Organisation for Animal Health, historical acronym OIE)**
- PC - fosforilholin**
- PI – procenat inhibicije**
- PPV – pozitivna prediktivna vrednost**
- ROC – eng. Receiver operating characteristic**
- RT – sobna temperatura**
- SD – standardna devijacija**
- SDS-PAGE - (engl. Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)**
- T. britovi – Trichinella britovi***
- T. murelli – Trichinella murelli***
- T. nativa – Trichinella nativa***
- T. nelsoni – Trichinella nelsoni***
- T. papue – Trichinella papue***
- T. spiralis - Trichinella spiralis***
- T. suis - Trichuris suis***
- T. zimbabwensis - Tichinella zimbabwensis***
- TGF- β – faktor transformacije rasta- β (engl. Transforming Growth Factor- β)**
- TN – istinito negativni rezultati (eng. true negative)**
- tolDĆ-tolerogene dendritske ćelije**
- TP – Istinito pozitivni rezultati (eng. true positive)**
- Treg - regulatorna T ćelija**
- TSL antigeni - antigeni druge grupe *T. spiralis* koji indukuju kasnu fazu imunskog**
- VEGF - vaskularni endotelijalni faktor rasta**
- WB – Western blot**
- WHO – Svetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization)**

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Parazit <i>Trichinella spiralis</i>, životni ciklus i odnos parazit-domaćin	2
1.2. Antigeni parazita <i>T. spiralis</i>	5
1.2.1. Ekskretorno-sekretorni antigen mišićnih larvi parazita <i>T. spiralis</i> (ES L1 Ag)	7
1.3. Uloga parazita <i>Trichinella spiralis</i> na pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora	8
1.4. Uloga DĆ u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora	9
1.5. Humoralni imunski odgovor na infekciju <i>Trichinella</i>-om	11
1.6. Primena seroloških metoda detekcije infekcije <i>Trichinella</i>-om kod ljudi i životinja	13
1.6.1. Serološki testovi za otkrivanje <i>Trichinella</i> -infekcije kod životinja i ljudi	15
2. CILJEVI RADA	22
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Priprema antigena parazita	24
3.1.1. Održavanje soja parazita <i>T. spiralis</i>	24
3.1.2. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) <i>T. spirali</i>	24
3.1.3. Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ES L1) <i>T. Spiralis</i>	24
3.2. Produkcija monoklonskog 7C2C5 antitela	25
3.2.1. Izolacija monoklonskih antitela iz ascita	26
3.2.2. Aktivacija Sepharose 4B sa CNBr – Priprema kolone za afinitivno izolovanje imunodominantnog 7C2C5 Ag	27

3.3.	Izolacija imunodominantnih komponenata antigena <i>T. spiralis</i> iz sirovog antigena primenom afinitivne hromatografije	28
3.4.	Priprema konjugata mAt 7C2C5-HRP	29
3.5.	Razvoj i validacija kvalitativnih i semikvantitativnih ELISA testova ..	29
3.5.1.	Optimizacija i standardizacija dijagnostičkih testova	29
3.5.2.	Validacija dijagnostičkih testova	30
3.6.	Razvoj i validacija <i>Trichinella</i> c-ELISA test	33
3.6.1.	Optimizacija i standardizacija uslova izvođenja <i>Trichinella</i> c-ELISA testa	35
3.6.2.	Validacija <i>Trichinella</i> c-ELISA test	36
3.7.	Razvoj testa za detekciju <i>Trichinella</i>-specifičnih IgE antitela	36
3.7.1.	Pojačani indirektni ELISA test za detekciju <i>Trichinella</i> -specifičnih IgE antitela	37
3.7.2.	Pojačani indirektni ELISA test za detekciju <i>Trichinella</i> -specifičnih IgE antitela koji koristi RF-tretirane uzorke	38
3.7.3.	Capture <i>Trichinella</i> IgE ELISA test	38
3.8.	Ispitivanje uloge 7C2C5 Ag u pokretanju imunskog odgovor	40
3.8.1.	Kultivacija humanih DC iz monocita periferne krvi	40
3.8.2.	Određivanje fenotipskih i funkcionalnih karakteristika humanih DC	40
3.8.3.	Statistička obrada podataka	41
4.	REZULTATI	42
4.1.	Razvoj i validacija <i>Trichinella</i> c-ELISA testa	43
4.1.1.	Karakterizacija imunoreaktivnosti 7C2C5 monoklonskog antitela ...	43
4.1.2.	Optimizacija i sandardizacija uslova izvođenja testa	45

4.1.3.	Ispitivanje robusnosti testa – Uticaj vremena inkubacije i uslova mešanja na rezultat <i>Trichinella</i> c-ELISA testa	46
4.1.4.	Validacija <i>Trichinella</i> c-ELISA testa	48
4.2.	Razvoj testa za detekciju <i>Trichinella</i>-specifičnih IgE antitela	58
4.2.1.	Pojačan indirektni ELISA test namenjen detekciji <i>Trichinella</i> -specifičnih IgE antitela – <i>Trichinella</i> IgE i-ELISA test	59
4.2.2.	Indirektni ELISA test namenjen detekciji <i>Trichinella</i> -specifičnih IgE antitela sa korišćenjem RF-tretiranih uzoraka	60
4.2.3.	„Capture” <i>Trichinella</i> IgE ELISA test namenjen detekciji <i>Trichinella</i> -specifičnih IgE antitela	62
4.3.	Ispitivanje uloge 7C2C5 antigena na pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora	64
4.3.1.	HPLC i elektroforetska analiza izolovanog 7C2C5Ag	65
4.3.2.	Fenotipske karakteristike DC stimulisanih sa ES L1 i 7C2C5 antigena	66
4.3.3.	Citokinski profil DC stimulisanih antigenima ES L1 i 7C2C5	69
5.	DISKUSIJA	71
6.	ZAKLJUČAK	85
	Literatura	88

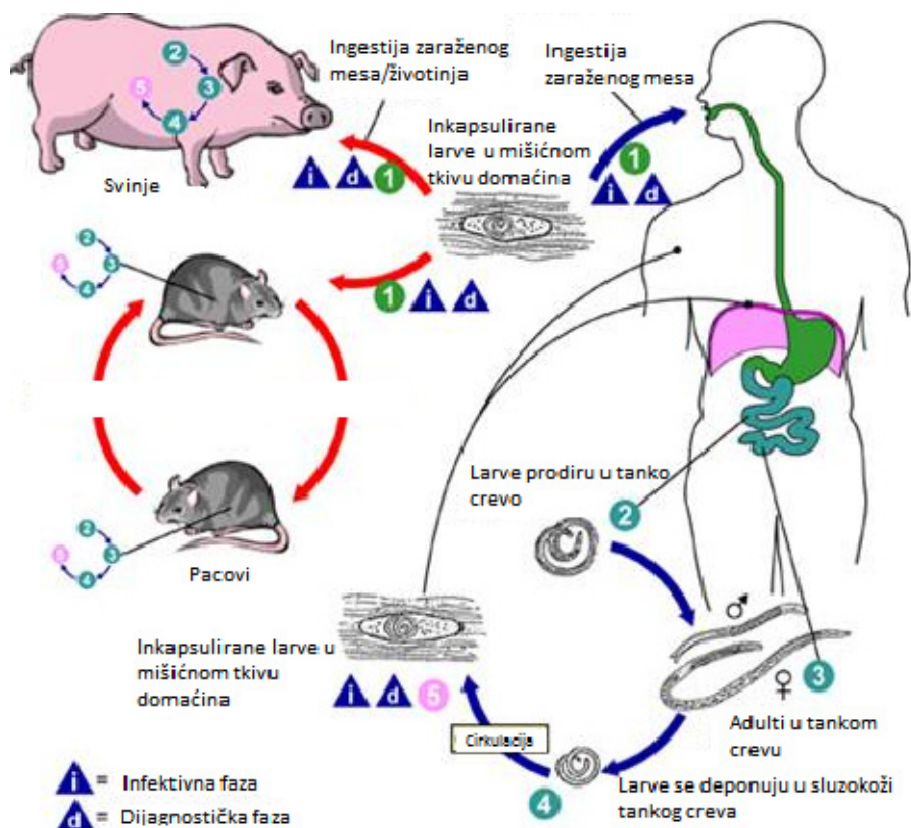
1. UVOD

1.1. Parazit *Trichinella spiralis*, životni ciklus i odnos parazit-domaćin

Trihinelozu je parazitska infekcija izazvana nematodama iz roda *Trichinella*, pre svega *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*). Svi sisari, neke ptice i reptili prijemčivi su na infekciju sa jednom ili više vrsta iz roda *Trichinella*, ali samo ljudi razvijaju kliničku sliku bolesti. Infekcija ima kosmopolitsku distribuciju, prisutna je na svim kontinentima osim Antartika, gde do sada nije zabeležen nijedan slučaj. Rod *Trichinella* danas čini 9 vrsta (*T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. britovi*, *T. murelli*, *T. Papuae*, *T. zimbabwensis* i *T. patagoniensis*) i tri genotipa (T6, T8 i T9) koji se, u zavisnosti od toga da li imaju sposobnost stvaranja kapsule ili ne, dele na inkapsulirane i neinkapsulirane forme. Inkapsulirane forme inficiraju sisare uključujući čoveka i obuhvataju šest vrsta (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murelli*, *T. nelsoni* i *T. patagoniensis*) i tri genotipa (*Trichinella* T6, T8 i T9). Tri vrste: *T. pseudospiralis*, *T. papuae* i *T. zimbabwensis* ubrajaju se u neinkapsulirane forme. *T. pseudospiralis* inficira sisare i ptice, dok druge dve vrste *T. papuae* i *T. zimbabwensis* inficiraju gmizavce i sisare. Većina vrsta *Trichinella*, izuzev *T. spiralis*, inficira pre svega divlje životinje (FAO/WHO/OIE, Dupouy-Camet i Murell, 2007).

Rod *Trichinella* jedinstven je među helmintima po tome što se sva tri stadijuma životnog ciklusa: adult, novorođena larva (engl. new born larvae-NBL) i infektivna mišićna larva (L1), odvijaju u jednom domaćinu (Slika 1). Dva stadijuma, adult i mišićna larva su intracelularni, dok je NBL pozicionirana ekstracelularno. Adulti okupiraju intestinalni epitel tankog creva dok mišićne larve naseljavaju skeletne mišiće. Za razliku od većine intracelularnih parazita, *Trichinella* okupira mišićne ćelije domaćina, ali ih ne ubija i zato se smatra jednim od najuspešnijih parazitskih simbionata (Wu i sar., 2008). Do infekcije domaćina dolazi konzumiranjem mesa koje u sebi sadrži inkapsulirane infektivne larve L1. Tokom varenja, kapsule se razlažu u želucu pod uticajem hlorovodonične kiseline i gastrointestinalnih enzima, što rezultira oslobađanjem infektivnih larvi. Oslobođene larve se aktiviraju pod dejstvom žučnih sokova i prodiru u mukoza tankog creva, presvlače se četiri puta tokom prvih 30 sati (stadijumi sazrevanja L2-L4) i zatim sazrevaju u adulte. Adulti kopuliraju i već nakon 5-6 dana od infekcije ženke produkuju NBL. Novorođene larve oslobođene u crevnoj mukozu prodiru u krvotok i limfotok i na taj način dospevaju u razna tkiva i organe, uključujući miokard, mozak, ali samo one koje prodiru u poprečno-prugaste mišiće mogu nastaviti svoj razvoj. Larve probijaju sarkolemu mišićnih ćelija i ulaze u citoplazmu ćelija. Inficirana mišićna ćelija podleže reprogramiranju genetskog materijala,

gubi organizaciju mišićne ćelije, dolazi do njenog remodelovanja i transformacije u novu strukturu poznatu pod nazivom ćelija negovateljica. Period od kada larva uđe u mišićnu ćeliju do formiranja kompleksa parazit-ćelija negovateljica traje 21 dan (Despomier, 1998).



Slika 1. Životni ciklus *T. spiralis*. Nakon konzumiranja inficiranog mesa, pod uticajem hlorovodonične kiseline i enzima, *Trichinella* larve se oslobađaju iz ćelija negovateljica. Oslobođene larve prodiru u mukožu creva gde se presvlače i sazrevaju u adulte. Adulti kopuliraju i ženke produkujaju novorođene larve koje putem cirkulatorne mreže dospevaju u poprečno-prugastu muskulaturu gde formiraju kompleks larva-ćelija negovateljica (Izvor: https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2010/Angelia_Wang/TrichinosisSiteFINA.L.htm).

Ćelije negovateljice predstavljaaju novu vrstu ćelija u organizmu domaćina bez ikakve morfološke i biohemijske sličnosti sa neinficiranim mišićnim ćelijama (Slika 2). Ove ćelije nastaju fuzijom inficirane mišićne ćelije i traumom aktivirane satelitske ćelije. Danas se veruje da produkti larvi pokreću dobro balansirane pro- i anti-apoptotske mehanizme koji ne samo da zaustavljaju potpuno sazrevanje satelitske u mišićnu ćeliju već istovremeno zaustavljaju i razgradnju invadirane mišićne ćelije u kojoj dovode do stvaranja velikog broja

hipertrofičnih jedara. Utvrđeno je da se ekskretorno-sekretorni produkti mišićnih larvi (ES L1) *T. spiralis* nalaze u citosolu i nukleusima mišićnih ćelija i zato se smatra da oni mogu imati važnu ulogu u reorganizaciji mišićnih ćelija domaćina (Guiliano i sar., 2009). U inficiranim ćelijama domaćina primećena je smanjena ekspresija strukturnih i regulatornih gena mišićnih ćelija odgovornih za produkciju kontraktilnih proteina, aktina i miozina, inaktiviran je program za diferencijaciju ćelija, dok je sa druge strane uočena povećana ekspresija gena odgovornih za stvaranje novih transkripata kao što su transmembranski glikoprotein - syndecan, kisela fosfataza, kolagen i solubilni faktor, vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF) (Jasmer i sar., 1991; Jasmer, 1993; Despommier, 1998; Beiting i sar., 2004). Kao rezultat procesa reorganizacije ćelija nastaje ćelija negovateljica, oko koje počinje da se stvara kapsula, poreklom od domaćina, izgrađena većim delom od kolagena tipa IV (sintetisan od strane ćelije negovateljice i čini unutrašnji sloj kapsule) i VI (sintetisan od okolnih fibroblasta i čini spoljašnji sloj kapsule) (Despommier, 1998). Kapsula je polupropustljiva membrana, obavijena novonastalim krvnim sudovima-venulama i omogućava prolaz hranljivih materija male molekulske mase u pravcu parazita kao i ES L1 produkata u pravcu domaćina, ali je nepropustljiva za specifična antitela i ćelije usmerene protiv komponenti parazita. Zato se kaže da parazit ima imunoprivilegovano mesto u organizmu domaćina. S druge strane, *T. spiralis* svojim produktima direktno komunicira sa organizmom domaćina, njegovim imunokompetentnim ćelijama i na taj način modulira imunski odgovor domaćina. Može se reći da metaboliti parazita utiču ne samo na formiranje ćelije negovateljice i održavanje homeostaze u okviru nje, već i na održavanje homeostaze na nivou čitavog organizma, i kreiranje sredine koja obezbeđuje opstanak parazita i organizma domaćina (Bruschi i sar., 2002).



Slika 2. Inkapsulirana mišićna larva *T. spiralis* (Izvor: http://uvmecoparasit.wikia.com/wiki/Trichinella_spiralis)

Infekcija životinja nije praćena simptomima bolesti. Kod ljudi, bolest vrlo retko ima smrtni ishod a zavisno od doze simptomi mogu izostati ili se pak razvija klinička slika koja nije praćena patognomoničnim (karakterističnim) znacima i simptomima. Ipak se smatra da ako se od niza simptoma (malaksalost, povišena temperatura, nauzea, vomitus, dijareja, otoci očnih kapaka, konjuktivitis, osip na koži, bolovi u mišićima) ispolje bar tri, i ako se uz prisustvo određenih biohemijskih parametara (povećane aktivnosti enzima koji se oslobađaju iz oštećenih mišićnih ćelija - kreatin-kinaze, aldolaze, transaminaze), i pojave hematoloških promena u vidu izrazite leukocitoze sa enormnom eozinofilijom, dobije nalaz specifičnih antitela u serumu i epidemiološka i parazitološka potvrda da su ljudi jeli meso životinje inficirane sa *Trichinella* spp., onda može doći do sigurnog postavljanja dijagnoze trihineloze i uvodjenja terapije sa antihelminthicima (Dupouy-Camet i sar., 2002).

1.2. Antigeni parazita *T. spiralis*

Imunski odgovor domaćina na infekciju izazvanu parazitom iz roda *Trichinella*, intenzivno je proučavan kako u prirodnim tako i u eksperimentalnim infekcijama. Glavno interesovanje istraživača odnosilo se na definisanje imunodominantnih epitopa sposobnih da indukuju imunski odgovor koji ima ulogu u zaštiti domaćina od reinfekcije, ili onih epitopa (antigena) koji se mogu koristiti u dijagnostičke svrhe. Kao i kod drugih vrsta helminata, antigeni *T. spiralis* se prema mestu nastanka mogu podeliti na površinske, ekskretorno/sekretorne (ES) i somatske antigene. Predpostavlja se da su površinski antigeni najvažniji za prepoznavanje od strane imunskog sistema domaćina, kao mesto kontakta parazita i domaćina, ali je takođe pokazano da se i unutrašnji antigeni mogu eksprimirati na površini kutikule. Sekretovani antigeni mogu da favorizuju preživljavanje parazita blokirajući imunitet domaćina usmeren prema kutikularnim antigenima (Kaslow i sar., 1988).

Tokom životnog ciklusa, *T. spiralis* ekspirira brojne molekule od kojih su neki karakteristični za pojedine stadijume životnog ciklusa (stadijum-specifični), dok su drugi prisutni u svim stadijumima (Nakada i sar., 2005). Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum parazita dolazi do promena u ekspresiji antigenskih molekula, što može biti jedna od strategija izbegavanja odbrane domaćina. Razlike u strukturi antigena specifičnih za svaki stadijum ponaosob, dovode do pokretanja imunskog odgovora karakterističnog za svaku fazu životnog ciklusa ovog parazita tj. stadijum-specifičnog imunskog odgovora domaćina (Boireau i sar., 2000).

Mnogi od ovih antigena su imunogeni, indukuju imunski odgovor koji je bifaznog karaktera i u zavisnosti od vremena kada indukuju produkciju antitela u toku infekcije podjeljeni su na antigene prve i antigene druge grupe. Naime, prva faza nastanka specifičnih antitela u cirkulaciji domaćina javlja se već nakon dve nedelje od trenutka započinjanja infekcije (na kraju intestinalne faze infekcije), dok se druga faza produkcije antitela javlja 4-5 nedelja nakon infekcije (tačnije tokom mišićne faze infekcije). Antigeni prve grupe (tzv. fast responding Ag) se nalaze u unutrašnjim slojevima kutikule, hemolimfi, embrionskim omotačima, hipodermalnoj žlezdi, stihocitima i egzokrinim granulama reproduktivnog trakta mišićnih larvi (Takahashi i sar., 1990). Pored toga, rana faza odgovora specifična je za antigene koji u svom sastavu sadrže fosforilholin (PC) (Takahashi i sar., 1993). Fosforilholin je fosfolipid, mali haptent, koji je važan za razvoj i fertilitet, a ujedno ima ulogu u modulaciji imunskog sistema domaćina u smislu ublažavanja ili gašenja inflamatornog odgovora, što može doprineti ne samo dugotrajnom preživljavanju parazita već i ograničavanju patoloških promena u tkivima domaćina (Grabitzki i Lochnit, 2009). Posmatrajući ultrastrukturni nivo, uočen je potpuni izostanak PC-antigena u novorođenim larvama, dok su u unutrašnjoj strukturi mišićnih larvi i odraslih parazita, ovi antigeni bili prisutni u izobilju. Pokazano je da se antitela nastala prema fosforilholinu javljaju 9 dana nakon infekcije i da nemaju protektivnu ulogu u zaštiti od infekcije (Peters i sar., 1999).

Druga grupa antigena označena je kao grupa II (tzv. slow responding Ag) ili TSL grupa antigena (Appleton i Romaris, 2001). Antigeni drupe II indukuju kasnu fazu imunskog odgovora i izazivaju pojavu antitela 4-5 nedelja nakon infekcije (Dea-Ayuela i Bolas-Fernandez, 1999). Oni se nalaze na površini, stihocitnim granulama i ES produktima L1 larvi *T. spiralis* (Takahashi, 1997; Bolas-Fernandez i sar., 2006). Antigeni koji indukuju kasnu fazu antitelnog odgovora, po svom hemijskom sastavu pripadaju grupi glikoproteina. Primenom monoklonskih antitela sintetisanih prema TSL grupi antigena, izvršena je klasifikacija pojedinačnih antigena iz ove grupe u 8 grupa (TSL1- TSL8) (Ortega-Pierres i sar., 1996). TSL-1 grupa antigena je najviše proučavana i najbolje okarakterisana grupa antigena kako biohemijski tako i imunološki, zbog svog potencijala da indukuje jak imunski odgovor domaćina i zbog činjenice da je ova grupa antigena prepoznata od strane velikog broja potencijalnih domaćina (Ortega-Pierres i sar., 1996; Bolas-Fernandez i sar., 2006). Ovi antigeni se oslobađaju (sekretuju ili ekskretuju) najpre u intestinalnom epitelu ubrzo nakon infekcije, a potom ponovo tek kada se NBL larve nasele u mišićima i počne njihova transformacija u L1 formu. TSL-1 Ag čine oko 3% ukupne mase homogenata mišićnih larvi (ML). Grupa Ag označena kao TSL-1 migrira u SDS-PAGE elektroforezi izvedenoj pod

redukujućim uslovima u zoni molekularskih težina od 40-70 kDa, pri čemu se razdvaja na najmanje 6 proteinskih traka (Ortega-Pierres i sar., 1996). Navedena grupa antigena deli zajednički ugljenohidratni epitop - tivelozu (3,6- dideoksi-D-arabinoheksosa, Tyv), karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog roda *Trichinella* (Gomez-Morales i sar., 2008). Ovaj antigen je pre svega lokalizovan na površini kutikule i alfa-stihocitnim granulama, oba kompartmenta omogućavaju kontak parazita i domaćina a time i aktivaciju imunskog odgovora domaćina. Pojedini antigeni iz grupe TSL-1 Ag su stadijum specifični dok se drugi ekspimiraju u više faza životnog ciklusa parazita. Primenom 7C2C5 monoklonskog antitela dokazano je prisustvo epitopa specifičnog isključivo za stadijum mišićnih larvi (L1), lociranog na proteinima iz sastava TSL-1 grupe ES L1 Ag molekularskih težina 45, 49 i 53 kDa. Epitop prepoznat od strane 7C2C5 Ag karakterističan je za čitav rod *Trichinella* (Gamble i Graham, 1984a,b). Druga istraživanja su pokazala da je glikoprotein od 53 kDa prisutan u ES produktima ne samo mišićnih larvi *T. spiralis* već i odraslih parazita. Antitela protiv ove komponente TSL-1 Ag sintetišu se 8 dana posle infekcije (Romaris i sar., 2002) što ukazuje na ulogu ovog glikoproteina u indukciji ranog odgovora na infekciju sa *Trichinella*-om (Nagano i sar., 2008)

1.2.1. Ekskretorno-sekretorni antigen mišićnih larvi parazita *T. spiralis* (ES L1 Ag)

Ekskretorno-sekretorni antigen mišićnih larvi parazita *T. spiralis* (ES L1 Ag) značajan je za istraživanja ne samo zbog njegove uloge u formiranju ćelija negovateljica već i zbog uloge koju ima u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora a kao preduslov za održavanje sistema parazit-domaćin. ES L1 Ag kontinuirano se oslobađa u cirkulaciji tokom života inkapsulirane mišićne larve i predstavlja stalan stimulus za imunski sistem. Parazit na ovaj način kreira sredinu koja je pogodna ne samo za njegovo preživljavanje u domaćinu, već i za preživljavanje domaćina. Analizom ES L1 antigenske proteinske smeše primenom dvodimenzionalne elektroforezom (2-DE) detektovano je 150 proteinskih tačaka, molekularskih težina od 14 do 66 kDa (Wang i sar., 2013). Druge studije su takođe identifikovale postojanje jednog proteina iz sastava ES L1 Ag u više proteinskih tačaka, kao što su 5'-nukleotidaza i serin proteaze (Robinson i Connolly, 2005; Bien i sar., 2012). Identifikacija jednog proteina u više tačaka može se objasniti postojanjem više izoformi jednog proteina, nastalih kao posledica alternativnog slajsovanja i posttranslacionih modifikacija (hemijska modifikacija proteina) koje obuhvataju fosforilaciju, acetilaciju, glikozilaciju i koje su važne za biološku funkciju proteina u preživljavanju parazita, izbegavanju imunskog sistema i imunopatogenezu (Bien i sar., 2012; Wang i sar., 2014).

Najzastupljeniji proteini u sastavu ES L1 Ag jesu glikoproteini molekularnih masa 43, 45 i 53 kDa. ES L1 antigeni imaju karbohidratne epitope koji nose 3,6-dideoksirabinoheksosa – tivelozu, šećer karakterističan za stadijum mišićnih larvi čitavog roda *Trichinella* (Gomez-Morales i sar., 2008). Navedeni glikoproteini imaju važnu ulogu u transformaciji mišićne ćelije, formiranju kapsule i održavanju parazitizma.

1.3. Uloga parazita *Trichinella spiralis* u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora

Paraziti iz roda *Trichinella* razlikuju se u odnosu na druge nematode po tome što se ceo životni ciklus ovog parazita odvija u jednom domaćinu, ali i zbog svoje intracelularne lokalizacije koja se odvija u dve različite vrste tkiva (enterocitnom i mišićnom). U mišićnoj, hroničnoj fazi infekcije *Trichinella* je jedini i najveći intraćeljski helmint. Prelaskom iz jednog u drugi životni stadijum parazita dolazi do promena u ekspresiji antigenskih molekula što dovodi do pokretanja imunskog odgovora karakterističnog za svaku fazu životnog ciklusa tj. stadijum-specifičnog imunskog odgovora domaćina (Boireau i sar., 1997). Domaćin aktivira različite efektorske mehanizme u cilju eliminacije parazita, ograničavanja oštećenja koje parazit indukuje i zaštite od reinfekcije (Wakelin i sar., 1994).

Infekcija sa *T. spiralis* se karakteriše indukcijom Th1 tipa imunskog odgovora (proinflamatorni tip odgovora) na početku intestinalne faze, koji utiče na nastanak odbrambenog, inflamatornog odgovora na nivou creva, da bi zatim kako infekcija napreduje, došlo do preusmeravanja odgovora ka Th2 tipu. Ovaj tip odgovora je važan za kontrolu inflamacije na intestinalnom nivou i perzistira do kraja akutne i tokom hronične faze infekcije (Mosmann, 1991; Wakelin i sar., 1994). Citokini karakteristični za Th2 odgovor nastao u infekciji sa *Trichinella* spp. su IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-21, IL-25 i IL-33 (Patel i sar., 2009). Ove citokine prvenstveno produkuju T-ćelije, uz učešće B-ćelija, eozinofila, mast ćelija i bazofila. Th2 odgovor postaje dominantan u trenutku kada počinje diseminacija novorođenih larvi i suštinski je važan za ekspulziju larvi. Parazit dostiže adultni stadijum i reprodukuje se pre nego što Th2-posredovana ekspulzija eliminiše sve ženke parazita (mužjaci se eliminišu odmah nakon kopulacije) iz gastrointestinalnog trakta. Zato imunski odgovor na intestinalnom nivou s jedne strane daje određeni nivo protekcije organizmu domaćina, ali on nije potpun jer se novorođene larve produkuju pre izbacivanja adulta, što obezbeđuje opstanak određenog broja parazita u domaćinu (Bruschi, 2002).

Tokom mišićne faze, prisustvo parazita u poprečno-prugastoj muskulaturi indukuje jak inflamatorni odgovor, koji nije u mogućnosti da eliminiše parazite, već uzrokuje

inflamatorne miopatije (miozitis) koje se karakterišu inflamacijom mišića i okolnih tkiva i odgovorne su za kliničke znake parenteralne infekcije (Bruschi i Chiumiento, 2011). Ova faza je delimično regulisana intestinalnom fazom infekcije jer je pokazano da jačina mišićne inflamacije oralno inficiranih životinja novorođenim larvama veća nego kod intravenozno inficiranih životinja (Fabre i sar., 2009a,b,c). Mišićnu fazu infekcije karakteriše kombinovani Th1/Th2 tip imunosti, uz dominaciju Th2 tipa koji se odlikuje povećanom produkcijom citokina IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i smanjenom produkcijom IFN- γ (Lee i Ko, 2006). Tokom mišićne faze takođe dolazi do aktivacije anti-inflamatornih i regulatornih mehanizama, koji se ogledaju u povećanoj zastupljenosti regulatornih T ćelija i porastu produkcije citokina IL-10 i TGF- β . Ovi mehanizmi kontrolišu i suprimiraju Th1 imunski odgovor i ograničavaju inflamaciju u mišićnom tkivu, što obezbeđuje preživljavanje parazita (Beiting i sar., 2004).

Mogućnost da *Trichinella* uspešno uspostavi parazitizam, zavisi od mogućnosti da parazit izbegne imunski odgovor domaćina, odnosno mogućnosti da parazit indukuje supresiju imunskog odgovora putem stimulacije poliklonske limfocitne aktivacije i stimulacije eozinofila. Supresija imunskog odgovora predstavlja osnov imunomodulacije izazvane *Trichinella*-infekcijom.

1.4. Uloga DĆ u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora

Dendritske ćelije (DĆ) su ćelije urođene imunosti i to su najpotentnije antigenprezentujuće ćelije koje, pored ključne uloge u pokretanju imunskog odgovora, predstavljaju i medijatore T-ćelijske tolerancije (Granucci i sar., 2008). U zavisnosti od inicijalnog stimulusa i stepena zrelosti, DĆ počinju da luče različite citokine i hemokine čime stimulišu T-ćelije da se diferenciraju u pravcu Th1, Th2, Th17 ili T regulatornih ćelija (Treg) (MacDonald i Maizels, 2008). Signali za sazrevanje DĆ međusobno se jako razlikuju i neki od njih (npr. helmintski antigeni) indukuju samo delimično sazrevanje DĆ - tzv. tolerogene DĆ (tolDĆ), dok drugi poreklom od bakterija, (npr. lipopolisaharid - LPS) mogu indukovati njihovo delimično ili čak potpuno sazrevanje (White i Artavanis-Tsakonas, 2012).

Nezrele DĆ patroliraju u potrazi za patogenima i mrtvim ćelijama (nastale kao posledica apoptoze i nekroze). One poseduju snažnu fagocitnu aktivnost zahvaljujući ekspresiji različitih receptora koji prepoznaju strukturne obrasce na antigenima (engl. pattern recognition receptors - PRRs). Preuzimanje antigena od strane DĆ, kao i uticaj različitih medijatora kao što su pro-inflamatorni citokini IL-1 β i faktor nekroze tumora- α (engl. Tumor necrosis factor- α , TNF- α) rezultiraju morfološkom i funkcionalnom transformacijom DĆ, tj.

njihovim sazrevanjem iz ćelija koje preuzimaju antigene u ćelije koje su specijalizovane da efikasno prikažu antigene (preradjene u male peptide i prezentovane od strane molekula glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, engl. Major Histocompatibility Complex, MHC I i MHCII) i stimulišu T ćelije.

Od prirode stimulusa koji je doveo do sazrevanja DĆ zavisice u kom pravcu će biti polarizovan imunski odgovor (Banchereau i sar., 2000; Mellman, 2013). Sazrevanje DĆ prati ekspresija MHC molekula, kostimulatornih molekula (CD40, CD80, CD86), adhezionih molekula iz familije β -integrina, unutarćelijskih adhezivnih molekula (engl. Intracellular Adhesion Molecule, ICAM), CD1 i više molekula koji su zajednički za limfocite i monocite. Razlikuju se od ostalih APĆ (B limfocita i makrofaga) po svojoj jedinstvenoj sposobnosti da aktiviraju naivne T limfocite. Pored naivnih T limfocita, ove ćelije aktiviraju i efektorske T i B ćelije, kao i NK ćelije (Banchereau i sar., 2000; Liu i sar., 2001; Wu i Dakic, 2004). Zrele DĆ u limfoidnim organima stupaju u bliske kontakte sa naivnim T limfocitima i ova dvosmerna interakcija između T limfocita i DĆ dovodi do proliferacije i diferencijacije T limfocita u različite subpopulacije efektorskih ćelija, bilo da je reč o CD4⁺ (pomoćnički, helper – Th) ili CD8⁺ T ćelijama (citotoksični). Interakcija kompleksa MHC II – antigen, prezentovanog na površini DĆ sa receptorima na naivnim T ćelijama predstavlja prvi signal za T ćelijsku polarizaciju, dok drugi signal predstavlja ekspresija kostimulatornih molekula. Treći signal koji upravlja polarizacijom u željenom pravcu su citokini koje luči zrela DĆ. Pod dejstvom na prim. bakterijskih i antigena poreklom od intraćelijskih parazita (protozoe) DĆ potpuno sazrevaju, prikazuju obradjene antigene u sklopu MHC II molekula i upravljaju polarizaciju CD4⁺ T limfocita u pravcu Th1 i/ili Th17. Za produkciju Th1 limfocita treći signal neophodan za ovu proinflamatornu aktivnost je citokin IL-12 (Kapsenberg, 2003), dok je za Th17 polarizaciju neophodno prisustvo IL-1, IL-6 ili IL-23 (van Beelen i saradnici, 2007). Mehanizmi koji su uključeni u pokretanje Th2 i T regulatornog tipa (Treg limfociti) imunskog odgovora manje su rasvetljeni (McDonald i Maizels, 2008). Ipak se zna da prisustvo citokina IL-4 usmerava polarizaciju ka Th2 a citokina TGF β ka Treg.

Th2 i regulatorni tip imunskog odgovora su, kao što je već rečeno, karakteristični za helmintske infekcije. Pod uticajem antigena poreklom od različitih helminta, DĆ ne sazrevaju u potpunosti, a u nekim slučajevima ostaju potpuno nezrele, pa ipak imaju sposobnost da polarizuju naivne T ćelije. Delimično sazrele, tolerogene DĆ slabo ekspimiraju MHC II, a često imaju nizak ili srednji nivo ekspresije kostimulatornih molekula. Karakterišu se i smanjenom produkcijom pro-inflamatornih citokina i povećanom produkcijom anti-

inflamatornih citokina IL-10 i TGF β (MacDonald i Maizels, 2008, Ilić i saradnici 2008, 2011, Gruden-Movsesijan i saradnici, 2011). Tolerogene DĆ nemaju samo ulogu u prepoznavanju parazitskih antigena i inicijaciji adaptivnog imunskog odgovora, već obezbeđuje održavanje Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora tokom infekcije (Allen i Maizels, 2011; Koyasu i saradnici, 2010; Saenz i saradnici, 2010). Kada u odsustvu infekcije (kao prirodnog pokretača i dobrog trenera imunskog odbrambenog odgovora) dođe do sazrevanja DĆ pod uticajem sopstvenih antigena oslobođenjih dejstvom nekog patološkog i zapaljenjskog procesa u tkivu a koji dovodi do oslobađanja molekula antigena koji su do tada bili “skriveni” u ćelijama onda ovakve, zrele DĆ prezentuju te autoantigene T ćelijama i doprinose raskidu tolerancije tako što favorizuju produkciju proinflamatornih Th17 i Th1 limfocita i doprinose pojavi teških autoimunskih bolesti (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2015).

1.5. Humoralni imunski odgovor na infekciju *Trichinella*-om

Humoralna imunost posredovana je antitelima i predstavlja vid stečenog imunskog odgovora čija je funkcija da neutrališe i eliminiše ekstracelularne mikroorganizme i toksine mikroorganizama. Humoralna iminost važnija je od celularne imunosti u odbrani protiv mikroorganizama koji poseduju kapsule bogate polisaharidima i lipidima. Razlog za to je što B-ćelije odgovaraju na mnoge tipove molekula i produkuju antitela specifična za njih, dok T-ćelije, kao medijatori celularne imunosti, prepoznaju i odgovaraju samo na proteinske antigene. Naivni B-limfociti prepoznaju antigene, ali ne luče antitela, već izazivaju proliferaciju antigen-specifičnih ćelija, koja se naziva klonska ekspanzija, i njihovu diferencijaciju u efektorske ćelije – plazma ćelije, koje aktivno luče antitela. Jedna aktivirana B-ćelija može da stvori i do 4000 plazma ćelija, a one mogu da proizvedu i do 10^{12} molekula antitela dnevno. Tokom diferencijacije, neke B-ćelije mogu da počnu da proizvode antitela različitih izotipova (ili klasa) teških lanaca, koja imaju različite efektorske funkcije i koja su specijalizovana za borbu protiv različitih tipova mikroorganizama. Taj process se naziva promena izotipa (klase) teških lanaca. Zbog ponovljenog izlaganja istom tipu antigena, dolazi do produkcije antitela sa sve višim afinitetom za taj antigen. Taj proces naziva se sazrevanje (maturacija) afiniteta i dovodi do stvaranja antitela sa većom sposobnošću za vezivanje i neutralizaciju mikroorganizama i njihovih toksina.

Infekcija *Trichinella*-om kako kod ljudi tako i kod životinja ogleda se u produkciji specifičnih antitela. Poliklonska limfocitna aktivacija povećava nivo IgG i IgM antitela kako kod eksperimentalno i prirodno inficiranih domaćina tako i u serumima ljudi (Bruschi, 2002).

Međutim, glavna karakteristika infekcije sa *Trichinella spp.* jeste povećanje nivoa ukupnih imunoglobulina IgE klase koji imaju ulogu u izbegavanju imunskog odgovora domaćina (Watanabe i sar., 2005).

Težina kliničke slike (kod ljudi) i vreme serokonverzije (pojava antitela u cirkulaciji) zavise od vrste *Trichinella* i broja ingestiranih larvi, ali i od faktora domaćina koju uključuju godine starosti i imunološki status pacijenta (Yang i sar., 2015). Kinetika antitelnog odgovora različita je i kod različitih vrsta domaćina (Tabela 1). Nakon primarne infekcije sa larvama *Trichinella*, serokonverzija se u humanim serumima dešava nakon 2-5 nedelja, a specifična antitela u serumima pacijenata često nisu detektabilna do trenutka pojave prvih simptoma. Nivo produkovanih antitela ne kolerila sa težinom kliničke slike u akutnoj fazi infekcije (Dupouy-Camet i sar., 2007; Gottstein i sar., 2009). Poznato je da se tokom akutne faze humane infekcije, javlja povišen nivo specifičnih IgE antitela u većini slučajeva. Ova antitela se retko detektuju u serumu pacijenata kako zbog kratkog vremena poluživota tako i zbog nedostataka koje testovi razvijeni i korišćeni za ovu namenu imaju (Bruschi i sar., 1990). Pored IgE, IgA i IgM antitela takođe mogu biti prisutna u ovoj fazi infekcije (Van Knapen i sar., 1982; Bruschi i Murrell, 2002). Maksimalna produkcija *Trichinella*-specifičnih IgG antitela dešava se oko trećeg meseca infekcije, a u serumima pacijenata ova antitela mogu opstati godinama (rezultati Nacionalne referentne laboratorije za trihinelozu - INEP; Fröscher i sar., 1988; Harms i sar., 1993). Detekcija *Trichinella*-specifičnih antitela u serumima različitih vrsta životinja najčešće nije moguća pre 3.-4. nedelje nakon infekcije bez obzira na dozu infekcije (Gamble i sar., 1996; Kapel i Gamble, 2000; Nockler i sar., 2005; Kapel, 2009). Praćenje eksperimentalno inficiranih svinja tokom dužeg perioda, pokazalo je da *Trichinella*-specifična antitela u organizmu domaćina opstaju godinama (Nöckler i sar., 2005). U eksperimentalnim studijama urađenim na divljim svinjama pokazano je da nivo specifičnih antitela ostaje konstantan u dužem periodu kod životinja inficiranih sa *T. spiralis*, *T. britovi* i *T. nelsoni*, dok se infekcije izazvane vrstama *T. nativa*, *T. murrelli* i *Trichinella* genotip T6 povezuju sa naglim padom nivoa specifičnih antitela i potpunim nestankom iz cirkulacije usled manje prijemčivosti divljih svinja za navedene vrste i genotipove (Kapel, 2009). Studije urađene na eksperimentalno i prirodno inficiranim konjima, ukazuju na činjenicu da je infekcija kod ovih životinja manje konzistentna, da se specifična antitela mogu detektovati već 15 dana nakon infekcije ali i da brzo nestaju iz cirkulacije (15.-30. ned), uprkos velikom broju larvi *Trichinella* koje u mišićima domaćina opstaju duži period nakon infekcije (Pozio i sar., 1999; 2002).

Tabela 1. Odnos vremena serokonverzije i doze infekcije kod svinja, konja, divlja svinja, lisica i čoveka. Uzročnik infekcije svih analiziranih vrsta domaćina bila je *T. spiralis* (Yong i sar., 2016).

Vrsta domaćina	Doza infekcije Br. larvi/životinji	Vreme serokonverzije p.i. (nedelje)
Svinje	100	5–7
	500	4–5
	1000	4–6
	2500	4
	8000	3
	20,000	3–4
	64,000	2.5–3
	Konji	1000
Konji	4000	3–7
	5000	2–4.5
	10,000	3–4
	20,000	2–3
	50,000	
	Divlje svinje	10,000
Srebrne lisice	500	4–6
	2000	2
Crvene lisice	10,000	3
Ljudi	Nepoznata	2–3

1.6. Primena seroloških metoda detekcije infekcije *Trichinella*-om kod ljudi i životinja

Dijagnoza trichineloze može biti komplikovana usled izostanka znakova bolesti u prvim danima infekcije ili pojave nespecifičnih znakova bolesti i zahteva detaljne epidemiološke i anamnestičke podatke, podatke o svim nespecifičnim biohemijskim i biološkim parametrima (povećanje ukupnih IgE antitela, hipereuzinofilija, aktivnost mišićnih enzima u krvi). U većini slučajeva, detekcija specifičnih IgG antitela u serumima predstavlja potvrdu oboljenja. Za dijagnozu trichineloze, rano otkrivanje specifičnih antitela je od ključnog značaja za pacijente, jer svako kašnjenje u započinjanju lečenja favorizuje formiranje larvi u mišićnom tkivu (Bruschi i Murrell, 2002). Direktno metode (mišićna biopsija) u detekciji infekcije kod ljudi preporučuju se samo u najtežijim slučajevima, kada serološki podaci nisu dovoljno jasni ili se ne poklapaju sa kliničkom slikom koja se kod obolelog javlja. Sa druge strane, mišićna biopsija je metoda koja nije dovoljno senzitivna u slučaju blage infekcije ili u slučaju analize uzorka u početnoj fazi infekcije (Gottstein i sar.,

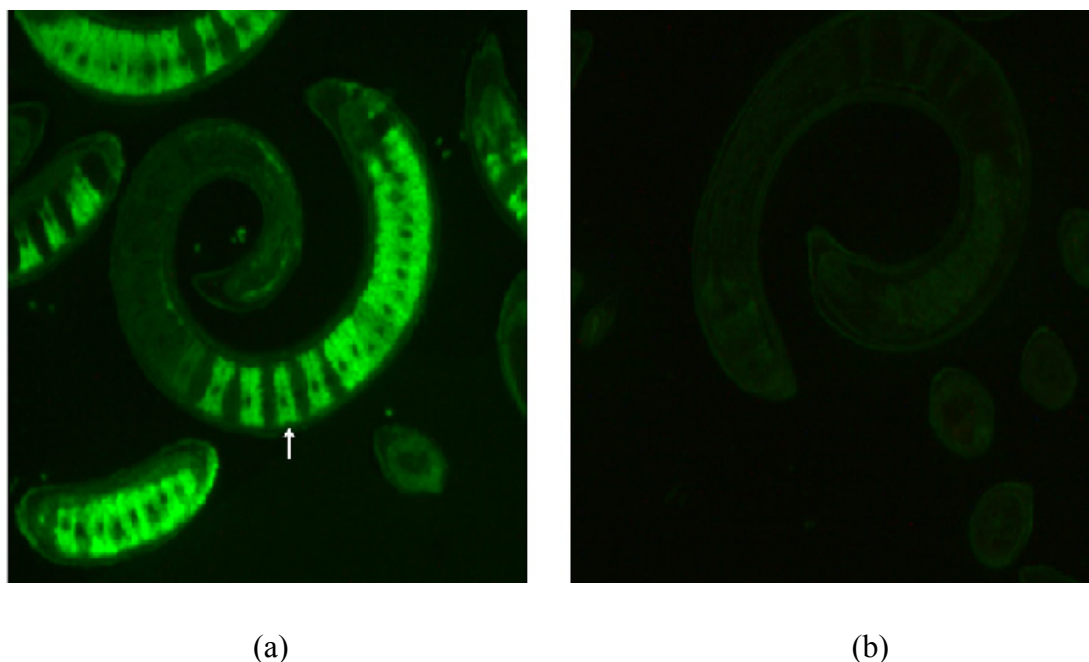
2009). Za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgG antitela u humanim serumima, najčešće se koristi ELISA test sa potvrdom pozitivnih rezultata u Western blot testu (WB) (Gomez-Morales i sar., 2008, 2012). Kod svinja i drugih životinja, *Trichinella*-infekcija se dijagnostikuje korišćenjem direktnih metoda detekcije larvi u mišićima, s obzirom da je za njih karakterističan potpuni izostanak znakova bolesti. Ipak, korišćenje ELISA testa preporučeno je za praćenje i kontrolu prisustva (rasprostranjenosti) *Trichinella*-infekcije na farmama ili u prirodi (Gamble i sar., 2004; European Community Regulation No. 2075/2005; World Organization for Animal Health, 2008). ELISA (indirektni format sa ES L1 Ag) je i jedina metoda preporučena od strane OIE za serološka ispitivanja infekcije sa *Trichinella* spp. kod svinja. Primenom kod životinja može se na vreme, dakle pre njihovog žrtvovanja, otkriti prisustvo infekcije a samim tim omogućiti njihovo bezbedno isključivanje iz lanca ishrane i lanca širenja infekcije. Iako konji razvijaju antitelni odgovor sličan drugim vrstama domaćina, uočeno je da *Trichinella*-specifična antitela u većini slučajeva iz cirkulacije nestaju već nakon 15-30 nedelje, tačnije nivo serumskih specifičnih antitela postaje nedetektabilan u različitim serološkim testovima poput WB, IFA i ELISA testa (Pozio i sar., 2002; Hill i sar., 2007). To je i jedina vrsta životinja kod koje je i nakon nestanka antitela iz cirkulacije dokazano postojanje živih, infektivnih larvi u mesu. Bezbedno uklanjanje inficiranog mesa konja iz lanca ishrane postignuto je tek u ovom veku kada je povećana količina mesa i vrsta uzorka koji treba pregledati u odnosu na uobičajeni parazitološki pregled koji se primenjuje kod svinja. Sa druge strane, slični ili isti serološki testovi kao gore pomenuti detektuju prisustvo antitela kod ljudi i svinja godinama nakon infekcije (Nockler i sar., 1995; Kapel i Gamble, 2000). Netipična kinetika antitelnog odgovora koja se kod konja javlja potvrđena je i u „EU ring trial” ispitivanju. Navedene informacije su bile od velike koristi, jer se konji najčešće žrtvuju u konzumne svrhe nakon 10 i više godina života što u velikoj meri povećava verovatnoću dobijanja lažno-negativnih rezultata u ELISA testu (Voigt et al., 1998). Zbog toga, serološke metode detekcije, među njima i ELISA, nisu preporučene za detekciju infekcije kod konja.

Detekcija antigena u serumima obolelih vrši se primenom direktnih metoda detekcije, kao što su imunoradiometrijski test ili Capture ELISA test baziran na korišćenju monoklonskih antitela usmerenih prema antigenu *Trichinella*. Pored toga što pomenuti testovi nisu komercijalno dostupni, rezultati dobijeni primenom navedenih vrsta testova u detekciji antigena nisu bili konzistentni i omogućavali su otkrivanje njegovog prisustva u manje od 50% inficiranih osoba (Ivanovska i sar., 1989; Yang i sar., 2016).

1.6.1. Serološki testovi za otkrivanje *Trichinella*-infekcije kod životinja i ljudi

Test indirektne imunofluorescencije – IFA test

Indirektna imunofluorescenca je jedna od najčešće korišćenih konvencionalnih metoda detekcije *Trichinella*-specifičnih antitela. Test kao antigen za detekciju antitela koristi kriostatske ili parafinske isečke mišićnog tkiva eksperimentalno inficiranih životinja ili celih larvi *T. spiralis* pakovanih u crevu (Lalic i sar, 1979). Za pripremu antigena koriste se eksperimentalno inficirani miševi i pacovi. Isečki se inkubiraju sa uzorcima serumima, a nakon toga se kompleksi antigen-antitelo detektuju primenom sekundarnih antitela (anti-antitela) protiv humanog IgG, obeleženih fluorescentnim bojama (npr. fluoresceinizotiocijanat – FITC, rodamin, fikoeritrin) (Slika 3). Reakcija se prati primenom fluorescentnog mikroskopa i potrebno je iskustvo u očitavanju rezultata pošto se kod infekcije sa *T. spiralis* specifična fluorescentna reakcija može videti samo na kutikuli i u stihocitima (žlezdanom tkivu oko ezofagusa) na presecima mišićnih larvi. Stepenn ukrštene-reaktivnosti antitela, poreklom od infekcije sa drugim parazitima, sa antigenima *Trichinella* u ovakvim testovima je visok, ali je infekcija sa više različitih parazita u svetu retka sem u zemljama Afričkog kontinenta. Tako, nespecifične reakcije u IFA testu mogu nastati reakcijom sa serumima koji sadrže antitela specifična prema filariae (*Onchocera* spp.), *Schistoma mansoni* i nekim biljnim parazitskim nematodama (Yong i sar., 2015). Do ukrštene reaktivnosti dolazi i u reakciji sa serumima koji sadrže autoantitela, za koje je pokazano da reaguju sa epitopima na proteinima toplotnog šoka (Yong i sar., 2015). U oba navedena slučaja potencijalne ukrštene reaktivnosti važno je pomenuti da se fluorescentna reakcija ne nalazi na gore opisanim lokacijama na isečcima parazita koji su karakteristični za specifičnu reakciju. Pored velikog stepena ukrštene reaktivnosti, ovaj test ima i druga ograničenja, a to je da ovakav test zbog uslova rada (komplikovanosti procedure za izvođenje) nije prikladan za primenu za testiranje velikog broja uzoraka, te i da je ovo metoda za čije izvođenje i interpretaciju rezultata je potrebno puno veštine i iskustva (Yong i sar., 2016).



Slika 3. Indirektni imunofluorecentni test. Primer pozitivnog nalaza u testu (a); primer negativnog nalaza u testu (b).

ELISA test

Imunoenzimski test na čvrstoj fazi (ELISA test) je najčešće korišćena serološka metoda detekcije infekcije sa *Trichinella spp.* U poređenju sa drugim serološkim metodama, ELISA test se brzo i lako izvodi, relativno je jeftin, standardizovan, metoda je semikvantitativna, takođe može biti i automatizovana u slučaju testiranja velikog broja uzoraka.

Sredinom 1970-tih, kada je počelo korišćenje ELISA testova za dijagnostiku trihineloze, kao antigen za vezivanje na čvrtoj fazi korišćen je somatski antigen dobijen od celih mišićnih larvi. Prednost korišćenja ove vrsta antigena u odnosu na sve ostale jeste jednostavan i jeftin način proizvodnje (dobija se homogenizacijom izolovanih larvi i centrifugiranjem tako dobijenog sadržaja radi izolovanja supernatanta bogatog antigenima parazita). Međutim, analitički i dijagnostički parametri ovakvih testova nisu bili na zadovoljavajućem nivou, pre svega dijagnostička specifičnost, usled velikog procenta ukrštene reaktivnosti ovog antigena sa antitelima specifičnim prema drugim parazitima (*A. suum*, *T suis*, *Schistosoma* itd.) (Ruangkunaporn i sar., 2011). Kvalitet ELISA testova značajno je unapređen primenom ekskretorno sekretornog atigena mišićnih larvi - ES L1 Ag.

Različite studije su pokazale da je specifičnost ovakvog testa u rasponu od 90-99.4% u zavisnosti od vrste domaćina koji se testira. Senzitivnost i-ELISA testova sa ES L1 Ag u detekciji specifičnih antitela iznosi 98-100% ukoliko se analizira serum uzorkovan 1.5 do 4 meseca nakon infekcije (Gomez-Morales i sar., 2008). Ukoliko se serum uzorkuje ranije, senzitivnost je znatno manja i u rasponu je od 75-94% za humane uzorke. Smanjena senzitivnost u početnim fazama infekcije posledica je kako vremena potrebnog za stvaranje antitelnog odgovora tako i nemogućnosti testova da detektuju niske koncentracije različitih klasa antitela koja se potencijalno mogu javiti u početnim fazama infekcije. Mana korišćenja ES antigena u ELISA testovima jeste komplikovan i dugotrajan način proizvodnje (in vitro kultivacija izolovanih mišićnih larvi, sa vrlo malim prinosom metaboličkog antigena), koji utiče na visoku cenu finalnog proizvoda. Uočeno je da kvalitet ELISA testova u dijagnostičkom smislu, umnogome zavisi od kvaliteta upotrebljenog ES L1 antigena, što je stvorilo potrebu za standardizacijom postupka proizvodnje ES L1 Ag (Gamble i sar., 2004) koja bi dalje direktno uticala na standardizaciju postupka proizvodnje i izvođenja ELISA testova za detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela. Dužina kultivacije mišićnih larvi ne sme trajati duže od 18 h, kako bi se izbegla kontaminacija ES L1 Ag metabolitima i raspadnim produktima poreklom iz larvi *Trichinella* koji se otpuštaju tokom njihovog starenja i postepenog uginjavanja tokom inkubacije duže od 24h pa do 7 dana (Gamble i sar., 2004). Ovi kontaminanti su upravo glavni uzrok nespecifičnih reakcija u testu.

U poslednjih 20 godina, posebna pažnja bila je usmerena na proizvodnju sintetičkih i rekombinantnih antigena. Sintetički glikan β -tyvelose (prepoznat kao specifični šećer karakterističan samo za genus *Trichinella* (Wisnewski i sar., 1993; Reason i sar., 1994) i rekombinantni protein Tsp53 (ne glikozilovana kopija jedne od reaktivnih gliko-proteinskih komponenti ES L1 Ag (Zerlenga i Gamble, 1990), razvijeni su sa ciljem da se koriste kao antigeni u ELISA testovima i ispita njihov dijagnostički potencijal. Pretpostavljena prednost korišćenja ovakvih antigena, nalazila se u mogućnosti da se oni mogu u velikoj količini proizvesti i standardizovati, čime bi se direktno uticalo na povećanje reproducibilnosti testova. Međutim, rezultati prikazani u literaturi pokazali su pozitivan uticaj njihove primene na specifičnost testova, ali sa značajnim smanjenjem senzitivnosti kako kod ljudi tako i kod svinja (Buschi i sar, 2001; Forbes i sar., 2004; Jung i sar., 2007).

Najbolje rezultate do sada dala je primena monoklonskih antitela (mAt) specifičnih prema pojedinim komponentama Ag *Trichinella* spp. (US4 i 7C2C5) u ELISA testovima, i to kako kada se koriste kao komponenta kompetitivnog ELISA testa tako i kada se koriste za

afinitivno prečišćavanje Ag za primenu u indirektnom ELISA formatu. Nijedan ovakav test nije razvijen i validiran za primenu kod više različitih vrsta domaćina (Gamble i Graham, 1984a,b; Escalante i sar., 2004).

Iako je indirektni ELISA test najčešće korišćena serološka metoda detekcije *Trichinella*-specifičnih IgG antitela, većina testova, uključujući i komercijalno dostupne testove, nije validirana na dovoljno velikom broju uzoraka. Prvi slučaj takve validacije urađen je od strane Gomez-Moralez i sar. (2008) korišćenjem velikog broja seruma *Trichinella*-inficiranih pojedinaca, zatim seruma dobrovoljnih davaoca krvi (negativni kontrolni serumi) i seruma pojedinaca inficiranih drugim vrstama parazita ili obolelih od drugih bolesti u kojima dolazi do sinteze antitela koja potencijalno mogu reagovati sa ES L1 Ag korišćenim u testu. Postupak validacije i standardizacije testova za detekciju infekcije kako ljudi tako i životinja, otežava činjenica da za parazitske bolesti ne postoje referentni materijali, tzv. "zlatni standardi" osim u slučaju anti-*Toxoplasma* IgG antitela (human TOXM, NIBSC, United Kingdom) (Rigsby i sar., 2004). Takođe, problem predstavlja i nedostatak humanih *Trichinella*-pozitivnih seruma.

Jedan od ciljeva doktorste disertacije je upravo odgovor na zajedničke potrebe humane i veterinarske medicine za postojanje adekvatno validiranog, standardizovanog, univerzalnog ELISA testa, povećane senzitivnosti i maksimalne specifičnosti u odnosu na sve postojeće testove, koji bi primenom istih komponenti i parametara testa detektovao specifična antitela u serumima ljudi i različitih životinja suspektnih na infekciju sa *Trichinella spp.* Inovativni kompetitivni ELISA test (c-ELISA) za detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela rešava problem specifičnosti primenom monoklonskih antitela specifičnih prema tri proteinske komponente ES L1 antigena, za koje je ranije dokazano da su karakteristične isključivo za genus *Trichinella* (Gamble i Graham, 1984). Korišćenjem enzimski obeleženih monoklonskih 7C2C5 antitela kao kompetitivnih i detektujućih u isto vreme rešava se i problem univerzalnosti testa sa potencijalom da se detektuju sve klase i podklase specifičnih antitela prema pomenutim imunodominantnim proteinskim komponentama bez obzira za vrstu domaćina.

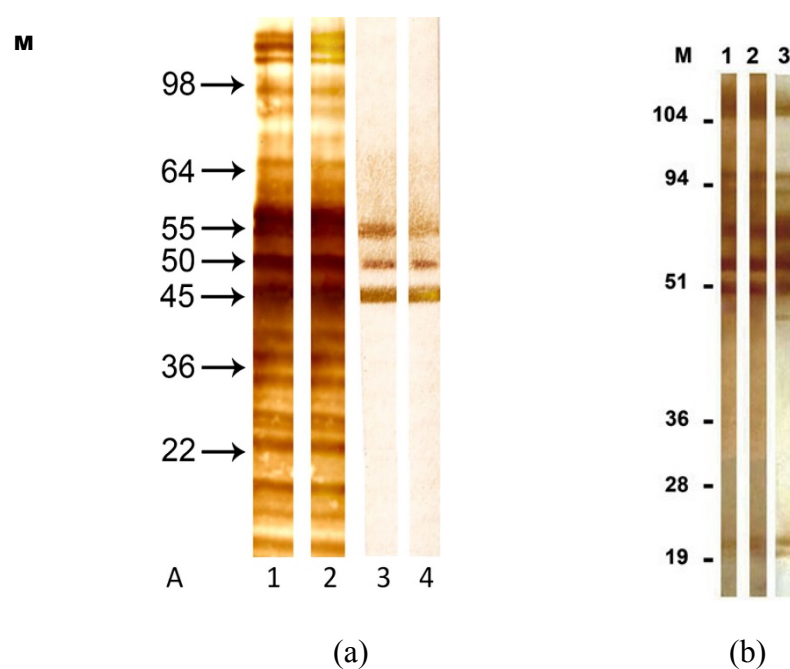
Western blot test

Primena ES L1 Ag i tiveloze, koja se trenutno smatra najboljim dostupnim antigenom (Forbes i sar., 2004; Gomez-Moralez i sar., 2008) za primenu u ELISA testovima, omogućava pouzdanu detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela, međutim, problem pojave

nespecifičnih reakcija u slučaju korišćenja ES L1 Ag i niske senzitivnosti u slučaju korišćenja tivoze ostaje. Problem niske specifičnosti posebno je izražen u slučaju detekcije infekcije divljih ali i domaćih životinja koje mogu biti zaražene većim brojem parazita u isto vreme (Nockler i Kapel, 2007). U svetlu ovih problema preporučeno je korišćenje potvrdnog testa - Western blot testa (WB) (Gomez-Morales i sar., 2008, 2012). S obzirom da je antigenski obrazac svih do sada prepoznatih vrsta i genotipova iz roda *Trichinella* veoma sličan, antigen produkovan od jedne vrste ili genotipa može se koristiti u detekciji svih ostalih vrsta (Gamble, 2004). WB test kao antigen za detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela najčešće koristi ES L1 Ag ili sirovi Ag (CWE) mišićnih larvi.

Kao osnov za interpretaciju rezultata u testu najčešće se koristi pojava tzv “tripleta” – tri proteinske trake specifične za reakciju sa *Trichinella*-specifičnim antitelima na određenim, ponovljivim molekulskim težinama. Razlike u molekulskim težinama na kojima se “triplet javlja” (na kojima se javlja specifična reakcija) dobijene u različitim laboratorijama, posledica su više faktora, od kojih je najznačajniji korišćenje različitih procedura za dobijanje Ag koji se u WB testu koristi. Da bi se izbegao problem u interpretaciji rezultata, i standardizovala metoda WB za primenu u detekciji *Trichinell*-specifičnih antitela, preporučeno je korišćenje procedure za proizvodnju ES L1 Ag objavljeno od strane dr Gamble (2004). Smatra se da na raspored traka u WB testu utiču i kvalitet matriksa korišćenog za analizu, faza infekcije u kojoj je uzorak kolektovan, ali i fine razlike u molekulskim težinama IgG klase imunoglobulina poreklom od različitih vrsta životinja.

Jedan od prihvaćenih obrazaca za interpretaciju rezultata dobijenih u WB testu jeste pojava karakterističnog tripleta, pri čemu su sve trake sličnog intenziteta, na molekulskim težinama u opsegu 53-72 kDa za ljude i 48-72 kDa za svinje (Gomez-Morales i sar., 2012) (Slika 4a). Takođe, veoma često se u interpretaciji rezultata koristi pojava tripleta na molekulskim težinama \approx 45-, 49- i 53 kDa (Gomez-Moralez i sar., 2008; Ilic i sar., 2014; Gnjatović i sar., 2017) (Slika 4b). Iako do nespecifičnih reakcija ES L1 Ag (ili CWE) sa drugim vrstama specifičnih antitela može doći, u WB testu dolazi do pojave nespecifičnih traka, raličitih od *Trichinella*-karakterističnog tripleta. Tumačenje rezultata testa isključivo vizuelnim putem nije dovoljno pouzdan način, već se odnedavno predlaže precizno merenje relativne pokretljivosti traka i korišćenje softvera koji omogućavaju izračunavanje molekulskih težina svake vidljive trake od interesa (Gomez-Morales i sar., 2012). Specifičnost i senzitivnost VB testa iznose 100%.



Slika 4. Reprezentativan primer Western blot obrasca reaktivnosti ekskretorno-sekretornog antigena *T. spiralis* sa serumima – (a) inficiranih svinja, M - markeri molekulske težine u kDa, trake 1-3 predstavljaju uzorke seruma sa potvrđenom infekcijom (Gomez-Moralez i sar., 2012); -(b) inficiranih ljudi, M - markeri molekulske težine u kDa, trake 1-4 predstavljaju serumime inficiranih ljudi različitog nivoa pozitivnosti (Gomez-Moralez i sar., 2008).

Za izvođenje WB testa potreban je visok nivo tehničke stručnosti, pored toga, test je dugotrajan i skup. Stoga se WB test u dijagnostici infekcije sa *Trichinella spp.*, koristi kao potvrdni test pozitivnih nalaza, ili u slučaju dobijanja kontradiktornih ili sumnjivih rezultata primenom većeg boja drugih seroloških testova (IFA i i-ELISA) (Gamble i sar., 2004).

Ostale metode detekcije *Trichinella*-specifičnih antitela

Bentonitna flokulacija i lateks aglutinacija se koriste u dijagnostici humane trihineloze. Međutim, ove tehnike nisu toliko osetljive i specifične kao ELISA test, te se koriste samo u slučajevima potrebe za hitnom potvrdom infekcije (rezultat se dobija za manje od 1 h) (Gamble i sar., 2004). Imuno-radiometrijski test kompetitivne inhibicije (CIA) (Ivanoska i sar., 1989), koji pokazuje visok stepen specifičnosti za detekciju anti-*Trichinella* antitela, smatra se korisnim za analizu uzoraka u kasnijim fazama infekcije (Yong i sar., 2016). Dot-ELISA test se lakše izvodi nego klasičan ELISA i/ili Western blot test, a rezultati

se mogu čitati bez specijalizovane opreme. Dot-ELISA razvijena je za potrebe detekcije *Trichinella*-specifičnih antitela u serumima ljudi i svinja (Srimanote i sar., 2011, Ilic i sar., 2004). Razvijeni su i imunohromatografski stripovi (trake) za brzo otkrivanje infekcija *Trichinella*-om kod svinja (lateral flow test). Ovaj serološki test se koristi kao alternativa ELISA testu u kliničkim laboratorijama bez specijalizovane opreme (Patrascu i sar., 2001; Zhang i sar., 2006).

2. CILJEVI RADA

1. Ispitivanje dijagnostičkog potencijala 7C2C5 monoklonskog antitela kroz razvoj dva ELISA testa:
 - univerzalnog kompetitivnog ELISA testa namenjenog detekciji svih klasa *Trichinella*-specifičnih antitela kod ljudi i različitih vrsta životinja, primenom istih komponenti i parametara testa (*Trichinella* c-ELISA testa).
 - ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima (“Capture” *Trichinella* IgE ELISA testa)
2. Izolacija i karakterizacija proteina identifikovanih pomoću monoklonskog 7C2C5 antitela – tzv. 7C2C5 Ag, sa ciljem da se definiše uloga navedenih proteina u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora na modelu humanih dendritskih ćelija *in-vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Priprema antigena parazita

3.1.1. Održavanje soja parazita *T. spiralis*

Nakon žrtvovanja inficiranih pacova, uklanjanja kože i unutrašnjih organa, preostala tkiva su od pola sata. Zatim se preko sita sa otvorima promera 180 sadržaj prelije u levak za usitnjena mlevenjem. Infektivne mišićne larve (L1 stadijuma) dobijene su metodom enzimske digestije mesa u skladu sa direktivom Evropske unije broj 2075/2005. Ukratko, digestija se vrši na magnetnoj mešalici u veštačkoj digestivnoj tečnosti (pepsin i HCl) na temperaturi od 56°C, u trajanju sedimentaciju. U njemu digestivna tečnost ostaje 30 minuta, kada se ispušta 40 ml u tubu za centrifugiranje. Posle 10 minuta primenom vakuma pokupi se gornjih μm 30 ml, a preostalih 10 ml prelije u petri šolju. Tuba se ispere sa još 10 ml toplog PBSa, ispirak ulije u prethodno sipanih 10 ml u petri šolju, radi brojanja larvi *T. spiralis* na stereomikroskopu. Larve se potom ispiraju toplim PBS-om i koriste za infekciju životinja kao i za pripremu ekskretorno-sekretornog (ES) antigena L1 larvi ovog parazita.

3.1.2. Izolovanje infektivnih mišićnih larvi (L1) *T. spiralis*

Nakon žrtvovanja inficiranih pacova, uklanjanja kože i unutrašnjih organa, preostala tkiva su usitnjena mlevenjem. Infektivne mišićne larve (L1 stadijuma) dobijene su metodom enzimske digestije mesa (1% rastvor pepsin-HCl, pH 1.6-1.8 u toku 4 h na 37°C, uz konstantno mešanje) u skladu sa direktivom Evropske unije broj 2075/2005. Nakon završene digestije, oslobođene mišićne larve su ostavljene da se istalože na dno suda, a potom su propuštene kroz mikrobiološko sito u cilju oslobađanja od detritusa. Larve su potom ispirane toplim fiziološkim rastvorom, resuspendovane u fiziološkom rastvoru i korišćene za infekciju ili za pripremu ekskretorno-sekretornih (ES) produkata parazita.

3.1.3. Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ES L1) *T. spiralis*

Ekskretorno-sekretorni produkti L1 larvi (ES L1) *T. spiralis* dobijeni su kultivacijom izolovanih larvi u kompletnom medijumu-DMEM sa 10 mM Hepesa, 2 mM L-glutamina, 1 mM Na-piruvata i 50 U/ml gentamicina (Galenika, Beograd, Srbija), tokom 18-20 h na +37°C, uz prisustvo 10% CO₂. Nakon kultivacije larve su izdvojene spontanim taloženjem u konusnim epruvetama, a medijum sa prisutnim ES L1 produktima parazita filtriran je preko membrane sa otvorima prečnika 0.22 μm (Millipore, USA), dijalizovan prema fiziološkom rastvoru i koncentrovan primenom Amicon sistema (Stirred cells 8400 i 8010, Amicon Corp, USA) uz korišćenje membrana za ultrafiltraciju čija je veličina pora bila 10000 NMWL

(Amicon PM 10 Ultrafiltration Discs, polyethersulfone). Koncentracija dobijenog ES L1 Ag je određena bihinskom reakcijom korišćenjem komercijalno dostupnog kita (BCA protein assay kit, Pierce, Rockford, IL), dok je kvalitet Ag ispitan u ELISA testu. Antigen se čuva na -20°C do upotrebe.

3.2. Produkcija monoklonskog 7C2C5 antitela

Monoklonsko 7C2C5 antitelo produkovano je od strane ATCCHB8678 hibridne ćelijske linije, dobijene fuzijom slezinskih B ćelija miševa inficiranih sa *T. spiralis* i mijelomskih ćelija P3-X 63-Ag8 (Patent US4670384 - Diagnostic reagent for swine trichinosis). Navedena ćelijska linija proizvedena je i okarakterisana od strane Dr Ray Gamble (USA, Agricultural Research Service, Parasite Biology and Epidemiology Laboratory, Beltsville, Maryland, USA). Ova ćelijska linija održava se u INEP-u i koristi za dobijanje 7C2C5 monoklonskog antitela. Monoklonsko antitelo 7C2C5 karakteriše se sposobnošću da prepozna imunodominantni epitop iz sastava ES L1 Ag *T. spiralis*, prisutan na proteinima molekulske težine 53 kDa, 49kDa i 45 kDa. Pomenuti epitop karakterističan je za čitav rod *Trichinella* (Gamble i Graham, 1984). Monoklonsko antitelo 7C2C5 specifično se vezuje za proteinske komponente ES Ag prisutne u stihocitima parazita što je potvrđeno primenom tehnike bojenja imunoperoxidazom.

Produkcija antitela od strane ćelija hibridoma može biti smanjena tokom vremena usled smanjenja broja ćelija sposobnih da produkuju monoklonska antitela. Takođe se dešava da usled neadekvatnog ili predugog čuvanja može doći do značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija što dovodi do otežane kultivacije živih i produktivnih ćelija. U većini slučajeva nivo produkcije antitela može se povratiti postupkom rekloniranja hibridne ćelijske linije, odnosno izolacijom i daljom propagacijom onih klonova koji imaju najveći potencijal u rastu i umnožavanju zajedno sa najvećim potencijalom za produkciju monoklonskih antitela (classic single cell recloning of the hybridoma cell line). (Re)Kloniranje ćelija vršeno je u pločama sa 96 mesta (0.5 ćelija po otvoru ploče) u zapremini od po 200 μl po otvoru hranljivog medijuma (kompletni DMEM sa dodatkom 20% fetalnog telećeg seruma - FCS) i sa korišćenjem mišijih timocita kao hranjive podloge koja sadrži faktore rasta za rast hibridoma (feeder layer). Otvori ploča su proveravani na svaka 2 do 3 dana na invetnom mikroskopu. Nakon 12-15 dana izabrano je nekoliko najboljih klonova, sadržaji otvora su prebačeni u ploče sa 24 mesta u istom medijumu u zapremini od 2 ml po otvoru (20% FCS). Nakon toga su dopunjene do 7 ml sa istim medijumom i prebačene u mali flask. Praćen je broj ćelija u medijumu, pri čemu gustina ćelija ne sme biti veća od $5 \cdot 10^5$ ć/ml. Nakon toga je udeo FCS u

medijumu za kultivaciju smanjen na 15%, suspenzija ćelija dopunjena do zapremine od 10 ml tako da finalna koncentracija FCS-a bude 15% u medijumu. Medijum u kome rastu ćelije konstantno se testira na prisustvo monoklonskih 7C2C5 antitela (primenom direktnog ELISA testa sa ES L1 Ag *T. spiralis* adsorbovanim na površini mikrotitracione ploče).

Klonovi ćelija se gaje do trenutka kada imaju eksponencijalni rast nakon čega se ćelije dele tako da se u koncentraciji od $1 \cdot 10^6$ ml prebacuju u flaskove veće zapremine i dozvoljava se da se umnožavaju do broja od $5 \cdot 10^6$ pa se na opisan način ili dalje šire radi proizvodnje mAt u samom medijumu ili radi njihovog aplikovanja u peritoneume miševa u cilju pravljenja peritonealnog ekskudata (ascita). Nakon svakog procesa rekloniranja ćelija hibridoma i proizvodnje monoklonskih antitela, višak ćelija se zamrzavaju (DMSO sa dodatkom FCS) u optimalnom broju od $5 \cdot 10^6$ do $1 \cdot 10^7$ /ml na -80 °C. Pod navedenim uslovima se čuvaju tri dana nakon čega se prebacuju u tečni azot u kome se mogu čuvati godinama i ponovo klonirati (preporuka je jednom u dve godine).

Produkcija mAt putem ascita u miševima

Miševima za proizvodnju ascita (Balb/cJ) dat je pristan u dozi 0.5 ml po mišu. Nakon 7 dana u peritoneume miševa aplicirane su ćelije hibridoma ($5 \cdot 10^6$ ćelija) visoke vijabilnosti (preko 98%). Abdomen miševa proveravan je na svaka dva do tri dana sve do trenutka dok nisu bili potpuno ispunjeni ascitnim fluidom, obično nakon 2-3 nedelje. Ascitna tečnost drenirana je korišćenjem igle prečnika 18 gage. Jedan miš produkuje 5-10 ml ascitnog fluida koncentracije 5-20 mg/ml antitela.

Provera kvaliteta ascita na prisustvo monoklonskih antitela 7C2C5 vršena je primenom direktnog ELISA testa sa ES L1 Ag *Trichinella* adsorbovanim na površini mikrotitracione ploče.

3.2.1. Izolacija monoklonskih antitela iz ascita

Nakon izolovanja ascita iz peritoneuma miša, ascit je centrifugira na SORVAL centrifugi na 6000 ob/min, na 5 °C, u trajanju od 10 min. Talog je odbačen a supernatant dalje razblažen fiziološkim rastvorom dva puta. Zatim je usledilo taloženje imunoglobulina primenom amonijum-sulfata, pri zasićenju rastvora od 50%. Dodavanje soli je rađeno postepeno uz mešanje na magnetnoj mešalici u trajanju od 2.5 h na sobnoj temperaturi, kako se ne bi stvarali precipitati i neravnomerna raspodela koncentracija u smesi. Dobijena smesa je centrifugirana 10 min., na 6000 ob/min. Talog je rastvoren u fiziološkom rastvoru do

polazne zapremine ascita ($V_{ascit} \cdot 2$ se računa kao početna zapremina). Nakon toga je ponovljen postupak taloženja sa nižom koncentracijom soli (33%), pod uslovima navedenim u prethodnom koraku taloženja. Dobijeni talog je resuspendovan do polazne zapremine ascita ($V_{ascita} = 2$ ml) u 0,005 M Tris/HCl pufera (pH 8). Rastvor je dalje dijalizovan prema 2 l 0,005M Tris/HCl (pH8), tokom noći na +4C, sa tri izmene pufera tokom trajanja procesa dijalize. Nakon dijalize, rastvor je centrifugiran na 6000 ob/min i 5°C, u trajanju od 10 min. Talog je rastvoren u 0.03 M Tris/HCl pH8 do polazne zapreminu ascita. Koncentracija izolovanih mAt određena je spektrofotometrijski primenom sledeće jednačine:

$$C_p = 30 \cdot (1,45 \cdot A_{280 \text{ nm}} - 0,74 \cdot A_{260 \text{ nm}})$$

Kontrola kvaliteta dobijenog proizvoda vršena je primenom direktnog ELISA testa sa ES antigenom adsorbovanim na čvrstoj fazi.

Monoklonska antitela 7C2C5 se mogu koristiti kao ligandi u afinitetnoj hromatografiji za izolaciju tri proteinske komponente iz ekstrakta parazita *T. spiralis* a koje smo označili zajedničkim imenom kao imunodominantni 7C2C5 antigen, pošto poseduje svojstva jake imunogenosti (opisano u Uvodu). Antitela se kovalentno vezuju za Sepharosu 4B primenom metode aktivacije matriksa sa CNBr.

3.2.2. Aktivacija Sepharose 4B sa CNBr – Priprema kolone za afinitivno izolovanje imunodominantnog 7C2C5 Ag

Sepharose 4B (15 ml, oko 200 mg) isprana je fosfatnim puferom, i dopunjena sa 10 ml destilovane vode. CNBr, kao ključna komponenta u postupku aktivacije Sepharose, veoma je toksična hemikalija, i sve mere opreza u radu moraju biti primenjene. CNBr je rastvoren u destilovanoj vodi do finalne koncentracije 20-50 mg/ml. Podešavanje pH vrednosti vodenog rastvora sefaroznih čestica na 11.0-11.5 vršeno je primenom 2 M NaOH, uz mešanje na magnetnoj mešalici slabog intenziteta. Rastvor CNBr ($V = 10$ ml) dodat je u rastvor sedimentiranih sefaroznih čestica (10 ml). pH vrednost rastvora održavana je na 11.0-11.5, dodavanjem kap po kap rastvora NaOH do postizanja stabilizacije. Aktivne čestice su isprane preko staklenog guča (poroznosti 2-3 μ l) sa ledeno hladnom destilovanom vodom (100 ml), a potom sa 100 ml boratnog pufera (pH 8). Isprane čestice prenete su u staklenu čašu sa 0.1 M NaHCO₃ sa 0.5 M NaCl, gde su ostavljene da nabubre i istalože se. Nakon toga je uklonjen supernatant. Dodato je 100 mg imunoglobulina, polazne koncentracije 5-10 mg/ml. Smeša proteina i čestica ostavljena je da se meša preko noći, na +4C. Čestice su isprane preko staklenog guča sa sinterom poroznosti 2-3 μ m, kako bi se uklonili nevezani imunoglobulini.

Nevezani antigen je dodatno ispiran sa 0.1 M NaHCO₃ sa 0.5 M NaCl, sa nekoliko polaznih zapremina. Preostale aktivne grupe reaguju sa 1 M etanol aminom, pH 8.0, 1-2 h na sobnoj temperaturi. Alternativno, mogu se preostala aktivna mesta blokirati sa 1 M glicinom, pH 8.0, 4 h, na +4°C. Čestice su ponovo isprane sa velikom zapreminom rastvora PBS-a. Aktivirane čestice se čuvaju u PBS puferu sa konzervansom 0.1 M NaN₃, na +4°C.

3.3. Izolacija imunodominantnih komponenata antigena *T. spiralis* iz ES L1 antigena primenom afinitivne hromatografije

Izolacija proteinskih komponenata koje nose imunodominantni epitop primenom 7C2C5 antitela kao liganda za izolaciju, može se vršiti iz sirovog Ag (dobijenog homogenizacijom larvi *T. spiralis*) ili ES L1 Ag ML. U ovom radu je kao početni materijal korišćen ES L1 Ag *T. spiralis*.

Sefarozni matriks (Sepharose 4B) u zapremini od 5 ml ispiran je deset puta sa 0.1 M PBS puferom, pH 7-7.2. Zatim je prebačen u čašu širokog prečnika u koju je dodat i početni uzorak –ES L1 Ag, za afinitivno prečišćavanje u koncentraciji od oko 5-10 mg/ml (razblaženje uzorka pripremljeno u PBS-u). Inkubacija je trajala čitavu noć na +4°C, uz konstantno mešanje na šejkeru. Nakon reakcije inkubacije, matriks je prebačen u hromatografsku kolonu, a ostatak tečnosti je vraćen na recirkulaciju. Kolona je ispirana sa PBS-om sve dok koncentracija proteina na izlazu iz kolone, koja se određuje spektrofotometrijski merenjem absorbance na 260 i 280 nm, nije bila jednaka nuli. Oslobođanje vezanih molekula 7C2C5 Ag sa kolone vršeno je eluiranjem kolone primenom 0.1 M glicin-HCl pufera pH 3 (oko 2 ml). Navedeni pufer je zadržan u koloni nekoliko minuta nakon čega je otpočeo postupak eluiranja sadržaja sa kolone. Sadržaj je kolektovan u zapremini od po 2.5 ml u epruvete koje već sadrže određenu količinu 2 M Tris-HCl, pH 8.5 kako bi se izvršila neutralizacija frakcija. Kolektovanje uzoraka je vršeno do trenutka dok koncentracija proteina na izlazu iz kolone nije bila jednaka nuli. Nakon završetka procesa eluiranja, kolona je isprana sa jednom zapreminom Tris-HCl pufera (pH 8.0), kako bi se i pH vrednost matrikasa vratila na pH 7, nakon čega je i dodatno isprana jednom zapreminom kolone sa 2 M NaCl, sa ciljem da soli prisutne u ovom rastvoru uklone eventualno zaostale afinitivno vezane komponente. Kolona se čuva u neutralnom puferu sa 0.02 % NaN₃ kao konzervansom.

Provera sastava i reaktivnosti izolata rađena je primenom SDS PAGE elektroforeze i bojenja srebrom, WB tehnike i HPL ekskluzione hromatografije (BioSuite Columns – high resolution exclusion chromatography).

3.4. Priprema konjugata mAt 7C2C5-HRP

Prvi korak u postupku konjugovanja mAt sa peroksidaze iz rena (horseradish peroxidase-HRP) jeste podešavanje koncentracije proteina na 10 mg/ml primenom 0.1 M karbonat-bikarbonatnog pufera pH 9.0. Reaktivne grupe na antitelima aktivirane su podešavanjem pH vrednosti rastvora proteina na 9.5, primenom 0.1 M karbonatnog pufera, dok su reaktivne grupe na molekulu enzima aktivirane reakcijom oksidacije pomoću NaJO₄. NaJO₄ je rastvoren u destilovanoj vodi (38.5 mg NaJO₄/ml destilovane vode), 50 µl ovog rastvora upotrebljeno je za 4.0 mg HRP. HRP se rastvara u destilovanoj vodi (4.0 mg HRP/ml destilovane vode), što je količina potrebna za konjugovanje 10 mg proteina. Rastvor NaJO₄ je dodat rastvoru HRP, reakcija je trajala 20 minuta na sobnoj temperaturi, uz neprekidno mešanje na rotatoru u mraku. pH vrednost obojenih frakcija podešena je na 9.5, primenom 0.2 M NaOH. I nakon dodavanja tako pripremljene (aktivirane) peroksidaze rastvoru aktiviranih antitela (proteina) neophodno je podesiti pH smeše na 9.5 i tu vrednost kontrolisati sledećih 15 minuta.

Vreme potrebno za reakciju konjugovanja (kovaletnog vezivanja) enzima i proteina iznosi 3 h, uz konstantno mešanje u mraku. Zaostala reaktivna mesta na antitelima blokirana su primenom NaBH₄. Rastvor NaBH₄ (8 mg/ml destilovane vode, 100 µl ovog rastvora dovoljno je za blokiranje 10 mg proteina), dodat je u smesu i inkubiran 1 h, na rotatoru u mraku. Razdvajanje HRP-konjugovanih od nekonjugovanih frakcija vršeno je propuštanjem kroz kolonu Sephacril S-200 u 0.01 M acetatnom puferu, pH 4.0. pH vrednosti obojenih frakcija podešene su na 9.5 primenom 0.2 M NaOH. Kontrola kvaliteta dobijenog konjugata vršena je primenom ELISA testa. Ovakav prizvod se čuva u 50% glicerolu, 1% BSA i 0.1% manitolu, na -20°C u mraku, sa rokom trajanja od godinu dana.

3.5. Razvoj i validacija kvalitativnih i semikvantitativnih ELISA testova

3.5.1. Optimizacija i standardizacija dijagnostičkih testova

Razvoj testa podrazumeva izbor, optimizaciju i standardizaciju reagenasa i protokola testa, određivanje analitičkih i dijagnostičkih parametara testa kao i kontinuirani monitoring karakteristika testa. Početak razvoja svakog testa podrazumeva definisanje internog

referentnog materijala za razvoj testa, odnosno izbor 4-5 pozitivnih seruma u rasponu koncentracija analita od visokih do niskih vrednosti kao i nekoliko seruma dobrovoljnih davaoca krvi (ili zdravih i prethodno dehelmintizovanih životinja) koji će se koristiti kao negativne kontrole u testu. Preporučuje se korišćenje seruma koji potiču od individualnih životinja ili pojedinaca, ali je i primena pula seruma takođe dozvoljena. Interni referentni material bi trebalo da bude kalibrisan u odnosu na standarde odobrene od strane OIE, WHO ili neke od nacionalnih organizacija, ukoliko takvi standardi postoje (OIE Validation Guideline 3.6.6). Za veliki broj parazita, standardi za serodijagnostiku ne postoje, *Trichinella* je jedan od njih. U tom slučaju se karakterizacija seruma vrši primenom neke od standardnih metoda detekcije, a poželjno je i da se svi dobijeni rezultati potvrde putem interlaboratorijske kontrole.

Optimalne količine i koncentracije svih reagenasa određuju se multifaktorijalnom titracijom, titracijom svakog pojedinačnog reagensa u odnosu na sve druge reagense, odnosno komponente testa. Dodatni eksperimenti su potrebni za definisanje optimalnih uslova za izvođenje testa (temperature i dužine trajanja inkubacije, uslova mešanja, pH i molariteta pufera korišćenih u sistemu, itd.).

Ispitivanje robusnosti testa – Robusnost se odnosi na sposobnost testa da absorbuje varijacije u postupku i uslovima izvođenja testa do kojih može doći usled manipulativnih grešaka ili nepostojanja adekvatnih uslova, na način da se promene ne odraze na rezultate testa. Procena robusnosti testa vrši se tokom faze razvoja i optimizacije, a pre validacije testa. Ukoliko male razlike u načinu izvođenja testa drastično menjaju rezultate testa, takvi testovi se smatraju nisko robusnim i kao takvi ne mogu imati širu primenu. Za procenu robusnosti testova najčešće se ispituje uticaj temperature, uslova mešanja i dužine trajanja inkubacija na rezultate testa. Vrednosti koeficijenta varijacije (CV) za OD dobijene u testu manje od 20% smatraju se prihvatljivim. U slučaju da je vrednost CV za izmerene OD vrednosti veća od 20%, neophodno je postupak razvoja testa vratiti na početak.

3.5.2. Validacija dijagnostičkih testova

Definisanje cut-off vrednosti testa - Za dijagnostičke ili skrining testove, granična tj. cut-off vrednost testa predstavlja tačku razdvajanja na mernoj skali koja omogućava podelu rezultata testa u dve kategorije, pozitivne i negativne. Cut-off vrednost omogućava razlikovanje u testu inficiranih od neinficiranih subjekata. Definisanje cut-off vrednosti testa ključan je korak u postupku razvoja testa. Senzitivnost i specifičnost testova direktno zavise od usvojene cut-off vrednosti. Postoji više načina za izračunavanje granične vrednosti testa,

prvi, ranije primenjivani način jeste statistička obrada rezultata dobijenih u testu za sve analizirane negativne kontrolne serume, a izračunava se na sledeći način:

Cut-off=srednja vrednost negativnih rezultata u testu + 3-5 SD

Drugi način definisanja cut-off vrednosti jeste primena ROC Curve analize (Receiver-operating characteristic) (Zweig i Campbell, 1993) (ROC) i softvera koji ovakvu analizu omogućava (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Rezultat ROC analize jeste definisanje cut-off vrednosti testa izabrane u skladu sa najoptimalnijim nivoima senzitivnosti i specifičnosti koji se u testu mogu postići. Parameter koji se koristi za procenu tačnosti testa je površina ispod krive - Area under the ROC curve (AUC). Maksimalna vrednost AUC koja se u ROC analizi može postići iznosi 1, i predstavlja 100% tačnosti testa u detekciji i indentifikaciji inficiranih i neinficiranih subjekata. Maksimalna vrednost AUC (AUC=1) postiže se u slučajevima kada u testu ne postoji preklapanje između pozitivnih i negativnih uzoraka u testu. Minimalna prihvatljiva vrednost AUC iznosi 0.5, dok AUC=0 znači da test sve uzorke seruma klasifikuje pogrešno u testu.

Kvalitet testa umnogome može biti poboljšan adekvatnim izborom cut-off-a. Ukoliko je test takav da postoji veliki procenat preklapanja pozitivnih i negativnih rezultata u testu, potrebno je definisati dve cut-off vrednosti i zonu sumnjivih rezultata (tzv. sivu zonu). Ukoliko rezultat testa pripada sivoj zoni, dobijene nalaze je neophodno potvrditi dodatnim testovima. ELISA testovi koji se definišu širokom zonom sumnjivih rezultata, ne mogu se koristiti kao klasični dijagnostički testovi već samo kao skrining testovi.

Analitička senzitivnost i specifičnost testa - Analitička specifičnost testa predstavlja sposobnost testa da uspešno razlikuje analit od interesa u odnosu na druge analite, odnosno da razlikuje specifična antitela usmerena prema patogenu od interesa od potencijalno ukršteno reaktivnih antitela nastalih kao odgovor na neku drugu vrstu patogena. U slučaju ELISA testova namenjenih detekciji parazit-specifičnih antitela, analitička specifičnost se definiše korišćenjem seta seruma dobijenih od ljudi i životinja inficiranih drugim vrstama parazita ali i sa različitim drugim oboljenjima koja indukuju stvaranje antitela, za koje postoje dokazi ili sumnje da mogu dati lažno pozitivnu reakciju u testu.

Analitička senzitivnost testa, u slučaju validacije kvalitativnih i semikvantitativnih testova, predstavlja najniže razblaženje nisko pozitivnih seruma koje je moguće indentifikovati kao pozitivno u testu.

Definisanje dijagnostičkih parametara testa – Dijagnostički test se smatra validiranim ukoliko su definisana sledeća četiri parametra testa: dijagnostička senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost. Idealan dijagnostički test identifikuje subjekte sa i bez bolesti sa 100% tačnosti. Dijagnostička senzitivnost testa (DSe) kvantifikuje mogućnost testa da tačno indentifikuje sve subjekte sa bolešću, tačnije predstavlja udeo pozitivnih seruma koji su tako i indentifikovani u testu u odnosu na ukupan broj pozitivnih seruma. DSe testa izračunava se na sledeći način:

$$DSe = TP / (TP + FN),$$

gde TP predstavlja broj istinito pozitivnih uzoraka, FN predstavlja broj lažno negativnih rezultata u testu.

Dijagnostička specifičnost testa je parameter koji definiše mogućnost testa da korektno identifikuje neinficirane subjekte. Predstavlja udeo negativnih subjekata koji su korektno identifikovani u testu u odnosu na ukupan broj negativnih seruma, a računa se na sledeći način:

$$DSp = TN / (FP + TN),$$

gde TN predstavlja broj istinito negativnih uzoraka, FP predstavlja broj lažno negativnih uzoraka.

Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) i negativna prediktivna vrednost (NPV) su druga dva parametra koji služe za procenu tačnosti testa. Oba navedena parametra zavise od prevalencije bolesti (π) i dijagnostičkih parametara testa. Pozitivna prediktivna vrednost predstavlja verovatnoću sa kojom će test uzorke inficiranih subjekata identifikovati kao pozitivne, a definiše se na sledeći način:

$$PPV = DSe * \pi / (DSe * \pi + (1 - DSp) * (1 - \pi))$$

Slično, NPV je verovatnoća sa kojom će se negativni uzorci identifikovati kao negativni u testu. NPV se izračuna na sledeći način:

$$NPV = DSp * (1 - \pi) / (DSp * (1 - \pi) + (1 - DSe) * \pi)$$

PPV i NPV zavise od DSe, DS_p i π . PPV je viša kada je prevalenca bolesti visoka. Kada je prevalenca bolesti niska (bolest retka), veća specifičnost testa je potrebna da se postigne viša prediktivna vrednost.

NPV je viša kada je prevalenca bolesti niska. Sa druge strane, kada je bolest česta u populaciji (kada je vrednost π visoka), veća senzitivnost testa je potrebna da se postigne viša vrednost NPV (Rajul i sar., 2008).

Evaluacija testa - Od velike koristi je definisanje primenljivosti testa u različitim fazama infekcije, odnosno ispitivanje reaktivnosti serumskih antitela nastalih u različitim fazama infekcije sa antigenom korišćenim u testu. Ukoliko je test namenjen detekciji humane infekcije, ispituju se uzorci iz svih dostupnih faza infekcije. Ukoliko je test namenjen primeni u veterinarskoj medicini, poželjno je ispitati serume eksperimentalno inficiranih životinja koje se prate duži period, u kratkim vremenskim intervalima.

Ispitivanje reproducibilnosti testa

Analiza reproducibilnosti (ponovljivosti) testa, vrši se ispitivanjem minimum dva pozitivna i dva negativna serum u bar tri ponavljanja u intra- i inter-assay analizi. Intra-assay ispitivanje se odnosi na analizu u okviru iste serije dijagnostičkog sredstva, dok se inter-assay ispitivanje odnosi na testiranje seruma u više različitih serija dijagnostičkog testa, a poželjno je i da testovi budu izvedeni od strane različitih operatera i u različitim laboratorijama (Jacobson, 1998).

3.6. Razvoj i validacija *Trichinella* c-ELISA testa

Serumi: Nakon interlaboratorijske kontrole sa evropskom referentnom laboratorijom za parazite (European Union Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanita`, Rome, Italy), definisan je interni referentni material SrNLRT (8 uzoraka seruma u rasponu od visoko, preko srednje do nisko pozitivnih, tj. sa titrom antitela u rasponu od 1/640-1280, 1/160-1-320, 1/40-1/80 i dva negativna seruma) za kontrolu kvaliteta seroloških metoda detekcije infekcije sa *Trichinella*-om.

Serumi korišćeni za validaciju univerzalnog kompetitivnog ELISA testa

Humani serumi: U radu je analizirano ukupno 410 humanih seruma iz banke seruma Nacionalne referentne laboratorije za trihinelozu. Od ukupnog broja seruma, 80 seruma dobijeno je od pacijenata sa potvrđenom dijagnozom akutne trihineloze, izazvane infekcijom sa *T. spiralis* i 20 seruma pacijenata inficiranih sa *T. britovi*, na bazi algoritma uspostavljenog od strane Dupouy-Camet i Brusci (2007). Pored dobro definisanih kliničkih simptoma, parametara krvi koji ukazuju na infekciju, dijagnoza za ove pacijente je potvrđena i

primenom serologije, tačnije indirektno imunofluorescencije (IIF), indirektno ELISE (in-house made) i WB tehnike za sve serume graničnog titra u IIF-u i ELISA testu. Drugu grupu seruma čini 40 seruma dobijenih od ljudi izloženih izvoru infekcije, koji su potencijalno konzumirali zaraženo meso, bez detektabilnih antitela prisutnih u serumima određenih primenom IIF i i-ELISA testa. Serumi 100 dobrovoljnih davaoca krvi korišćeni su kao negativni kontrolni serumi u postupku validacije testa, dok je pul navedenih seruma korišćen kao negativan kontrolni serum primenjen u procesu razvoja c-ELISA testa.

U ispitivanje analitičke specifičnosti testa uključeni su serumi pacijenata sa drugim parazitozama (ukupno 105) kao i 65 seruma dobijenih od pacijenata sa različitim sistemskim (autoimunskim) oboljenjima (Tabela 1).

Serumi svinja: Serumi 45 prirodno inficiranih svinja i 70 seruma zdravih svinja korišćeni su u postupku validacije c-ELISA testa.

Za ispitivanje analitičke specifičnosti testa korišćeni su serumi svinja inficiranih drugim vrstama parazita, uključujući *Ascaris* (2), *Hyos* (1), *Trichiuris* (4), *Oesophagostomum* (1), i dva seruma sa mešovitom infekcijom čiji je uzročnik *Trichiuris*, *Oesophagostomum*, *Eimeria* (2). Navedeni serumi dobijeni su ljubaznošću Maria Angeles Go'mez-Morales, Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy.

U ovom radu su takođe korišćeni i serumi eksperimentalno inficiranih svinja (ukupno 9 svinja, 3 svinje po grupi). Životinje su nakon dehelmintizacije, inficirane različitim dozama ML *T. spiralis* (300 i 500 i 1000 ML). Uzorci krvi sakupljeni su u intervalima od dve nedelje, 0, 15, 21, 41 i 60 dan p.i. Broj larvi u mišićima dobijen digestijom nakon žrtvovanja životinja u 60. danu iznosio je od 1.1-11.45 lpg (br. larvi po gramu uzorka mesa) za niske doze, dok je ovaj broj za visoku dozu infekcije bio u rasponu od 198-350 lpg.

Serumi konja: Uzorci seruma 100 konja dobijenih iz klanice Damjanovac, za koje postoji parazitološka potvrda odsustva larvi *Trichinella* u mišićima, korišćeni su za definisanje dijagnostičkih parametara testa.

Kako bi ispitali mogućnosti testa u detekciji specifičnih antitela u različitim fazama infekcije kod konja, korišćeni su serumi eksperimentalno inficiranih životinja. Tri konja (rase domaća planinska), označeni kao konj I, II i III, inficirani su hranjenjem sa lopticama mesa prirodno inficiranih svinja, koje su u sebi sadržale oko 1100 mišićnih larvi *T. spiralis*. Konji su žrtvovani 32 nedelje nakon inficiranja. Kako bi infekcija bila potvrđena urađena je digestija mišića jezika i dobijen je sledeći broj larvi po gramu mesa: konj I 0,97 lpg; konj II 0,11 lpg; konj III 0,81 lpg (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2005).

Serumi divljači - Primenljivost testa analizirana je primenom limitiranog broja (n=9) seruma eksperimentalno inficiranih divljih svinja (*T. spiralis*), za koje postoji parazitološka i serološka potvrda pozitivnosti. Pomenuti serumi dobijeni su ljubaznošću dr Isabelle Vallée, (UMI, BIPAR, ENSAS, Maesons-Alfort, Fr).

3.6.1. Optimizacija i standardizacija uslova izvođenja kompetitivnog ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela - *Trichinella* c-ELISA testa

Optimizacija i standardizacija uslova izvođenja *Trichinella* c-ELISA testa urađena je prema smernicama datim od strane Office International des Epizooties (2004), koja su detaljno opisana u poglavlju 2.7.1.

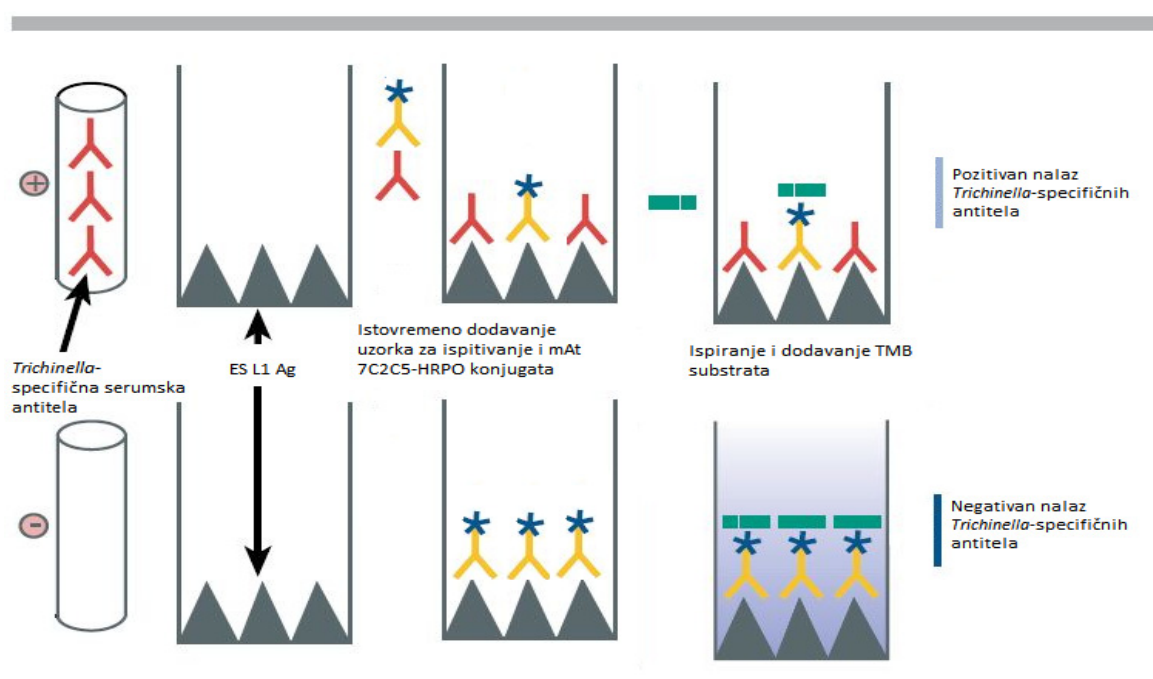
Za razvoj kompetitivnog ELISA testa za detekciju *Trichinella*-specifična antitela u serumima ljudi i svinja, primenjavana su 7C2C5 monoklonska antitela (mAt).

Priprema ploča za izvođenje c-ELISA testa izvedena je oblaganjem mikrotitracionih ploča (Immunoplate, Nunc, Roskilde, Danska) sa različitim koncentracijama ES L1 Ag (raspon koncentracija 1-5 µg/ml), razblaženog u 0.01 M karbonat/bikarbonatnom puferu (tzv. vezujući pufer), pH 9.6 (100 µl/otvoru). Ploče su inkubirane preko noći na +4°C. Posle pet ispiranja sa puferom za ispiranje (0,05% Tween 20 u 0.01 M PBS puferu [PBS-T]), sledi blokiranje ploča sa 150 µl/otvoru pufera za blokiranje (1% goveđeg serumskog albumina u 0.01 M PBS-u), 1 h na +37°C. Blokirajući pufer je uklonjen, a ploče su isprane sa puferom za ispiranje (3x). U otvore mikrotitracionih ploča dodate su jednake zapremine (po 50 µl) različitih razblaženja mAt i uzoraka seruma. Razblaženja seruma i mAt pripremana su u 0.01 M PBS puferu, a testirani raspon razblaženja mAt bio je od 1000-5000, dok je raspon razblaženja seruma bio od 1:10 do 1:100. Inkubacija je vršena na sobnoj temperature i +37°C, u trajanju od 15, 30, 60 minuta i preko noći. Takođe je testirana i inkubacija uz konstantno mešanje i bez mešanja. Nako inkubacije, sve nevezane materije su uklonjene ispiranjem (5x) sa puferom za ispiranje (PBS-T) a zatim dodat enzimski substrat TMB (INEP, SRbija). Reakcija se odvijala 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon zaustavljanja reakcije sa 2 M H₂SO₄, merene su optičke gustine (450 nm) korišćenjem ELISA čitača (Vallac Multilabel Counter 1420, Perkin Elmer, Italija). Šematski prikaz *Trichinella* c-ELISA testa dat je na Slici 5. Procenat inhibicije maksimalnog vezivanja mAt za antigen u ELISA testu, nastao kao posledica prisustva serumskih *Trichinella*-specifičnih antitela u rastvoru, izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ Inhibicije (PI)} = 100 - (\text{OD testiranog uzorka} / \text{OD monoklonalnih kontrole} \times 100),$$

- OD monokonske kontrole predstavlja OD vrednos izmerenu u slučaju potpunog odsustva seruma, odnosno inhibicije, a dobija se kada se u otvor ploče umesto uzorka seruma doda pufer za pravljenje razblaženja.

Optimalni uslovi za izvođenje kompetitivnog ELISA testa biraju se u skladu sa vrednošću OD dobijenu za monoklonsku kontrolu, odnosno slučaj maksimalnog vezivanja mAt (preporučene maksimalne vrednosti zavise od aparata korišćenog za merenje, u ovom slučaju 1.4-1.6), pri čemu se mora uzeti u obzir i postignuti opseg merenih OD vrednosti u testu, koji da bi test bio pouzdan mora biti što je moguće veći.



Slika 5. Šematski prikaz kompetitivnog *Trichinella* c-ELISA testa

3.6.2. Validacija *Trichinella* c-ELISA testa

Validacija *Trichinella* c-ELISA testa urađena je prema smernicama datim od strane Office International des Epizooties (2004), koja su detaljno opisana u poglavlju 3.7.2.

3.7. Razvoj testa za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela

Detekcija parazit specifičnih IgE antitela kao markera akutne faze infekcije, u velikoj meri je onemogućena nepostojanjem adekvatnih testova i metodologija za tu namenu. Takvi testovi komercijalno nisu dostupni. Problem u detekciji IgE specifičnih antitela, kako u

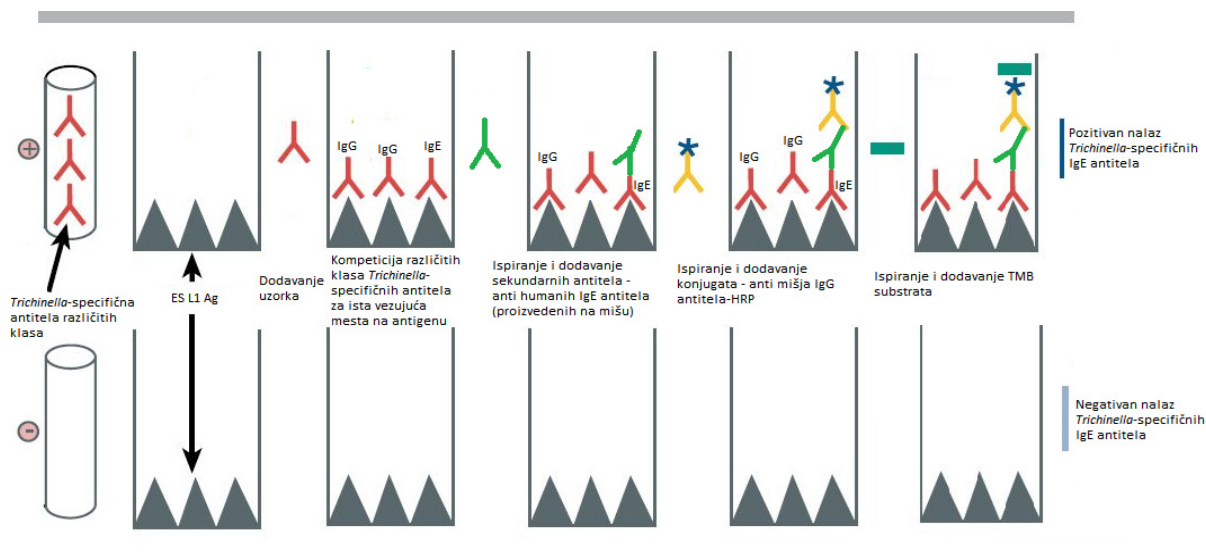
slučaju infekcije sa *Trichinella* spp. tako i u slučaju drugih parazitoza, nastaje usled interferencije uzrokovane koncentracijski zastupljenijim (dominantnijim) klasama antitela specifičnim prema istim epitopima, što predstavlja osnovni uzrok dobijanja lažno negativnih rezultata u klasičnom indirektnom ELISA formatu.

Humani serumi: U radu je analizirano ukupno 150 humanih seruma iz banke seruma Nacionalne referentne laboratorije za trihinelozu. Od ukupnog broja seruma, 40 seruma dobijeno je od pacijenata sa potvrđenom dijagnozom akutne trihineloze na bazi algoritma uspostavljenog od strane Dupouy-Camet i Brusci (2007). Pored dobro definisanih kliničkih simptoma, parametara krvi koji ukazuju na infekciju, dijagnoza za ove pacijente potvrđena je i primenom serologije, tačnije indirektno imunofluorescencije (IIF), indirektno ELISE (in-house made) i Western blota za sve serume graničnog titra u IIF-u i ELISI. Prisustvo *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u pomenutim serumima potvrđeno je primenom WB tehnike. Serumi 40 dobrovoljnih davaoca krvi korišćeni su kao negativni kontrolni serumi u postupku definisanja dijagnostičkih parametara testa. Serumi pacijenata sa drugim parazitozama (ehinokokoza (20) i toksoplazmoza (20)) kao i 30 seruma dobijenih od pacijenata sa alergijskim oboljenjima uključeni su u ispitivanje analitičkih parametara testa.

3.7.1. Pojačani indirektni ELISA test za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela

Primenjen je standardni postupak za izvođenje indirektnog ELISA testa, ukratko, i-ELISA test izveden je oblaganjem mikrotitracionih ploča (Immunoplate, Nunc, Roskilde, Danska) sa 5 µg/ml Ag razblaženog u 0.01 M karbonat/bikarbonatnom puferu, pH 9.6 (pufer za vezivanje), 100 µl/otvoru. Ploče su inkubirane preko noći na +4°C. Posle pet ispiranja sa puferom za ispiranje [PBS-T], usledilo je blokiranje ploča sa 150 µl/otvoru pufera za blokiranje (1% goveđeg serumskog albumina u 0.01 M PBS-u), 1 h na +37°C. Blokirajući pufer je uklonjen, a ploče su isprane sa puferom za ispiranje. U otvore mikrotitracionih ploča dodati su serumi pacijenata razblaženi u odnosu 1:1, 1:3, 1:5 i 1:10, u puferu za blokiranje (po 100 µl po otvoru). Inkubacija je vršena 1h, 2h i 3h, na sobnoj temperature i +37°C. Nakon inkubacije sve nevezane materije su uklonjene ispiranjem (5x) sa puferom za ispiranje (PBS-T). U otvore ploče dodata su anti humana IgE antitela (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), u koncentraciji 1-5 µg/ml. Nakon inkubacije koja je trajala 1-3h, na sobnoj temperature i na +37°C, i ispiranja (3x) urađenog po standardnoj proceduri, u otvore ploče dodat je konjugat - anti mišja IgG antitela-HRP (Inep, Srbija), u razblaženju 1:500-1:2000- u blokirajućem puferu. Inkubacija je trajala 1h, na sobnoj temperaturi (instrukcija data od strane proizvođača

antitela). Posle inkubacije, sve nevezane materije uklonjene su ispiranjem. Vizuelizacija vezanih antitela vršena je primenom hromogenog rastvora u trajanju od 10 min. (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin vodonik peroksida - TMB supstrata). Nakon zaustavljanja reakcije sa 2.0 M H₂SO₄, merene su optičke gustine (450 nm) korišćenjem ELISA čitača (Vallac Multilabel Counter 1420, Perkin Elmer, Italija). Šematski prikaz konstrukcije pojačanog indirektnog ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela dat je na Slici 6.



Slika 6. Šematski prikaz pojačanog indirektnog ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela

3.7.2. Pojačani indirektni ELISA test za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela koji koristi RF-tretirane uzorke

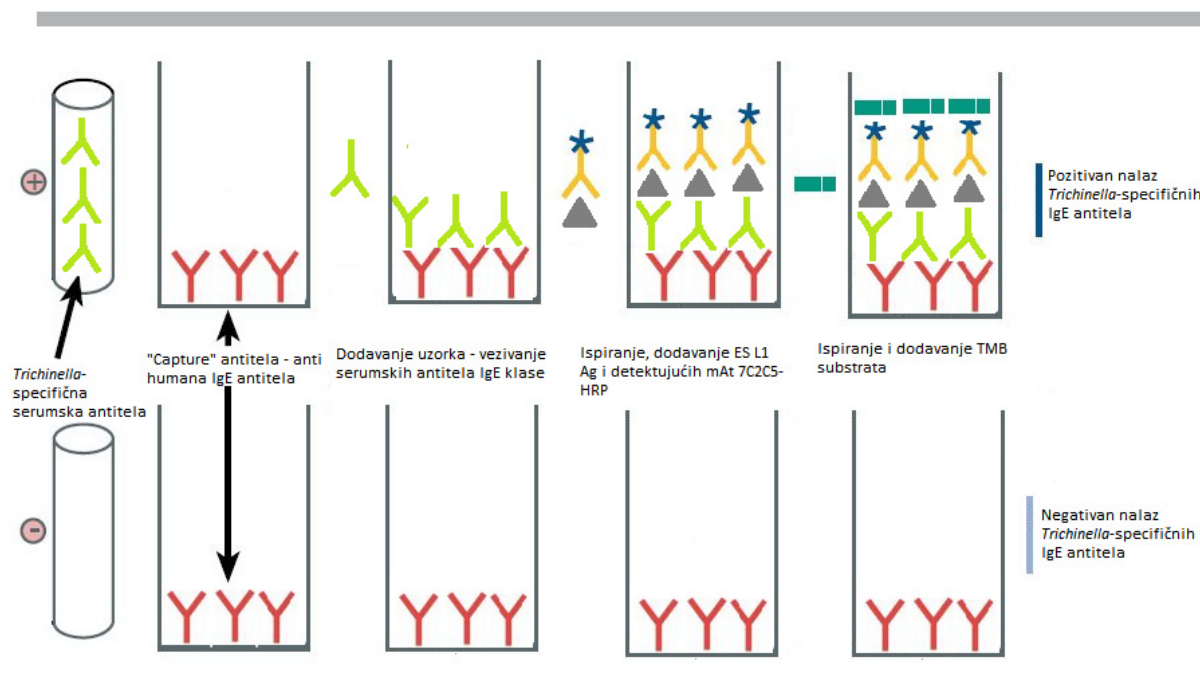
Drugi pristup podrazumeva je korišćenje seruma tretiranih IgG absorbentom (komercijalni naziv - RF absorbent, koji sadrži poliklonska anti humana IgG antitela (INEP, Srbija)), čiji je cilj bio uklanjanje interferirajućih IgG antitela iz seruma pre detekcije u indirektnom ELISA formatu, detaljno opisanom u prethodnom pasusu. Nerazblaženi serum i RF absorbent u odnosu 1:3 inkubirani su u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi. Nastali imunokompleksi su uklonjeni centrifugiranjem na 6500 g, 10 minuta. Supernatanti su izdvojeni i dalje testirani u i-ELISA testu (Slika 6).

3.7.3. Capture *Trichinella* IgE ELISA test

Mikrotitraciona ploča sa 96 otvora obložena je sa 1-5 µg/ml mišjih monoklonskih antitela specifičnih prema humanom IgE (Sigma Chemical Co., Louis, Mo), razblaženih u

0.01 M karbonat/bikarbonatnom puferu, pH 9.6 (pufer za vezivanje). Ploče su inkubirane preko noći na +4°C, a zatim isprane sa 300 µL/otvoru pufera za ispiranje [PBS-T]. Preostala vezujuća mesta blokirana su sa po 150 µl/otvoru pufera za blokiranje (1% goveđeg serumskog albumina u 0.01 M PBS-u), 1 h na +37°C. Nakon ispiranja ploče su spremne za upotrebu. Uzorci seruma razblaženi 1:1, 1:3, 1:5 i 1:10 u puferu za blokiranje dodati su u relevantne otvore i inkubirani 1-3 h, na RT i +37°C. Nakon ispiranja i uklanjanja nevezanog materijala, vršena je inkubacija sa 100 µL/otvoru ES L1 antigena u koncentraciji 1-5 µg/ml. Reakciona smesa je inkubirana 1-3 h na sobnoj temperaturi i +37°C, uz konstantno mešanje. Nakon uklanjanja viška nevezanog ES L1 antigena ispiranjem, u otvore ploče dodata su detekciona antitela - 7C2C5 mAt-HRP (razblažena 1: 00 – 1:3000, 100 µl/otvoru). Inkubacija sa konjugatom trajala je 1-2 h na sobnoj temperaturi. Nakon poslednjeg ispiranja, dodat je enzimski substrat TMB, reakcija se odvijala 10 min na sobnoj temperature. Nakon zaustavljanja reakcije sa 2.0 M H₂SO₄, merene su optičke gustine (450 nm) korišćenjem ELISA čitača (Vallac Multilabel Counter 1420, Perkin Elmer, Italija). Šematski prikaz “Capture” *Trichinella* IgE ELISA testa dat je na Slici 7.

Cut-off vrednost testa određena je primenom ROC analize (Receiver Operator Characteristics curves) (Zweig and Campbell, 1993) i MedCalc softvera (MedCalc Software, version 6.00.112 Mariakerke, Belgium).



Slika 7. Šematski prikaz “Capture” *Trichinella* IgE ELISA test

3.8. Ispitivanje uloge 7C2C5 Ag u pokretanju imunskog odgovora

3.8.1. Kultivacija humanih DC iz monocita periferne krvi

Mononuklearne ćelije periferne krvi izolovane su iz krvi dobrovoljnih davaoca. Uzeto je po 80 ml krvi od svakog davaoca, u epruvete sa citratom kao antikoagulansom. Krv je razblažena u odnosu 1:2 u 0.01 PBS-u sa 0.02% NaEDTA. Suspenzija ćelija je prenetna na Lymphoprep gradijent (Carl Roth) (8 ml ćelijske suspenzije na 2.5 ml limfoprepa) i centrifugirana 20 minuta pri brzini od 2200 rpm na sobnoj temperaturi. Pažljivo je sakupljen sloj ćelija sa površine gradijenta, ispod sloja plazme. Sakupljene ćelije su ispirane sa PBS puferom sa 0.02% NaEDTA, 10 minuta na 1400 rpm. Nakon toga su usledila još 3 ispiranja na 1400 rpm po 8 minuta, sa povećanjem udela medijuma za kultivaciju u rastvoru za ispiranje ćelija tako da se ćelije finalno isperu i od NaEDTA. Pre poslednjeg ispiranje urađeno je liziranje eritrocita u hemolizinu (6 ml hemolizina naliveno je na ćelijski talog, ostavljeno da odstoji 1 min a zatim centrifugirano). Monocitna frakcija PBMC izdvojena je metodom adherence. 10×10^6 ćelija je postavljeno po otvoru ploče sa 6 mesta, u po 3 ml medijuma. Nakon inkubacije ćelija u RPMI 1640 sa 5% FCS, u trajanju od 1.5 h, neadherentna frakcija ćelija je isprana sa toplim RPMI 1640 4-5 puta, čime su odstranjeni limfociti a na površini ostali samo adherirani monociti. Očekuje se da će od prvobitno zasejanog broja ćelija, 10-20% biti adherentne.

Adherirani monociti kultivisani su u RPMI 1640 sa dodatkom 10% FCS i po 100 ng/ml rekombinantnog humanog GM-CSF i 20 ng/ml IL-4 da bi se diferencirali u dendritske ćelije (oba R&D). Kultivacija je trajala 5-6 dana u zapremini od po 2 ml medijuma/bazenu. Trećeg dana inkubacije dodato je 500 μ l medijuma za kultivaciju sa faktorima rasta. Nakon ukupno 5 dana kultivacije, medijum je osvežen i to skidanjem 25% medijuma i dodavanjem adekvatne količine svežeg medijuma sa faktorima rasta. Istovremeno je vršena stimulacija ćelija u trajanju od 48 h. Stimulacija je vršena sa ES L1 antigenom *T. spiralis* (50 μ g/ml), 7C2C5 Ag (10 μ g/ml) i LPS-om (lipopolisaharid dobijen iz gram negativnih bakterija, koji dovodi do sazrevanja DC, 200 ng/ml) dok negativnu kontrolu predstavljaju nestimulisane ćelije.

3.8.2. Određivanje fenotipskih i funkcionalnih karakteristika humanih DC

Nakon stimulacije humanih DC, ćelije su sakupljene, izdvojeni su supernatanti u kojima su primenom ELISA testova određene koncentracije citokina IL-12p70, IL-10 i TGF- β .

Ekspresija površinskih markera (MHC II, CD54 i CD86) na DĆ nakon stimulacije LPS-om ili antigenima *T. spiralis* (ES L1 Ag i 7C2C5Ag) vršena je primenom protočne citometrije tj. FACS analizom. 1×10^5 ćelija je isprano u puferu za FACS (PBS sa 1% BSA i 0,05 % NaN₃) centrifugiranjem na 1500 rpm, 10 minuta na +6°C. Za blokiranje Fc γ receptora korišćen je Fc blokator (BD Biosciences, Stockholm, Sweden), protiv humanog Fc γ receptora, u trajanju od 30 minuta na +4°C. Nakon ovog koraka, sledilo je još jedno ispiranje u puferu za FACS. Ćelije su potom inkubirane sa antitelima protiv površinskih markera. Korišćena su sledeća antitela: anti-MHC II-PE, anti-CD40-APC, anti-CD83-FITC, anti-CD86-PECy5. Korišćeno je i 5 kontrolnih grupa: Ig-FITC, Ig-PE, Ig-PECy5, CD83-FITC + Ig-PECy5, MHC II-PE + Ig-PECy5. Antitela su razblažena 1:100 finalno tj. 1:50 u FACS puferu u koji je dodato 10% normalnog humanog seruma u cilju blokiranja Fc- γ receptora. Po 50 μ l razblaženja antitela dodato je u epruvete u kojima su DĆ prethodno isprane FACS puferom (centrifugirane 8 min na 1500 rpm) i koje se, nakon odlivanja FACS pufera, nalaze u zapremini od približno 50 μ l. Inkubacija je trajala 45 minuta na +4°C. Nakon toga slede još dva ispiranja u FACS puferu i na kraju fiksiranje u Fix/FACS puferu (FACS pufer sa 1% formaldehida) i to 500 μ l pufera na svaki ćelijski pelet. Nakon fiksiranja ćelije se čuvaju na +4°C do FACS analize. Analiza fenotipa DĆ vršena je na aparatu EPICS XL-MCL (Coulter, Krefeld, Germany), korišćenjem odgovarajućeg softvera - SYSTEM II Software (Coulter) i rezultati su analizirani korišćenjem FlowJo software.

Određivanje koncentracije citokina primenom ELISA testa

Citokinski profil DĆ određen je u supernatantima ovih kultura ELISA metodom, koristeći komercijalne kit testove, prema uputstvima datim od strane proizvođača. Za određivanje koncentracije IL-12p70 korišćen je komercijalni test proizvođača Invitrogen, USA, za određivanje koncentracije IL-10 korišćen je test BD Biosciences, USA, a za određivanje koncentracije TGF- β korišćen je ELISA komplet R&D Systems, USA.

3.8.3. Statistička obrada podataka

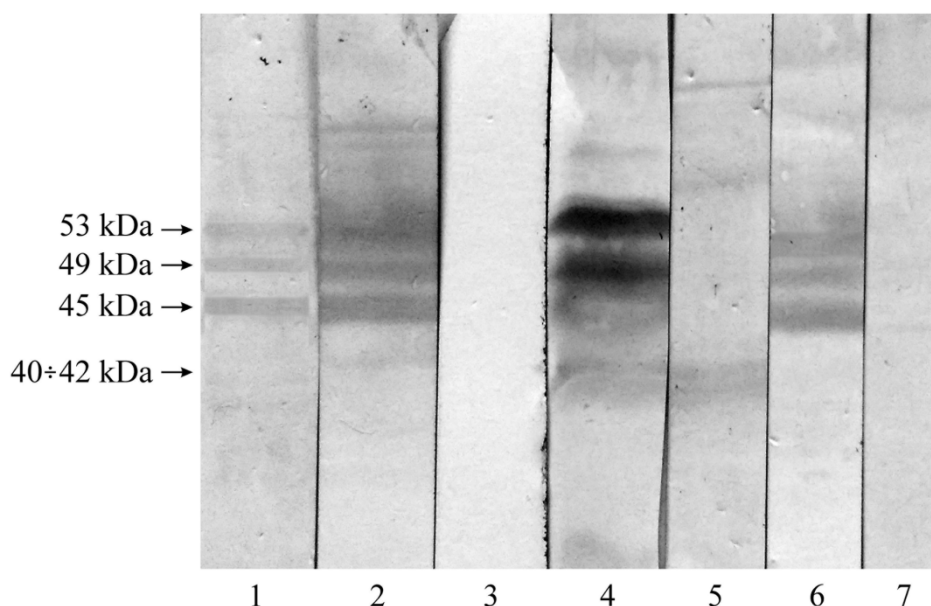
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD) triplikata kultura dva ili tri nezavisno izvedena eksperimenta. Za analizu statističke značajnosti razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura, korišćena je analiza varijanse (ANOVA), praćena Bonferroni testom za višestruka poređenja (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Razvoj i validacija *Trichinella* c-ELISA testa

4.1.1. Karakterizacija imunoreaktivnosti 7C2C5 monoklonskog antitela

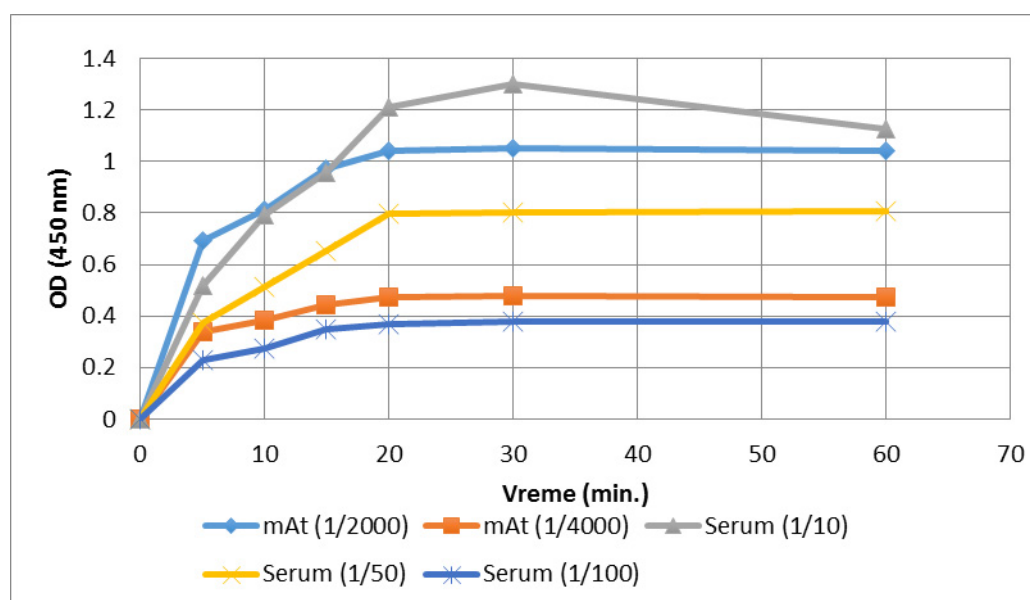
Da bi neko monoklonsko antitelo bilo primenjeno u kompetitivnom formatu imunodijagnostičkog testa, antitelo mora biti specifično prema epitopu koji je od strane serumskih antitela prepoznat tokom čitavog toka infekcije, odnosno specifično prema imunodominatnom epitopu. Takođe, epitop prepoznat od strane mAt mora biti karakterističan za genus koji se ispituje i bez potencijala da izazove ukrštenu reaktivnost prema antitelima nastalim kao odgovor na infekciju izazvanu drugim vrstama patogena. Imunoreaktivnosti 7C2C5 antitela prema ES L1 Ag *T. spiralis* pokazana je ranije primenom Western Blot tehnike (Gamble i Grahama, 1984; Ilic i sar., 2014), a dobijeni rezultati pokazuju da se ova antitela vezuju za tri proteinske komponente iz sastava ES L1 Ag, tzv. triplet 45, 49 i 53 kDa (Slika 5, linija 1). Kako bi se utvrdilo da li se serumska *Trichinella*-specifična antitela i monoklonska 7C2C5 antitela vezuju za isti epitop na pomenutim proteinskim komponentama, urađen je test inhibicije. Inkubacija nitrocelulozних membrana sa mAt 7C2C5 u velikoj meri blokira vezivanje anti-*T. spiralis* ili anti-*T. britovi* antitela iz ispitivanih seruma. Rezultat testa inhibicije predstavlja odsustvo karakterističnog tripleta u VB testu (Slika 8, traka 3, 5, 7).



Slika 8. Reaktivnost mAt7C2C5 sa ES L1 antigenom *T. spiralis* i njihova sposobnosti da inhibiraju vezivanje anti-*Trichinella* antitela prisutnih u serumima različitih vrsta. Western blot analiza: ES L1 antigen je, nakon SDS elektroforeze pod redukujućim uslovima, prebačen

na nitrocelulozne trake i inkubiran sa: mAt 7C2C5 (traka 1); serumom pacijenta inficiranog sa *T. spiralis* (traka 2); serumom pacijenta inficiranog sa *T. britovi* (traka 4); serumom svinje inficirane sa *T. spiralis* (traka 6). Test inhibicije: pre-inkubacija nitroceluloznih traka (sa ES L1 Ag) sa 7C2C5 mAt rezultirala je inhibicijom vezivanja antitela iz seruma dobijenih od ljudi inficiranih sa *T. spiralis* (traka 3), *T. britovi* (traka 5) i seruma svinje inficirane sa *T. spiralis* (Traka 7).

Takođe, kinetika vezivanja monoklonskog antitela namenjenog primeni u kompetitivnim formatima imunodijagnostičkih testova, mora biti slična kinetici vezivanja serumskih antitela za isti antigen kako bi se sprečilo blokiranje vezujućih mesta od strane onih antitela čija je brzina reakcije sa epitopom veća, i na taj način onemogućio proces kompeticije. Uporedno ispitivanje kinetike vezivanja 7C2C5 mAt i serumskih *Trichinella* specifičnih antitela za jedan visokopozitivan serum (Titar u IIF 1280) prikazana je na Slici 9.



Slika 9. Kinetika vezivanja serumskih *Trichinella*-specifičnih antitela i mAt 7C2C5-HRP antitela u indirektnom ELISA formatu. Uticaj različitih koncentracija antitela na kinetiku u i-ELISA formatu. Inkubacija seruma i mAt u i-ELISA testu vršena je uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi.

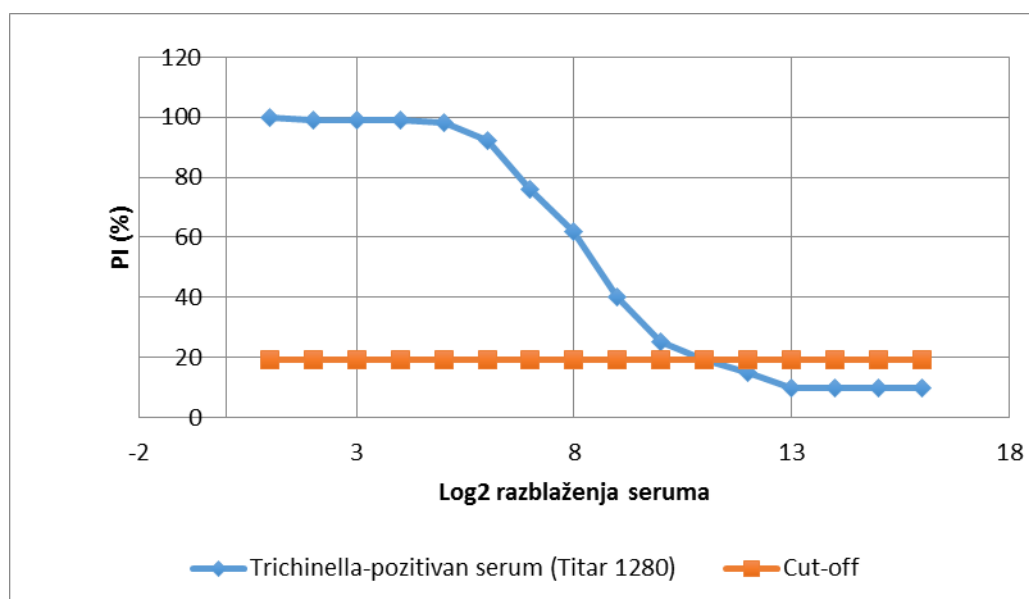
Rezultati dobijeni analizom brzine reakcije vezivanja serumskih antitela za ES L1 Ag adsorbovanim na čvrstoj fazi mikrotitracionih ploča, pokazuju da se maksimum vezivanja postiže nakon 30 do 60 minuta, u zavisnosti od koncentracije specifičnih antitela u ispitivanim serumima. Maksimum vezivanja nakon 60 minuta javlja se u slučaju testiranja seruma sa najnižim koncentracijama *Trichinella*-specifičnih antitela. Maksimum vezivanja

7C2C5 mAt-HRP konjugata postiže se nakon samo 20 minuta inkubacije bez obzira na razblaženje konjugata primenjeno u testu (Slika 9). S obzirom na činjenicu da se više od 93% maksimalnog vezivanja serumskih antitela postiže nakon 20 minuta za serume koji sadrže nizak nivo specifičnih antitela i više od 96% za serume koji sadrže visok titar antitela, može se zaključiti da je kinetika vezivanja monoklonskih i serumskih antitela veoma slična i da se takva mAt mogu koristiti u testovima (imuno) kompeticije. U slučaju kada je brzina reakcije vezivanja mAt za ES L1 Ag veća od brzine reakcije vezivanja serumskih antitela, takva mAt se mogu primeniti za razvoj epitop-blokirajućeg formata ELISA testa. Prednost kompetitivnog u odnosu na epitop-blokirajući format ELISA testa jeste kraće vreme izvođenja testa, dok su mogućnosti ovih testova u pogledu senzitivnosti i specifičnosti veoma slične.

4.1.2. Optimizacija i sandardizacija uslova izvođenja testa

Multifaktorijskom titracijom svih komponenti testa utvrđeno je da je optimalna koncentracija ES L1 antigena 5 µg/mL. Jednake zapremine uzoraka seruma (razblaženog 1:50) i mAt-HRP konjugata (razblaženog 1:3000) (50 µl svake od navedenih komponenti po otvoru ploče), uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi izabrani su kao optimalni uslovi za izvođenje kompetitivnog ELISA testa. Ukupno vreme potrebno za izvođenje testa iznosi 45 min.

Ispitivanje dozne zavisnosti predstavlja prvi stepen kontrole kvaliteta optimizacije uslova izvođenja testa. Da bi se potvrdilo da je inhibicija vezivanja mAt 7C2C5-HRP posledica isključivo prisustva *Trichinella*-specifičnih serumskih antitela, a ne cirkulišućih parazitskih antigena ili nekih drugih vrsta nespecifičnih interakcija, urađeno je ispitivanje dvostukih serijskih razblaženja jednog visoko pozitivnog humanog seruma (IFA 1/1280) u *Trichinella* c-ELISA testu. Vrednosti PI su opadale sa smanjenjem koncentracije anti-*Trichinella* antitela u ispitivanim uzorcima. Dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da je proces inhibicije u c-ELISA testu dozno-zavisan, odnosno da je uslovljena isključivo koncentracijom relevantnog analita u uzorku seruma (Slika 10).



Slika 10. Uticaj koncentracije serumskih *Trichinella*-specifičnih antitela na procenat inhibicije (PI) dobijen u *Trichinella* c-ELISA testu. Analiza je rađena uz kontinuirano mešanje na sobnoj temperaturi. Da bi potvrdili da je inhibicija vezivanja mAt 7C2C5-HRP za imobilisani ES L1 antigen specifična i rezultat isključivo prisustva anti-*Trichinella* antitela u uzorku seruma, korišćena su dvostruka serijska razblaženja visoko pozitivnog humanog seruma (IFA titar ispitivanog humanog seruma bio je 1:1280). Vrednosti PI opadaju sa smanjenjem količine anti-*Trichinella* antitela.

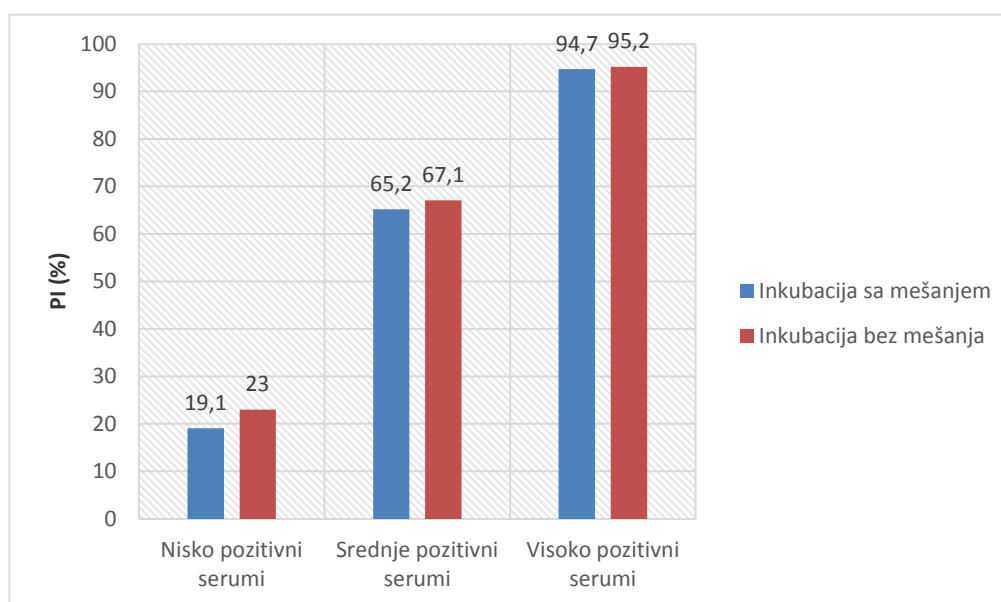
4.1.3. Ispitivanje robusnosti testa – Uticaj vremena inkubacije i uslova mešanja na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa

Vreme inkubacije od 30 minuta uz kontinualno mešanje na sobnoj temperaturi izabrano je kao optimalano za izvođenje kompetitivne reakcije u *Trichinella* c-ELISA testu. Međutim, ni skraćenje procesa inkubacije (sa 30 na 20 min) kao ni produžetak inkubacionog perioda sa 30 na čak 60 minuta nije imalo značajan uticaj na rezultate testa (CV=3.7%) (Tabela 2). Inkubacija tokom noći imala je negativan uticaj na rezultate testa, najverovatnije usled sternih smetnji prouzrokovanih upotrebom IgM klase mAt kao komponente testa. Ovaj fenomen posebno je bio izražen kod nisko pozitivnih seruma (CV=13%), dok je kod visoko pozitivnih seruma ovaj uticaj bio zanemarljiv (CV=1.9%).

Table 2. Uticaj vremena inkubacije (20, 30, 60 minuta i preko noći) na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa na primeru humanih seruma različitog nivoa pozitivnosti (visok, srednji ili nizak) i primeru negativnog seruma.

Uzorci seruma	PI (%)				CV(%)
	20 min.	30 min.	60 min.	Overnight	
1 (Visoko pozitivan serum)	96	97.2	96.5	96	1.9
2 (Srednje pozitivan serum)	53.5	55	55.2	55.4	1.5
3 (Nisko pozitivan serum)	31.9	34	34.5	32.7	3.7
4 (Negativan serum)	12	12.7	14	16.1	13

Ispitivan je i uticaj mešanja na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa. Pozitivan uticaj mešanja na rezultate testa bio je najočigledniji u slučaju testiranja granično pozitivnih seruma, dok je uticaj mešanja na rezultate dobijene za visoko pozitivne serume bio zanemarljiv. Primenom umerenog mešanja, kada se drugi optimalni uslovi inkubacije ne menjaju (RT, 30 min.), PI vrednost dobijena za jedan granično pozitivan serum može biti povećana sa 19.1 na 23.0% (CV= 13%). Uticaj mešanja na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa za tri seruma različite pozitivnosti prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Ispitivanje uticaja mešanja na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa. Analizirana su tri seruma različitog nivoa pozitivnosti. Inkubacija je vršena na sobnoj temperature, u trajanju od 30 min.

Mešanje je imalo pozitivan uticaj i na ponovljivost rezultata u *Trichinella* c-ELISA testu. Koeficijenti varijacije dobijeni za sve ispitivane serume bili su niži u slučaju primene mešanja tokom procesa inkubacije, u odnosu na slučaj inkubacije bez mešanja. Ipak, koeficijenti varijacije za oba navedena slučaja bili su ispod dopuštenih vrednosti CV za ELISA testove (Jacobson, 1998), te se može zaključiti da uslovi mešanja tokom procesa inkubacije ne utiču drastično na kvalitet *Trichinella* c-ELISA testa (Tabela 3).

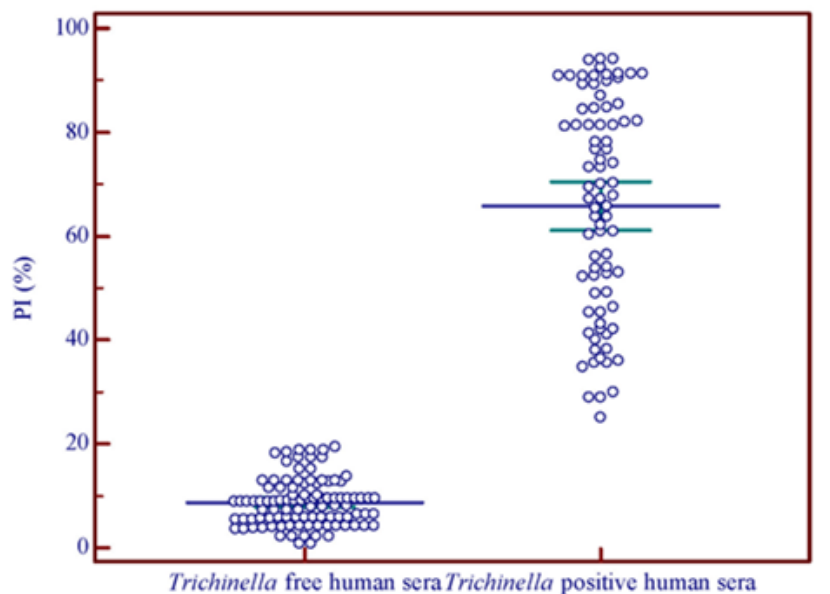
Tabela 3. Ispitivanje uticaja mešanja tokom procesa inkubacije na ponovljivost *Trichinella* c-ELISA testu u intra-assay ispitivanju.

	CV(%)	CV (%)
	Inkubacija sa mešanjem	Inkubacija bez mešanja
Visoko pozitivan serum	1.3	1.9
Nisko pozitivan serum	1.75	2.44
Negativan serum	1.38	1.4

4.1.4. Validacija *Trichinella* c-ELISA testa

Definisanje cut-off vrednosti testa

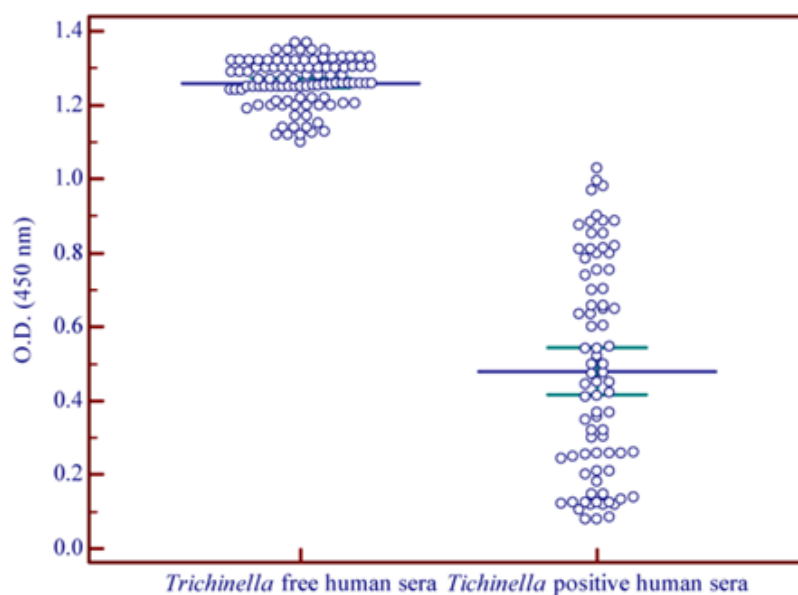
Nakon optimizacije i standardizacije uslova izvođenja testa, pristupilo se određivanju analitičkih i dijagnostičkih parametara testa. Definisanje cut-off vrednosti testa urađeno je testiranjem dobro okarakterisanih *Trichinella*-pozitivnih i *Trichinella*-negativnih seruma u c-ELISA testu i obradom dobijenih rezultata primenom ROC CURVE analize (MedCalc softwer). Sa ciljem da se napravi univerzalni kompetitivni ELISA test u radu je analizirano više vrsta domaćina, ipak, bilo je neophodno odrediti granične vrednosti u testu za svaku pojedinačnu vrstu. Za primenu testa u detekciji humane infekcije, granična vrednost testa dobijena je analizom 180 seruma (80 pacijenata sa potvrđenom dijagnozom trihineloze i 100 negativnih kontrolnih seruma – seruma dobrovoljnih davaoca krvi). Distribucija OD i PI vrednosti dobijenih u kompetitivnom ELISA testu, prikazana je na Slici 12.



	N	Mean	95% CI	SD	Min	Max
<i>Trichinella</i> free human sera	100	8.73	7.82 - 9.64	4.56	0.72	19.40
<i>Trichinella</i> positive human sera	80	65.80	61.23 - 70.37	20.52	25.00	96.20

N-number of samples, CI-confidence interval, SD-standard deviation

(a)



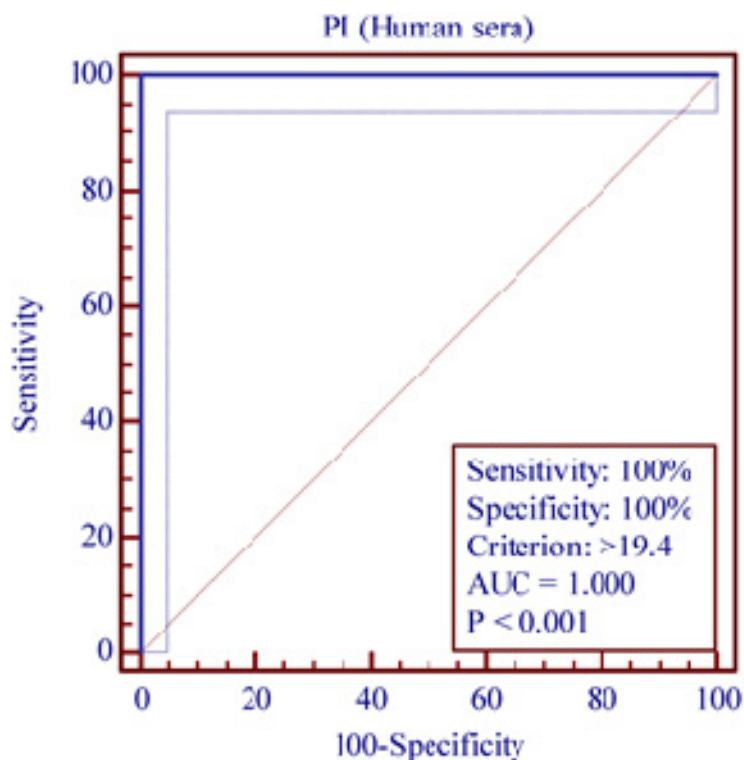
	N	Mean	95% CI	SD	Min	Max
<i>Trichinella</i> free human sera	100	1.26	1.25 - 1.27	0.06	1.10	1.37
<i>Trichinella</i> positive human sera	80	0.48	0.42 - 0.54	0.28	0.08	1.03

N-number of samples, CI-confidence interval, SD-standard deviation

(b)

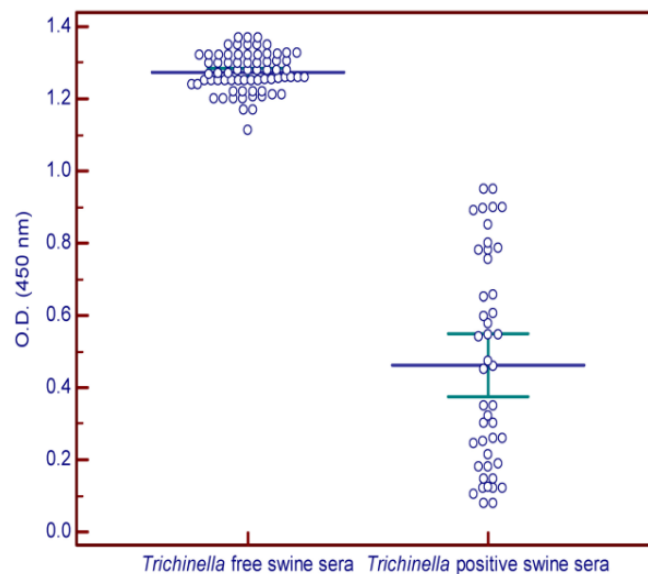
Slika 12. Grafik distribucije OD vrednosti (a) i procenata inhibicije (PI) (b) za 100 seruma dobrovoljnih davaoca krvi (negativni kontrolni serumi) i 80 *Trichinella*-pozitivnih humanih seruma dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu sa prikazom ključnih statističkih parametara (srednja vrednost, 95% CI, SD, minimum, maksimum).

Iz rezultata prikazanih na Slici 12, može se zaključiti da je *Trichinella* c-ELISA test diskriminativan test, koji pravi jasnu razliku između pozitivnih i negativnih uzoraka, odnosno nalaza u testu. Na osnovu ROC analize, definisana je optimalna cut-off vrednost – 19.4% PI (što odgovara 1.03 za OD), dok su relativna senzitivnost i specifičnost testa iznosile 100%. Površina ispod krive (Area under the ROC curve, AUC) bila je jednaka jedinici, na osnovu čega se može zaključiti da se primenom ovako definisane granične vrednosti postiže 100% tačnosti testa u detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela u humanim serumima (Slika 13).



Slika 13. ROC analiza urađena za 100 seruma dobrovoljnih davaoca krvi (negativni kontrolni serum) i 80 *Trichinella* pozitivnih humanih seruma. ROC analiza prikazana je za vrednosti PI(%).

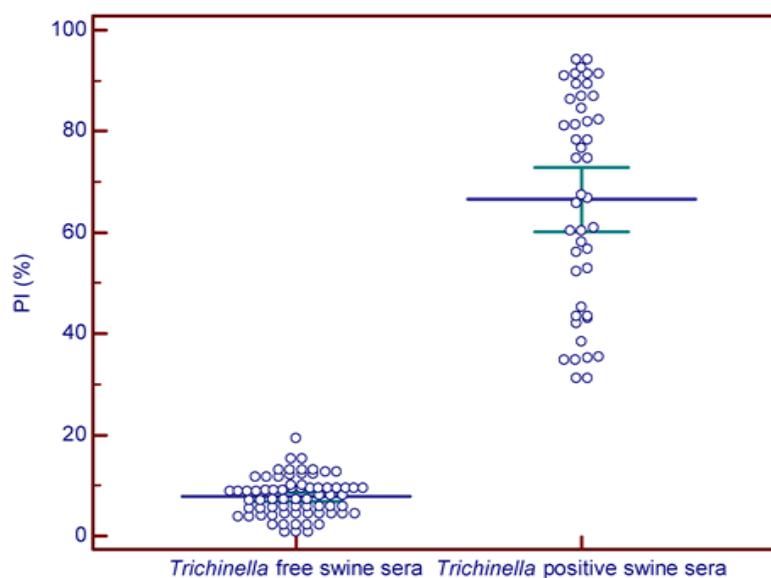
Distribucija OD i PI vrednosti dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu za 70 *Trichinella* negativnih i 45 *Trichinella* pozitivnih seruma svinja prikazana je na Slici 14.



	N	Mean	95% CI	SD	Min	Max
<i>Trichinella</i> free swine sera	70	1.27	1.26 - 1.29	0.05	1.11	1.37
<i>Trichinella</i> positive swine sera	45	0.46	0.38 - 0.55	0.29	0.06	0.95

N-number of samples, CI-confidence interval, SD-standard deviation

(a)



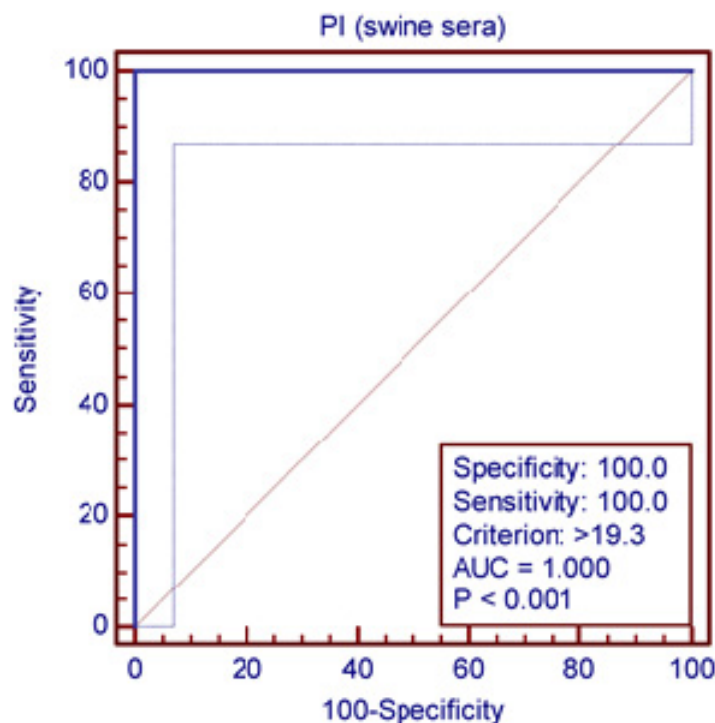
	N	Mean	95% CI	SD	Min	Max
<i>Trichinella</i> free swine sera	70	7.77	6.84 - 8.69	3.88	0.50	19.30
<i>Trichinella</i> positive swine sera	45	66.54	60.24 - 72.84	20.96	31.15	94.20

N-number of samples, CI-confidence interval, SD-standard deviation

(b)

Slika 14. Grafik distribucije OD vrednosti (a) i procenata inhibicije (PI) (b) dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu za 70 *Trichinella*-negativnih seruma i 45 seruma svinja inficiranih sa *T. spiralis* sa prikazom ključnih statističkih parametara (srednja vrednost, 95% CI, SD, minimum, maksimum).

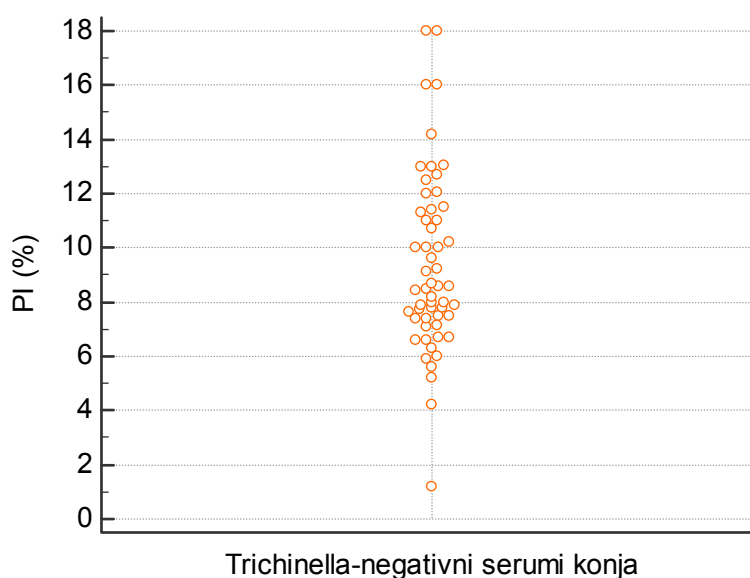
Na osnovu ROC analize utvrđena je cut-off vrednost *Trichinella* c-ELISA testa za detekciju infekcije svinja i iznosila je 19.3% PI, dok su relativna senzitivnost i specifičnost testa iznosile 100% (Slika 15). AUC je bila jednaka jedinici, iz čega se može zaključiti da se primenom ovako definisane cut-off vrednosti u tumačenju rezultata *Trichinella* c-ELISA testa postiže 100% tačnosti testa.



Slika 15. ROC analiza urađena za 70 *Trichinella* negativnih seruma svinja (negativni kontrolni serumi) i 45 *Trichinella*-pozitivnih seruma svinja. ROC analiza prikazana za vrednosti PI(%).

Na osnovu cut-off vrednosti definisanih za primenu *Trichinella* c-ELISA testa u detekciji infekcije kod ljudi i svinja, može se zaključiti da se jedinstvena cut-off vrednost (19.4%) testa može primeniti za detekciju svih testiranih vrsta.

Zbog nedovoljnog broja seruma prirodno inficiranih konja, nije bilo moguće uraditi ROC analizu koja bi precizno definisala cut-off vrednost za primenu c-ELISA testa u detekciji infekcije ovog domaćina. Za preliminarno definisanje cut-off vrednosti korišćen je statistički metod baziran na anlizi negativnih seruma konja (srednja vrednost negativnih kontrola +3 SD). Analizirano je 55 seruma zdravih konja u *Trichinella* c-ELISA testu, a grafik distribucije dobijenih PI vrednosti prikazana je na Slici 16. Srednja vrednost PI iznosila je 9.4 % (SD = 3.25), te je primenom gore navedene jednačine dobijena cut-off vrednost testa od 20.4% PI.



Slika 16. Distribucija PI vrednosti dobijenih testiranjem *Trichinella*-negativnih seruma konja u *Trichinella* c-ELISA testu.

Definisanje analitičke specifičnosti *Trichinella* c-ELISA testa

Analitička specifičnost *Trichinella* c-ELISA testa određena je analizom potencijalno ukršteno-reaktivnih seruma u testu. Ispitani su serumi ljudi inficirani drugim vrstama nematoda, zatim pacijenti oboleli od različitih autoimunskih bolesti sa različitim vrstama autoantitela, kao i serumi pacijenata sa alergijskim oboljenjima. Analizirani su i serumi svinja inficirani drugim vrstama parazita koji su u i-ELISA formatu dali lažno pozitivne rezultate (isti serumi su analizirani u radu Gomez-Morales i sar (2008)). U Tabeli 4. prikazan je spisak analiziranih seruma sa maksimalnim PI vrednostima dobijenim po grupi.

Nijedan serum iz navedene palete potencijalno ukršteno-reaktivnih seruma nije dao pozitivan rezultat u *Trichinella* c-ELISA testu. Među analiziranim uzorcima, najviša vrednost PI izmerena je za uzorak seruma svinje inficirane parazitom *Ascaris suum* (17%) i jedan serum pacijenta sa antinuklearnim antitelima (17%), što je u oba navedena slučaja bilo ispod vrednosti cut-off-a, odnosno svi *Trichinella*-negativni serumi indentifikovani su kao negativni u c-ELISA testu.

Table 4. Paleta seruma korišćena za definisanje analitičke specifičnosti *Trichinella* c-ELISA testa sa prikazom maksimalnih PI vrednosti dobijenih po grupama

	Infektivni organizmi ili autoantitela u serumima	Broj uzoraka	Broj pozitivnih nalaza u testu	Maksimalne vrednosti PI (%)
Parazitske infekcije	<i>Toxoplasma gondii</i>	50	-	7
	<i>Echinococcus granulosus</i>	45	-	8
	<i>Toxocara canis</i>	10	-	13
Humani serumi	Antimitohondrijalna antitela tipa 2	20	-	11
	Rheumatoidni faktor	10	-	9
	Autoimunske bolesti	20	-	17
	Antinuklearna antitela	5	-	14
Serumi svinja	Antitireoidna mikrozomalna antitela	10	-	11
	<i>Ascaris suum</i>	2	-	17
	<i>Hyostrogylus sp.</i>	1	-	12
	<i>Trichuris sp.</i>	4	-	14
	<i>Oesophagostomum sp.</i>	1	-	7
Nematode-koinfekcija	<i>Trichuris sp.</i> , <i>Oesophagostomum sp.</i> , <i>Eimeria sp.</i>	2	-	12

Definisanje dijagnostičkih parametara *Trichinella* c-ELISA testa

Dijagnostika efikasnost testa u smislu senzitivnosti i specifičnosti testa izračunata je na osnovu testiranja široke palete uzoraka seruma (n=445) iz dve vrste domaćina (humani serumi n=320; serumi svinja n=125). Kada su u pitanju humani serumi, pored dobro okarakterisanih *Trichinella*-pozitivnih seruma, dobro okarakterisanih negativnih seruma (seruma dobrovoljnih davaoca krvi), kao i svih potencijalno ukršteno-reaktivnih seruma, u analizu dijagnostičkih parametara testa bilo je uključeno i 40 negativnih uzoraka seruma iz epidemije. Serumi su uzorkovani od pojedinaca koji su bili izloženi izvoru infekcije i potencijalno konzumirali zaraženo meso, ali bez detektabilnih *Trichinella*-specifičnih antitela

u IFA i i-ELISA testu. Uzorci su prikupljeni u različitim perioda p.i (post infection, posle infekcije), iz različitih epidemija koje su se dogodile u periodu od 2011-2017. Primenom c-ELISA testa kod pet seruma iz ove grupe pacijenata, uzorkovanih 3-3.5 nedelje nakon konzumiranja mesa, utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela. Dobijene PI vrednosti bile su u intervalu od 20-45%. Prisustvo *Trichinella* specifičnih antitela u ovim serumima potvrđeno je WB analizom. U prilog dobijenim rezultatima je i činjenica da su analizom seruma istih pacijenata dve nedelje kasnije (drugo vađenje krvi) dobijeni pozitivni nalazi *Trichinella*-specifičnih antitela u svim primenjenim metodama. Rezultati dobijeni za pet opisanih seruma, svrstani su u kategoriju istinito pozitivnih nalaza u testu, bez obzira na rezultate referentnih testova (IFA i i-ELISA).

Klasifikacija rezultata dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu u kategorije istinito i/ili lažno pozitivnih i negativnih nalaza u testu prikazana je u Tabeli 5.

Tabela 5. Klasifikacija rezultata testa u kategorije istinito i/ili lažno pozitivnih i negativnih nalaza u testu. Cut-off vrednost korišćena u klasifikaciji rezultata testa po kategorijama iznosila je 19.4 %.

Rezultati c-ELISA testa		Broj <i>Trichinella</i> -inficiranih jedinki		Broj <i>Trichinella</i> -negativnih uzoraka	Ukupno:
Pozitivan nalaz	Istinito pozitivni nalazi	150	Lažno pozitivni nalazi	0	150
Negativan nalaz	Lažno pozitivni nalazi	0	Istinito negativni nalazi	295	295
Ukuno		150		295	445

Dijagnostička specifičnost c-ELISA testa=100%, izračunato kao $TN / (TN + FP)$

Dijagnostička senzitivnost c-ELISA testa=100%, izračunato kao $TP / (TP + FN)$

Pozitivna prediktivna vrednost c-ELISA testa=100%, izračunato kao $TP / (TP + FP)$

Negativna prediktivna vrednost=100%, izračunata kao $TN / (TN + FN)$

Ispitivanje ponovljivosti c-ELISA testa urađeno je analizom seruma različitog nivoa pozitivnosti u intra- i inter-assay ispitivanju. Budući da koeficijenti varijacije dobijeni u obe vrste testiranja nisu prelazili 3%, može se zaključiti da je ponovljivost *Trichinella* c-ELISA testa na visokom nivou (Tabela 6).

Tabela 6. “Intra”- i “inter-assay” ponovljivost *Trichinella* c-ELISA testa.

		OD (450 nm)	PI srednja vrednost	CV za OD (%)	CV za PI (%)
Intra assay	Visoko pozitivan serum	0.115	90	1.4	0.9
	Nisko pozitivan serum	0.784	31	1.8	1.25
	Negativan serum	1.25	5	1.4	1
Inter assay	Visoko pozitivan serum	0.11	90	2.8	2.2
	Nisko pozitivan serum	0.832	27	3	2.4
	Negativan serum	1.22	0	2.4	1.51

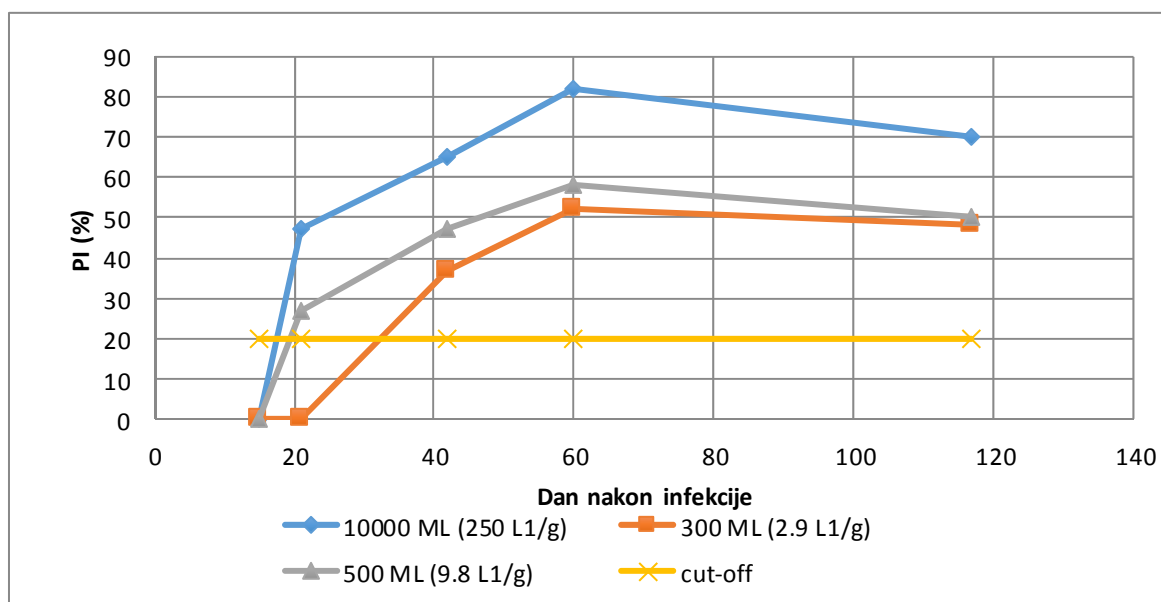
Evaluacija *Trichinella* c-ELISA testa korišćenjem uzoraka seruma eksperimentalno inficiranih svinja i konja (*T. spiralis*)

Prilikom razvoja novog dijagnostičkog testa, veoma je važno ispitati primenljivost testa u različitim fazama infekcije (početak, sredina i kraj infekcije) ukoliko su takvi uzorci dostupni. U slučaju detekcije *Trichinella*-specifičnih antitela u humanim serumima, često je veoma teško obezbediti dovoljan broj seruma dobijenih u početnim fazama infekcije. Kada je u pitanju validacija testova namenjenih veterinarskoj medicini, situacija je nešto lakša jer se analiziraju serumi eksperimentalno inficiranih životinja uzorkovani u svim ključnim fazama praćenja infekcije.

Kinetika antitelnog odgovora tri eksperimentalno inficirane svinje, primenom različitih doza infekcije ML *T. spiralis*, dobijena analizom u c-ELISA testu prikazana je na Slici 17.

Prvi pozitivan nalaz antitela u serumima svinja detektovan primenom *Trichinella* c-ELISA testa, dogodio se u rasponu od 21.-40. dana p.i., u zavisnosti od primenjene doze infekcije. U slučaju infekcije sa 300 ML, bilo je moguće detektovati antitela već u 21. danu infekcije kod jedne od tri životinje (osetljivost testa bila je 33%), dok je za istu grupu životinja 100% senzitivnosti postignuto nakon 40. dana p.i. (3/3 životinje). Serološki odgovor na infekciju sa 500 ML (3 svinje u grupi) detektovan je u 21. danu infekcije sa 66% senzitivnosti (2 od 3 životinje), dok je u 40 dana p.i., senzitivnost testa povećana na 100% (3

od 3 životinje). Kod životinja inficiranih visokom dozom ML *T. spiralis* (1000 ML), specifična antitela detektovana su već nakon 21 dan p.i. kod svih životinja (100% senzitivnosti testa u 21. danu) (Tabela 7). Antitela su kod svih ispitanih životinja ostala detektabilna do kraja perioda praćenja infekcije.



Slika 17. Kinetika antitelnog odgovora praćena kod tri eksperimentalno inficirane svinje, određivanjem prisustva specifičnih antitela primenom *Trichinella* c-ELISA testa. Životinje su inficirane različitim dozama ML *T. spiralis* (300, 500 i 10000 ML). Uzorci seruma prikupljeni su 0, 15., 21., 41. i 60. dana p.i. Broj larvi detektovanih po gramu testiranog mesa prikazan je u zagradi.

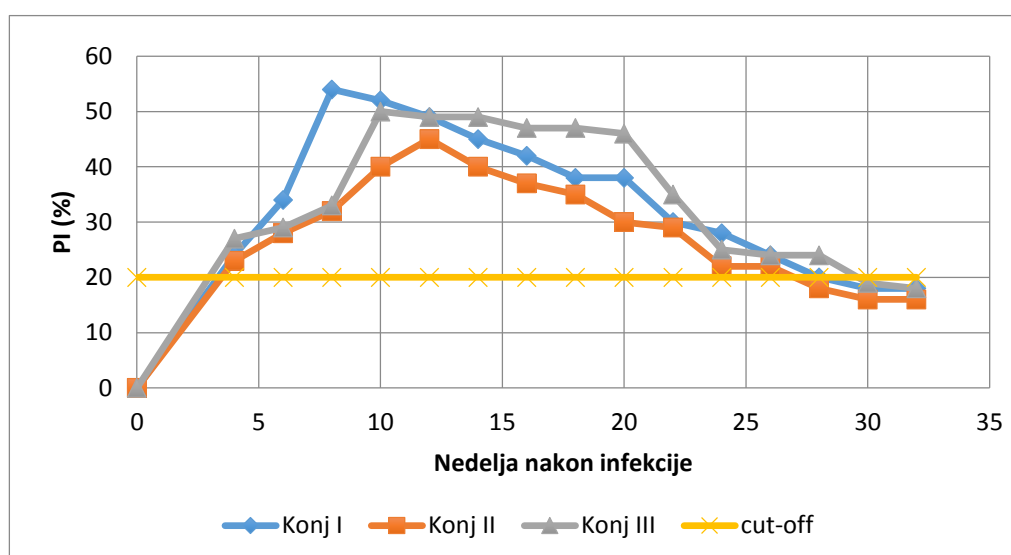
Iz rezultata prikazanih u Tabeli 7. jasno se vidi da je senzitivnost c-ELISA testa bila veća u odnosu na i-ELISA test u svim analiziranim grupama i periodima p.i.

Table 7. Poređenje senzitivnosti *Trichinella* i-ELISA i *Trichinella* c-ELISA testa u 21 danu infekcije eksperimentalno inficiranih svinja. Relativna senzitivnost testa prikazana je u zagradi.

	i-ELISA (% senzitivnost)	c-ELISA (% senzitivnost)
300 ML	0/3 (0)	1/3 (33)
500 ML	0/3 (0)	2/3(66)
10000 ML	1/3 (33)	3/3(100)

Ispitivanje potencijala *Trichinella* c-ELISA testa da detektuje specifična antitela u serumima konja u različitim fazama infekcije, urađeno je analizom seruma tri

eksperimentalno inficirane životinje. Rezultati prikazani na Slici 18., pokazuju da je specifičnost testa u 40. danu infekcije bila 100% (specifična antitela detektovana u 3/3 životinje). Maksimalne vrednosti PI (u rasponu 35 -54% PI) zabeležene su 6 nedelja nakon infekcije kod svih eksperimentalno inficiranih konja. Nakon toga, PI vrednosti u c-ELISA testu opadaju ali ostaju pozitivne do 26 nedelja p.i. kod konja II (20% PI) i do 28 nedelje p.i. kod konja I i III (25 i 27% PI, respektivno) (Slika 18).



Slika 18. Kinetika antitelnog odgovora dobijena analizom seruma eksperimentalno inficiranih konja u *Trichinella* c-ELISA testu. Tri odrasla konja, srpske domaće planinske rase (DMB) (Konji I, II i III) inficirana sa 1100 larvi *T. spiralis*. Uzorci seruma prikupljeni su nultog dana, 4 nedelje posle infekcije (p.i.) a zatim u dvonedeljnim intervalima do kraja eksperimenta. Konji su žrtvovani u 32. nedelji infekcije.

4.2. Razvoj testa za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela

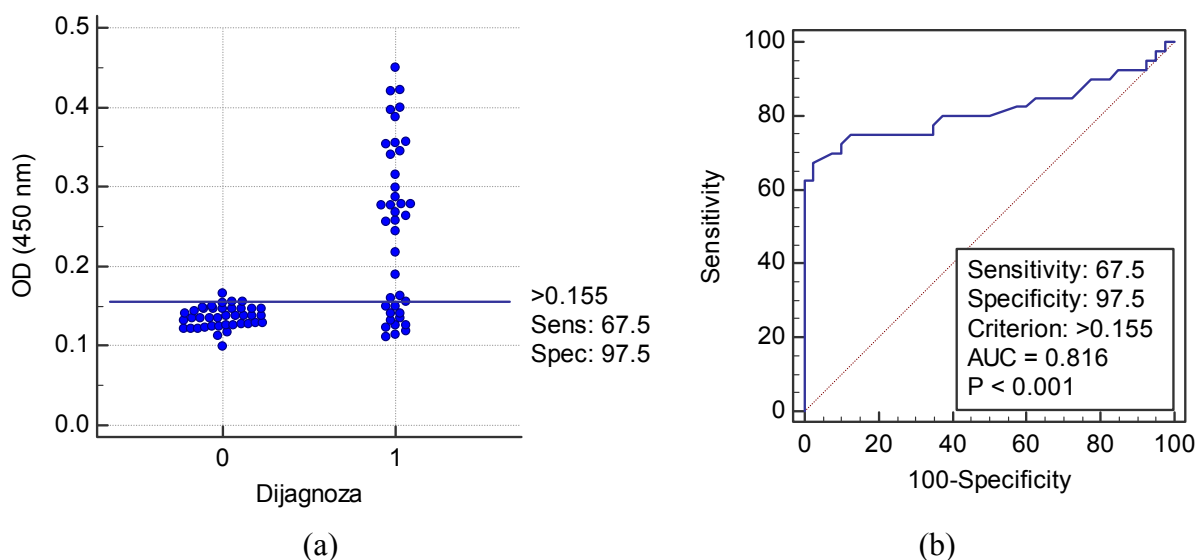
Praćenje jednog od potencijalnih markera rane dijagnostike humane trihineloze bilo bi omogućeno razvojem pouzdanog testa za detekciju specifičnih IgE antitela usmerenih prema *Trichinella* spp. u humanim serumima, budući da takavi testovi komercijalno nisu dostupni, dok je senzitivnost testova prikazanih u literaturi, razvijenih za potrebe naučnog rada, na nezadovoljavajućem nivou (35-75%). Problem u detekciji *Trichinella* specifičnih IgE antitela klasičnim indirektnim ELISA testom proizilazi iz činjenice da je koncentracija specifičnih IgG antitela dosta viša u odnosu na IgE klasu antitela i da dolazi do blokiranja antigen-vezujućih mesta na čvrstoj fazi od strane koncentracijski dominantnije klase antitela. Usled nemogućnosti da se IgE antitela vežu za karakterističan epitop, pojavljuje se veliki broj lažno

negativnih rezultata u testu. Najčešće korišćeni način da se prevaziđe problem kompeticije i postigne maksimum detekcije specifičnih IgE antitela, jeste uklanjanje ukupnih IgG antitela iz uzoraka seruma primenom različitih komercijalno dostupnih RF apsorbentata (apsorbentata reumatoidnog faktora), ili protein A i protein G-aktiviranih agaroznih čestica (Estambale i sar., 1995; Kurniawan i sar., 1995; Ajax i sar., 1998, Souza-Atta i sar., 1999; Jaoko i sar., 2001; Mamuni i sar., 2010).

4.2.1. Pojačan indirektni ELISA test namenjen detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela – *Trichinella* IgE i-ELISA test

Multifaktorijskom titracijom svih komponenti testa, utvrđeno je da je optimalno razblaženje seruma za korišćenje u *Trichinella* IgE i-ELISA testu, 1:3 sa dužinom inkubacije od 2h na +37°C. Anti humana IgE antitela koriste se kao prva detektujuća antitela, u koncentraciji 2 µg/ml. Optimalno vreme za izvođenje inkubacije iznosi 1h na +37°C. Optimalno razblaženje anti-mišjih antitela – druga vrsta detekcionih antitela koja se u testu koriste, iznosi 1: 1000. Uslovi inkubacije definisani su od strane proizvođača (1h na sobnoj temperature).

Rezultati dobijeni analizom seruma pacijenata obolelih od trihineloze na prisustvo specifičnih IgE antitela primenom pojačanog indirektnog ELISA testa prikazani su na Slici 19.



Slika 19. Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima primenom pojačanog indirektnog ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trichinella* pozitivnih seruma i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza dobijenih rezultata.

Izmerene vrednosti OD dobijene u indirektnom ELISA testu bile su niske (u opsegu od 0.110 do 0.450), bez obzira na korišćenje principa amplifikacije signala u testu, verovatno kao posledica inhibicije vezivanja specifičnih IgE antitela od strane IgG klase antitela. Iz istog razloga javlja se i veliki broj lažno negativnih rezultata u testu (37.5%) (Slika 19a). Cut-off vrednost testa definisana je analizom 40 pozitivnih i 40 negativnih kontrolnih seruma u testu (Slika 19b). Na osnovu ROC analize, dobijena je optimalna cut-off vrednost od 0.155 OD, dok su relativna senzitivnost i specifičnost testa iznosile 67.5% i 97.5%, respektivno. Vrednost AUC od 0.816 klasifikuje i-ELISA test kao test niskog novoa pouzdanosti za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela.

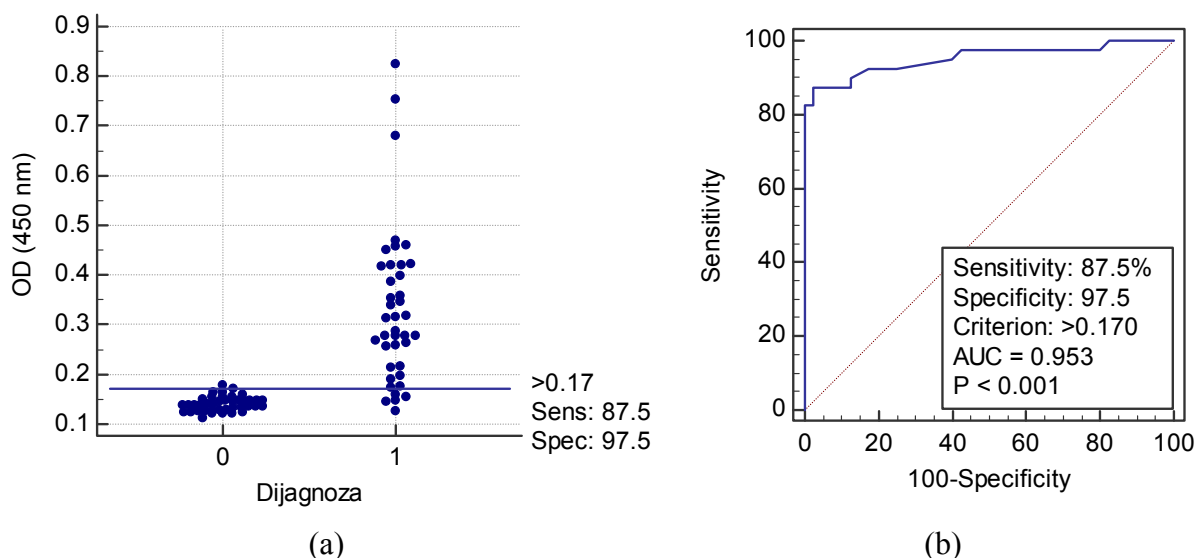
4.2.2. Indirektni ELISA test namenjen detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela sa korišćenjem RF-tretiranih uzoraka

Ispitivanje efikasnosti RF absorbenta u uklanjanju IgG antitela i reproducibilnosti metode ispitana je analizom tri seruma, od kojih je svaki procesuiran u dva nezavisna tretmana. Koncentracija IgG antitela proveravana je pre i nakon RF tretmana analizom seruma u testu radijalneimunodifuzije (RID ploče, INEP, Srbija) (Tabela 8).

Tabela 8. Ispitivanje efikasnosti RF absorbenta u uklanjanju serumskih IgG antitela.

	IgG pre RF tretmana (mg/ml)	IgG nakon RF tretmana (mg/ml) - I proba	IgG nakon RF tretmana (mg/ml) - II proba
<i>Trichinella</i> -pozitivni serum 1	15.3	Ne merljivo u RID (Inep)	Ne merljivo u RID (Inep)
<i>Trichinella</i> -pozitivni serum 2	19.3	Ne merljivo u RID (Inep)	Ne merljivo u RID (Inep)
<i>Trichinella</i> -pozitivni serum 3	17.2	Ne merljivo u RID (Inep)	Ne merljivo u RID (Inep)

Koristeći uzorke seruma tretirane IgG-absorbentom (RF absorbentom) za detekciju u indirektnom ELISA testu, senzitivnost testa značajno je povećana, i to sa 67.5% u slučaju korišćenja netretiranih uzoraka seruma za analizu na 97.5% u slučaju korišćenja RF tretiranih uzoraka. Dobijene OD vrednosti za pozitivne serume bile su više (najviša izmerena OD vrednost bila je 0.824) od onih dobijenih u klasičnoj indirektnoj ELISA (najviša izmerena OD vrednost bila je 0.450). Rezultati ispitivanja prikazani su na Slici 20.



Slika 20. Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima tretiranim RF absorbentom primenom pojačanog indirektnog IgE ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trichinella* pozitivnih seruma i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza dobijenih rezultata.

Ispitivanje ponovljivosti testa - Pet pozitivnih i pet negativnih seruma tretirano je u intra i inter-assay ispitivanju. Intra-assay ispitivanje podrazumeva poređenje rezultata dobijenih u triplikatima, za uzorke seruma dobijene u jednom RF tretmanu. Inter-assay ispitivanje podrazumeva poređenje rezultata dobijenih u testu za uzorke seruma koji su tretirani RF absorbentom u tri različita tretmana. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti standardne devijacije (SD) i koeficijenti varijacije (CV) dobijenih u tri ponavljanja u intra i inter-assay ispitivanju.

Table 9. Ispitivanje ponovljivosti i-ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u slučaju korišćenja RF tretiranih uzoraka.

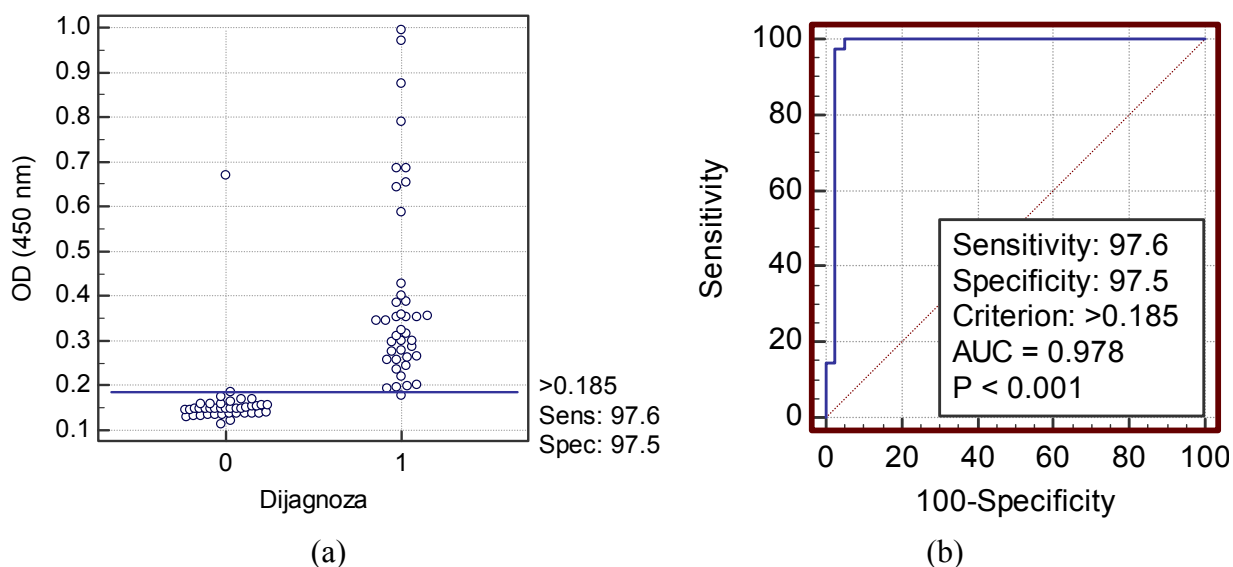
	Serumi	Broj ponavljanja	SD	CV(%)
“Intra-assay” ispitivanje	Negativni	3	0.0025	9.2
	Pozitivni	3	0.00258	7.9
“Inter-assay” ispitivanje	Negativni	3	0.0061	16.2
	Pozitivni	3	0.005	12.1

Bez obzira na visok nivo ponovljivosti RF tretmana, korišćenje tako tretiranih uzoraka u i-ELISA testu ne daje konzistentne rezultate (Tabela 9). Konsezenza oko dozvoljenih CV vrednosti u intra i inter-assay ispitivanju nema, najčešće se kao takve koriste CV manje od 20% dobijene u intra- i 30% dobijene u inter-assay ispitivanju (Jacobson, 1998), CV dobijene u pojačanom indirektnom ELISA testu (sa RF tretiranim uzorcima) (maksimalna CV=16.2%) mogu se smatrati prihvatljivim (Tabela 9).

4.2.3. „Capture” *Trichinella* IgE ELISA test namenjen detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela

Multifaktorijskom titracijom svih komponenti testa utvrđeno je da je optimalna koncentracija “capture” – anti-humanih IgE antitela, 2 µg/ml. Uslovi vezivanja antitela za ploče bili su isti kao i u slučaju vezivanja ES L1 Ag. Optimalno razblaženje seruma za korišćenje u testu iznosilo je 1:3, sa dužinom inkubacije od 2h na +37°C. Optimalna koncentracija ES L1 Ag, koji se koristi kako bi se *Trichinella*-specifična IgE antitela izolovala od drugih nespecifičnih IgE antitela vezanih za čvrstu fazu, iznosila je 2 µg/ml, uz trajanje inkubacije od 2h, na sobnoj temperaturi. Maksimalne razlike OD vrednosti izmerenih u testu za visoko pozitivne i negativne serume, postižu se korišćenjem konjugata (7C2C5 mAt-HRP) u razblaženju 1:500, sa dužinom inkubacije od 1 h na sobnoj temperaturi.

Analizom iste grupe serume u Capture ELISA testu, dobijene su značajno više vrednosti OD u odnosu na obe gore prikazane vrste i-ELISA testa za sve pozitivne kontrolne serume, dok je nivo izmerenih OD vrednosti za negativne kontrolne serume ostao veoma sličan. Na grafiku distribucije izmerenih OD vrednosti u capture ELISA testu nije bilo preklapanja među različitim grupama pacijenata, *Trichinella*-pozitivnih pacijenata i zdravih kontrola (Slika 21).



Slika 21. Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima primenom Capture *Trichinella* IgE ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trichinella* pozitivnih i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza.

ROC analiza urađena je obradom rezultata dobijenih u Capture *Trichinella* IgE ELISA testu za dobro definisane pozitivne (n=40) i negativne serume (n=40) u odnosu na prisustvo *Trichinella*-specifičnih IgE antitela (Slika 21b.). Definisana je optimalna cut-off vrednost - 0.185 OD, dok su relativna dijagnostička senzitivnost i specifičnost testa iznosile 97.6 i 97.5 %, respektivno.

Intra- i inter-assay varijabilnost Capture *Trichinella* c-ELISA testa, urađena je na već opisani način, dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 10.

Table 10. Ispitivanje ponovljivosti Capture *Trichinella* IgE ELISA testa

	Serumi	Broj ponavljanja	SD	CV(%)
Intra-assay ispitivanje	Negativni	3	0.0025	5.5
	Pozitivni	3	0.0006	1.28
Inter-assay ispitivanje	Negativni	3	0.0044	7.71
	Pozitivni	3	0.017	3.5

Budući da CV ne prelaze 2% za pozitivne i 6% za negativne serume u intra-assay testiranju i 4% za pozitivne i 8% za negativne serume u inter-assay ispitivanju, može se zaključiti da je ponovljivost testa na zadovoljavajućem nivou i da se test može pouzdano koristiti u detekciji IgE specifičnih antitela.

Analitička specifičnost testa određena je analizom seruma ljudi dobijenih od pojedinaca inficiranih drugim vrstama parazita ili ljudi sa potvrđenim alergijskim poremećajima. Rezultati su prikazani kao maksimalne OD vrednosti po grupi (Tabela 11).

Ustanovljena je analitička specifičnost na nivou 100% pošto su svi rezultati analiziranih seruma bili negativni.

Table 11. Analitička specifičnost Capture *Trichinella* IgE ELISA test

	Br. seruma	Pozitivni rezultati u testu	Negativni rezultati u testu	Maksimalna OD vrednost	Analitička specifičnost testa
Serumi pacijenata sa potvrđenim alergijskim poremećajima	30	/	30	0.172	100%
<i>Echinococcus granulosus</i>	20	/	20	0.169	
<i>Toxoplasma gondii</i>	20	/	20	0.165	

Kod jednog dela pacijenata obolelih od trihineloze uočava se porast ukupnih (nespecifičnih) IgE antitela kao posledica prisustva *Trichinella*-specifičnih IgE antitela. Budući da ovde prikazani test koristi monoklonska antitela - anti-humana IgE kao “capture” antitela, koja imaju za cilj izolaciju serumskih IgE antitela od drugih vrsta antitela u prisutnih u serumima, bilo je važno ispitati uticaj prisustva različitih koncentracija nespecifičnih (ukupnih) IgE antitela u ispitujućim uzorcima na rezultat testa.

Dodatak različitih količina humanih IgE antitela (kontrolni serum za detekciju humanih IgE antitela u serumima, raspon koncentracija od 0-180 KIU/L, INEP, Srbija) u jedan *Trichinella*-pozitivan serum (T u IFA 1280) ne utiče na rezultat u Capture *Trichinella* IgE ELISA testu (Tabela 12).

Table 12. Uticaj dodavanja različitih koncentracija nespecifičnih IgE antitela na rezultat Capture *Trichinella* IgE ELISA testa.

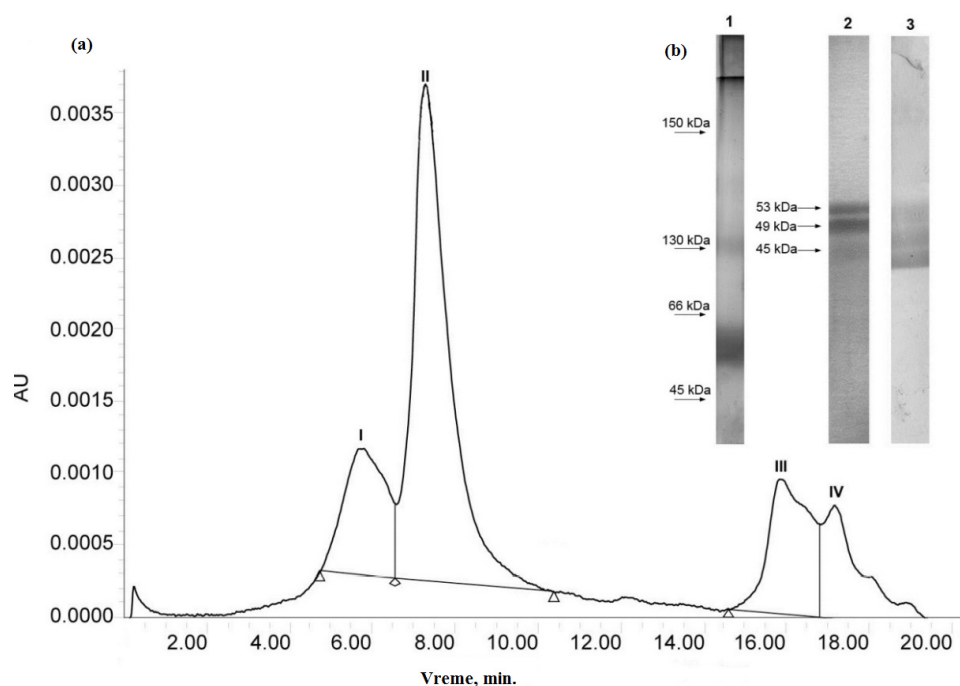
Koncentracija dodatih humanih IgE antitela KIU/L	OD (450 nm) vrednosti dobijene u Capture IgE ELISA testu
0	0.377
3	0.357
7	0.378
10	0.368
30	0.377
60	0.369
120	0.366
180	0.369

4.3. Ispitivanje uloge 7C2C5 antigena na pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora

Dosadašnja istraživanja na animalnim modelima pokazala su da ES L1 Ag indukuje nepotpuno sazrevanje DĆ i polarizuje imunski odgovor u pravcu Th2 i/ili regulatornog tipa odgovora, ali se ne zna ništa o tome koje komponente u okviru ES L1 Ag su odgovorne za takav efekat na imunski sistem. Predpostavlja se da se primenom proteina prepoznatih od strane 7C2C5 mAt iz sastava ES L1 Ag, za koji je ranije pokazano da su nosioci imunodominantnog epitopa, može postići isti efekat na pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora kao i primenom ukupnog ES L1 Ag.

4.3.1. HPLC i elektroforetska analiza izolovanog 7C2C5Ag

Monoklonsko 7C2C5 antitelo, koje prepoznaje imunodominantni epitop specifičan za mišićne larve *Trichinella*, korišćeno je kao ligand za izolaciju glikoproteina koji nose imunodominantni epitop odgovoran za pokretanje humoralnog imunskog odgovora, primenom afinitivne hromatografije. Hromatografskom analizom izolovane proteinske smeše dobijena su četiri pika na 5.7, 7.2, 15.9 i 17.1 min (Slika 22).



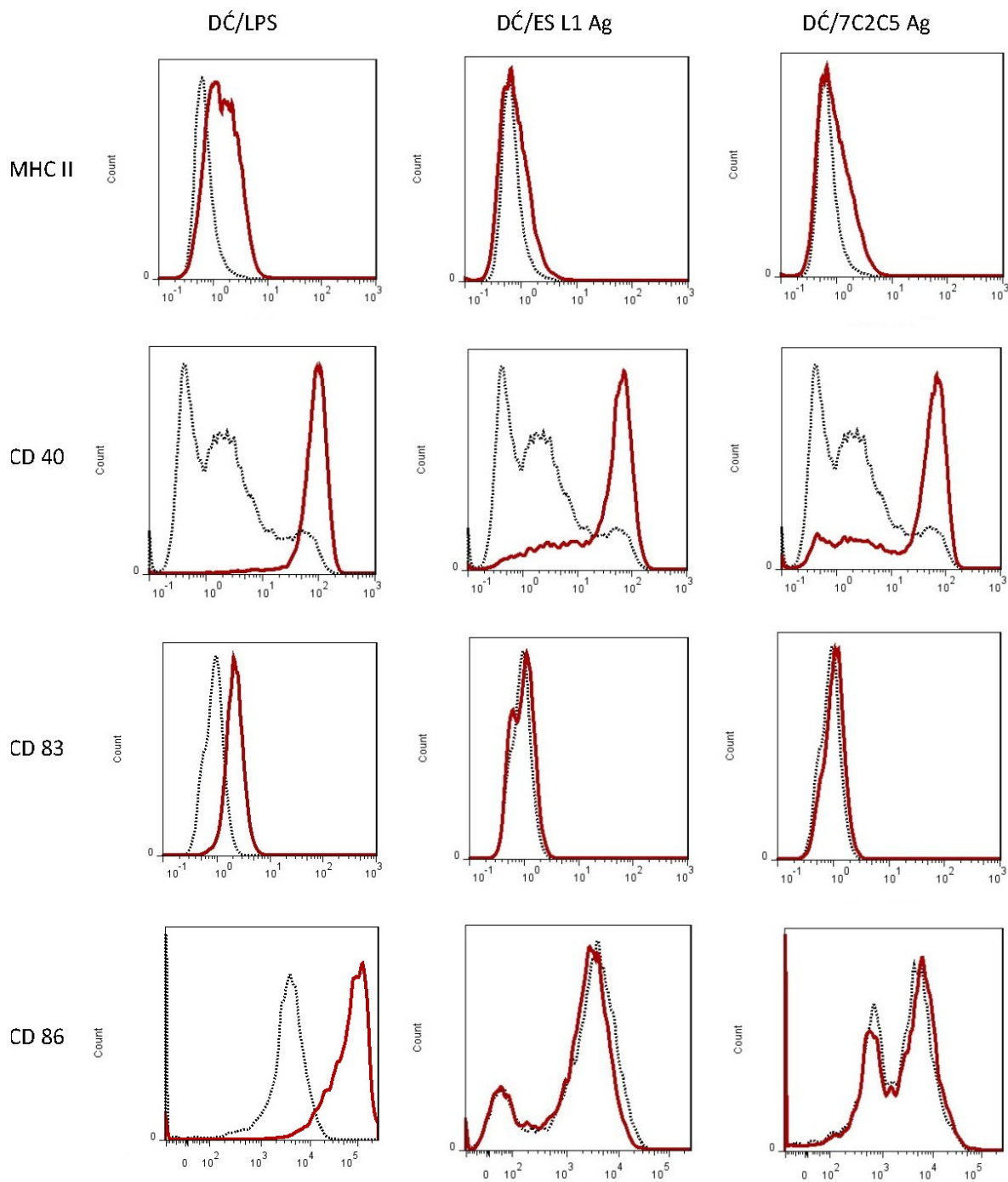
Slika 22. Analiza izolovanog 7C2C5 antigena. (a) Na elucionom profilu dobijenom nakon HPLC analize (BioSuite ekskluziona hromatografska kolona visoke rezolucije, sa 0.05 M PBS, pH 7.2), jasno su uočljiva četiri pika (I-IV) dobijena na 5.7, 7.2, 15.9 i 17.1 min., predstavljene u arbitralnim jedinicama (AU), (b) Elektroforeza urađena pod ne-redukujućim (traka 1 – markeri molekulske težine) i redukujućim uslovima (traka 2 – molekulske težine izolovanih proteina). Traka 3 pokazuje imunoblot analizu izolovanih antigena primenom 7C2C5 mAt.

Pik I i pik II se odnose na proteine izolovane na 7C2C5 koloni, sobzirom da su njihove približne molekulske težine, izračunate upoređivanjem vremena zadržavanja proteina u ispitivanom uzorku i standarda, bile približno 320 i 150, respektivno. Molekulske težine druga dva pika bile su veoma niske i verovatno predstavljaju rezultat prisustva fragmenata peptida. Pikovi I i II pokrivaju široku oblast. Pik I pokriva površinu od približno 200 do 500

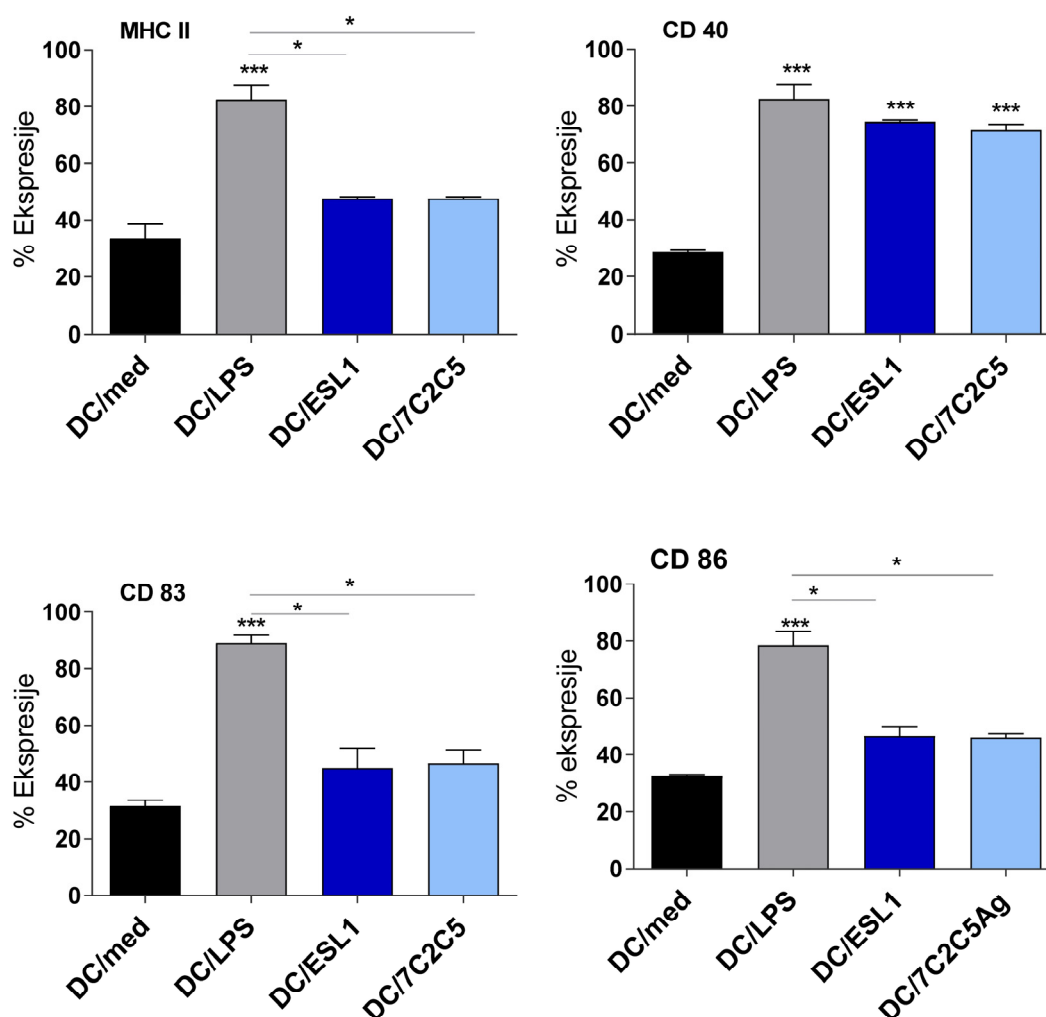
kDa, dok pik II pokriva površinu između 40 i 200 kDa ukazujući na to da se pikovi odnose na smešu proteina a ne pojedinačne proteine. Dalja analiza izolovanih frakcija primenom native elektroforeze otkriva postojanje četiri trake, jedna u opsegu između 45 i 66 kDa, jedna na 130 kDa, jedna traka na približno 140 kDa i jedna na preko 300 kDa (Slika 22b, traka 1). Može se pretpostaviti da ovi proteini predstavljaju prva dva pika na hromatogramu. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteinske smeše 7C2C5 antigena pri redukujućim uslovima, uočene su tri jasno vidljive trake na 45, 49 i 53 kDa (Slika 22b, traka 2). Imunogenost tako razdvojenih proteinskih komponenata 7C2C5 Ag potvrđena je primenom VB tehnike u reakciji sa 7C2C5 mAt, koji je reagovao sa sve tri trake, na 45, 49 i 53 kDa (Slika 22b, traka 3). Treba napomenuti da su iste trake prethodno otkrivene za reakciju ES L1 sa 7C2C5 mAt (Ilic i sar., 2014).

4.3.2. Fenotipske karakteristike DĆ stimuliranih sa ES L1 i 7C2C5 antigena

Da bi ispitali kapacitet 7C2C5Ag za pokretanje imunskog odgovora, DĆ su kultivisane sa LPS-om (Th1 stimulus koji dovodi do potpunog sazrevanja DĆ - DĆ/LPS), antigenima *T. spiralis*: ES L1 Ag i 7C2C5Ag (DĆ/ES L1 i DĆ/7C2C5Ag) ili su gajene samo u medijumu bez stimulusa (DĆ/med), nakon čega je analizirana ekspresija površinskih markera i produkcija citokina. Kao pokazatelj stepena zrelosti DĆ, ispitivana je ekspresija površinskih markera HLA DR, CD40, CD83 i CD86. Čelije stimulirane LPS-om imale su fenotip karakterističan za zrele DĆ tj. pokazale su značajno veću ekspresiju svih ispitivanih površinskih markera u odnosu na kontrolu. Stimulacija sa ES L1 Ag uticala je na umereno povećanje ekspresije HLA DR, CD83 i CD86 molekula iako bez statističke značajnosti u odnosu na ekspresiju uočenu na nezrelim DĆ, dok je ekspresija CD40 molekula značajno povećana u poređenju sa negativnom kontrolom (Slika 23a,b). Čelije stimulirane sa 7C2C5Ag pokazale su tipične morfološke karakteristike delimično zrelih DĆ. Ovi antigeni su izazvali umereno povećanje ekspresije HLA DR, CD83 i CD 86 molekula i blago povećanje ekspresije CD40 u poređenju sa negativnom kontrolom (nestimuliranim DĆ), što je fenotipsku profil koji odgovara stimulaciji sa kompletnim ES L1 Ag. Sa Slike 23a može se videti da, premda je uočen nešto veći potencijal 7C2C5 Ag u odnosu na ukupan ES L1 da indukuje povećanje ekspresije HLA DR, nije bilo statistički značajne razlike u ekspresiji površinskih markera između DĆ stimuliranih sa ova dva antigena (Slika 23b), na osnovu čega se može zaključiti da je 7C2C5-Ag -(koji prepoznaje 7C2C5 antitelo) važna komponenta iz sastava ES L1 Ag u pokretanju imunskog odgovora.



(a)

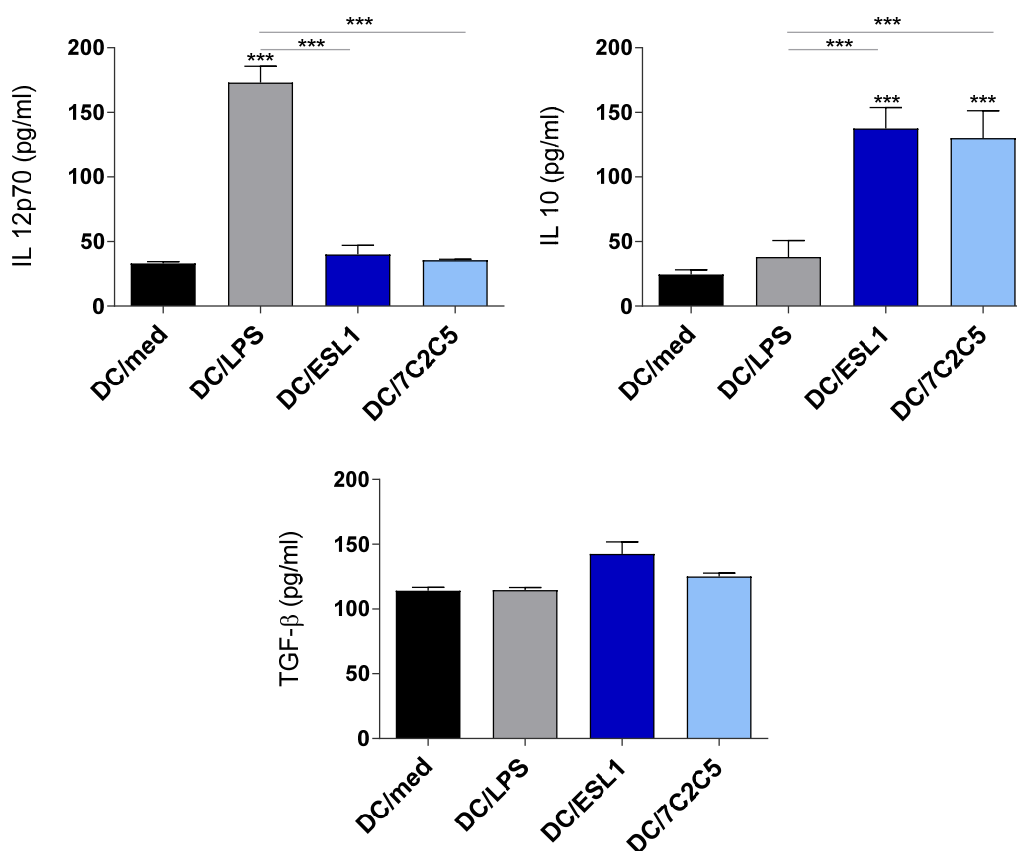


(b)

Slika 23. Uticaj ES L1 i 7C2C5 antigena na ekspresiju površinskih markera dendritskih ćelija. Stimulacija humanih DĆ sa LPS-om (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ES L1 i 7C2C5 antigenima (10 µg/ml) i bez stimulusa (gajene samo u medijumu - negativna kontrola) tokom 48 sati. a) Reprezentativni plotovi. Siva linija predstavlja negativnu kontrolu (ekspresija markera na netretiranim ćelijama), a crvena predstavlja ekspresiju ispitivanih molekula na tretiranim DĆ. b) Procenat ekspresije površinskih markera stimulisanih i nestimuliranih DĆ. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

4.3.3. Citokinski profil DC stimulisanih antigenima ES L1 i 7C2C5

Funkcionalna karakterizacija humanih DC poreklom od monocita periferne krvi, stimulisanih antigenima *T. spiralis* u *in vitro* uslovima praćena je određivanjem koncentracije citokina u supernatantima kulture DC. Praćena je produkcija IL-10, koji učestvuje u usmeravanju u pravcu Th2 i regulatornog tipa imunskog odgovora, TGF- β , koji učestvuje u generisanju i ekspanziji Treg, kao i pro-inflamatornog citokina IL-12p70, odgovornog za usmeravanje ka Th1 tipu imunskog odgovora (Slika 24). Ćelije stimulisane LPS-om predstavljale su pozitivnu kontrolu, tj. one su bile mera potpunog sazrevanja DC.



Slika 24. Uticaj ES L1 i 7C2C5 antigena na produkciju citokina dendritskih ćelija. DC, kultivisane iz koštane srži mužjaka DA pacova, stimulisane su LPS-om (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ES L1 i 7C2C5 antigenima (50 μ g/ml) ili su gajene samo u medijumu bez stimulacije (negativna kontrola) 48 sati. Citokinski nivoi IL-12p70 (a), IL-10 (b) i TGF- β (c) su mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7C2C5Ag antigeni indukovali su produkciju IL-10, koja u potpunosti odgovara produkciji izazvanoj stimulacijom DĆ sa kompletnim ES L1 antigenom. Kao što se sa Slike 19 (a i b) vidi, ne postoji statistički značajna razlika u produkciji IL-12p70 i IL-10 između DĆ/ES L1 i DĆ/7C2C5Ag, tj. navedeni antigeni indukuju značajno povećanu produkciju IL-10, dok je produkcija IL-12p70 bila na nivou koji odgovara koncentraciji citokina koje proizvode netretirane ćelije kao i one tretirane sa ES L1. Analiziranjem produkcije TGF- β u supernatantima DĆ stimuliranim 7C2C5Ag, pokazano je da 7C2C5Ag ne indukuje značajno višu koncentraciju TGF- β u poređenju sa nestimuliranim ćelijama, DĆ/LPS ili DĆ/ES L1 (Slika 24).

5. DISKUSIJA

Kontinuirani razvoj seroloških testova za detekciju infekcije sa *Trichinella spp.* u velikoj meri je doprineo boljem razumevanju prevalencije i epidemiologije ove zoonoze. Kvalitet testova utiče na uspešnost u postavljanju dijagnoze, a samim tim i na brzinu određivanja adekvatne terapije bolesti kod ljudi. Takođe, serološki testovi (koji pored antitela u serumu mogu da otkriju prisutvo antitela i u uzorku pune krvi ili u telesnim tečnostima kao što je iscedak od mesa (Patrascu i sar., 2001; Nockler i sar., 2005) predstavljaju važno sredstvo za praćenje infekcije ovim parazitom, kako kod domaćih svinja i konja tako i kod divljih životinja, naročito divljih svinja koje se sve više gaje u prirodnim uslovima za ljudsku upotrebu (http://old.iss.it/binary/crlp/cont/ITALY_trichinella_2014.pdf). *In vitro* dijagnostički testovi generalno treba da imaju visoku osetljivost i specifičnost i moraju biti reproducibilni, dok je poželjno da testovi namenjeni posebnim uslovima rada i epizootiološkim ispitivanjima ispunjavaju i dodatne uslove tj. da budu laki za izvođenje i prilagodljivi za upotrebu u lokalnim laboratorijama bez specijalizovane opreme. Danas se u dijagnostici infekcije sa *Trichinella spp.* najšire primenjuju ELISA testovi različitih formata (Gamble i sar., 2004; Yang i sar., 2015). Antigeni koji se koriste u serološkim testovima za detekciju antitela razvijali su se od sirovih ekstrakta do visoko prečišćenih specifičnih antigena, sintetičkih peptida i rekombinantnih antigena (Buschi i sar., 2001; Gamble i sar., 2004; Forbes i sar., 2004; Jung i sar., 2007; Nagano i sar., 2008; Ruangkunaporn i sar., 2011). Uprkos napretku u razvoju seroloških testova dijagnoza trihineloze i dalje predstavlja izazov.

Ključni problemi u imunodijagnostici infekcije izazvane *Trichinella spp.*, kako kod ljudi, a posebno kod životinja, jesu nedovoljna specifičnost postojećih testova (ako su prisutna antitela poreklom od infekcija sa drugim parazitima koja mogu prepoznati nespecifične antigene *Trichinella*), kao i nepostojanje univerzalnih testova koji bi bili primenljivi za detekciju *Trichinella*-specifičnih antitela kod više vrsta domaćina. Takođe, jedan od nedostataka postojećih testova jeste i niska senzitivnost testova u početnim fazama infekcije, odnosno visok procenat lažno negativnih rezultata koji se u testu dobijaju u periodu 2-4 nedelje p.i. (Gomez-Morales i sar. 2008).

Zato je prvi postavljeni cilj ovog rada bio ispitivanje mogućnosti primene 7C2C5 mAt za formiranje ELISA testova veće senzitivnosti i specifičnosti u odnosu na sve postojeće. Veliki dijagnostički potencijal 7C2C5 mAt (koja prepoznaju epitop karakterističan za mišićne larve čitavog genusa *Trichinella* prisutan na tripletu proteina od 45, 49, 53 kDa) dobio je potvrdu u formiranju jedinstvenog ELISA testa, koji po svojim karakteristikama može da odgovori na pomenute dileme koje nastaju korišćenjem postojećih *in vitro* testova za

serološku dijagnostiku trihineloze. Ovde je prikazan razvoj inovativnog, kompetitivnog ELISA testa – *Trichinella* c-ELISA, namenjenog detekciji *Trichinella* specifičnih antitela kod ljudi i domaćih svinja sa potencijalom da test bude primenjen i kod drugih vrsta životinja suspektnih na infekciju izazvanu navedenim parazitom. *T. spiralis* i *T. britovi* su jedine dve vrste iz roda *Trichinella* detektovane kao uzročnik infekcije ljudi na području Srbije (podaci NRLT). Primenljivost testa dokazana je na serumima ljudi inficiranih sa *T. spiralis* i *T. britovi*, serumima svinja inficiranih sa *T. spiralis* i *T. pseudospiralis* i serumima eksperimentalno inficiranih konja (*T. spiralis*). Primenljivost *Trichinella* c-ELISA testa pokazana je i na limitiranom broju uzoraka divljih svinja (n=6), eksperimentalno inficiranih vrstom *T. spiralis* (n=3) i *T. britovi* (n=3), pri čemu su svi analizirani serumi identifikovani kao pozitivni. Za razliku od univerzalnog *Trichinella* c-ELISA testa, svi komercijalno dostupni testovi kao i oni prikazani u literaturi, namenjeni su detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela kod samo jedne vrste domaćina, a kao posledica korišćenja detektujućih antitela specifičnih isključivo prema vrsti domaćina. Internacionalna komisija za trihinelozu (Gamble i sar., 2004) za sada preporučuje upotrebu sekundarnih antitela (konjugata) specifičnih prema vrsti domaćina umesto proteina A ili G u cilju povećanja specifičnosti testova, što sa druge strane onemogućava detekciju *Trichinella*-infekcije kod različitih vrsta domaćina primenom istih komponenti i parametara testa.

Trichinella c-ELISA test koristi jedno antitelo - mAb 7C2C5 (HRP-konjugovano), istovremeno kao kompetitivni i detektujući reagens, bez korišćenja sekundarnih antitela specifičnih prema vrsti domaćina, čime je omogućena identifikacija *Trichinella*-specifičnih antitela bez obzira na njihov izotip ili vrstu domaćina koji produkuje antitela od interesa. Merljivi signal u c-ELISA testu obrnuto je proporcionalan koncentraciji specifičnih antitela prisutnih u ispitivanom serumu i potiče isključivo od interakcije mAb 7C2C5 – imunodominantni epitop, bez mogućnosti da druge vrste interakcija, do kojih može doći kao i u svakom drugom ELISA testu koji koristi ES L1 ili sirovi antigen, budu detektovane. Ista monoklonska antitela (7C2C5) korišćena su i ranije za razvoj dijagnostičkih testova, Gamble i saradnici (1984) primenili su 7C2C5 antitela za afinitivno izolovanje specifičnih antigena iz sastava sirovog ekstrakta za primenu u indirektnom ELISA modelu, ali i kao komponentu kompetitivnog ELISA testa namenjenog detekciji infekcije svinja. Testovi su ispitani na ograničenom broju uzoraka prirodno i eksperimentalno inficiranih domaćih svinja. Važno je pomenuti da *Trichinella* c-ELISA test, čiji je razvoj prikazan u ovom radu, predstavlja unapređenu formu prethodno pomenutog kompetitivnog ELISA testa (Gamble i Graham,

1984), koja podrazumeva manji broj inkubacija kao i kraće vreme izvođenja. Takođe, *Trichinella* c-ELISA test validiran je primenom adekvatnog broja uzoraka (Jacobson, 1988), a primenljivost testa pokazana je za više vrsta domaćina (ljudi, domaćih i divljih svinja i konja). Od niza do sada pripremljenih monoklonskih antitela koja prepoznaju razne antigene *Trichinella* (Ortega Pierres G i sar, 1996; Yepez-Mulia L. i sar., 2007) do sada su samo dva monoklonska antitela i ranije korišćena za razvoj imunodijagnostičkih testova na principu kompeticije, ali nisu primenjena u praksi (Ivanoska D. i sar 1989).

Trichinella c-ELISA se jednostavno izvodi, cela procedura za izvođenje testa traje 45 minuta, test je konstruisan tako da postoji samo jedan korak inkubacije, te su i mogućnosti za pravljenje manipulativnih grešaka svedene na minimum (Gnjatovic i sar., 2017.). Prednost šire primene *Trichinella* c-ELISA testa u odnosu na komercijalno dostupne indirektno ELISA formate namenjene detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela, sa dva obavezna koraka inkubacije, i vremenom potrebnim za izvođenje testa od oko 2 h za najveći broj takvih testova, očigledna je.

U postupku validacije dijagnostičkih testova jedan od najznačajnijih koraka jeste definisanje cut-off vrednosti testa, a rezultati su jasno pokazali da ta vrednost može biti zajednička za više vrsta domaćina. Tako su naša ispitivanja na 180 seruma ljudi i 115 seruma svinja rezultirala definisanjem vrednosti cut-off-a od 19,4% PI za detekciju humane trihineloze i 19,3% PI za detekciju infekcije domaćih svinja te je zaključeno da se može usvojiti jedinstvena cut-off vrednost (podešena na 19,4%) primenljiva u detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela u serumima ljudi i svinja. Ovako definisana cut-off vrednost omogućila je da se jasno razlikuju pozitivni od negativnih seruma i da se test odlikuje visokim stepenom pouzdanosti, specifičnosti i senzitivnosti. Validacija ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela urađena primenom statistički relevantnog broja uzoraka (Jacobson, 1988), po prvi put je izvedena od strane Gomez-Morales i saradnika (2008), za test namenjen detekciji infekcije ljudi. *Trichinella* c-ELISA test prikazan u ovom radu, drugi je primer validacije testa urađene na adekvatnom broju uzoraka prikazan u literaturi, a prvi koji pokazuje slučaj definisanja jedinstvene cut-off vrednosti primenljive za više vrsta domaćina kojima je test namenjen (ljudi i svinje) (Gnjatović i sar., 2017).

Analizom negativnih seruma konja (n=55), odnosno definisanjem cut-off vrednosti korišćenjem statističke metode određivanja (srednja vrednost PI za sve negativne serume +3 SD) usled nepostojanja dovoljnog broja prirodno inficiranih seruma konja potrebnih za ROC

analizu, dobijena je cut-off vrednost od 20.4% (9.4 % \pm 3x3.4 (SD)), što podržava pretpostavku da se jedinstvena cut-off vrednost može koristiti za proširenu paletu domaćina.

Infekcija konja parazitima iz roda *Trichinella* relativno je retka u prirodi, a nešto se češće javlja u onim regionima u kojima je zastupljenost ove infekcije kod svinja veća (Boireau i sar., 2000). U literaturi je prikazan značajan broj studija u kojima je analizirana biologija i epidemiologija infekcije sa *Trichinella spp.* ovog atipičnog domaćina (Soule i sar., 1989; Pozio i sar., 1999; Murrell i sar., 2004), dok se deo istraživanja odnosio na ispitivanje primenljivosti postojećih seroloških testova za detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela u serumima konja (Pozio i sar., 2002; Sofronic-Milosavljevic i sar., 2005). Iako konji razvijaju antitelni odgovor sličan drugim vrstama domaćina, uočeno je da *Trichinella*-specifična antitela u većini slučajeva postaju detektibilna već nakon 2 nedelje nakon infekcije, ali iz cirkulacije nestaju brže nego kod dugih vrsta domaćina i postaju nedetektibilna nakon 15-30 nedelje p.i., merena primenom različitih seroloških metoda poput VB, IFA i ELISA testa (Soule i sar., 1989; Voigt i sar., 1998; Pozio i sar., 2002; Hill i sar., 2007). Danas se smatra da je nizak nivo detekcije antitela u kasnijoj fazi infekcije kod konja posledica prirode antitelnog odgovora kod ove vrste domaćina, a ne formata primenjenih testova, s obzirom da ovi testovi uspešno detektuju prisustvo antitela kod svinja dugo, a kod ljudi čak godinama/decenijama nakon infekcije (Nockler i sar., 1995; Kapel i Gamble, 2000; Bruschi i sar., 2005). Rizik od prenosa infekcije na ljude postoji ako se dijagnostika osloni na serološki nalaz iz razloga što mišićne larve u muskulaturi konja opstaju u infektivnoj formi duži period u odnosu na dužinu trajanja detektabilnog antitelnog odgovora. Hill i sar. (2007) su praćenjem eksperimentalno inficiranih konja godinu dana nakon infekcije zaključili da su do kraja perioda praćenja larve bile prisutne u muskulaturi konja i da prisustvo antitela nije uticalo na smanjenje broja larvi u muskulaturi domaćina. Zbog svega navedenog, OIE ne preporučuje korišćenje seroloških metoda za detekciju infekcije konja, već isključivo primenu direktnih metoda. Ipak smatramo da bi bilo interesanto da c-ELISA zbog svojih karakteristika bude validirana na velikom broju seruma konja i ispitana u svrhe epizootioloških istraživanja.

Nizak nivo specifičnosti testova glavni je problem u imunodijagnostici oboljenja izazvanih nematodama. Specifičnost *Trichinella* c-ELISA testa određena je ispitivanjem potencijalno unakrsno reaktivnih humanih seruma koji sadrže autoantitela ili antitela usmerena prema drugim parazitima, uključujući druge nematode, kao i seruma svinja inficiranih drugim vrstama parazita. Pokazano je da isti serumi pacijenata koji sadrže različite vrste autoantitela, a koji su u ranijim ispitivanjima od strane Radovic i saradnici (2012) dali

lažno pozitivne rezultate u VB testu (reagovali sa više proteinskih traka ES L1 Ag) i *Trichinella* i-ELISA, nisu reagovali u *Trichinella* c-ELISA testu. Takođe, serumi pacijenata sa drugim parazitozama, izabranim iz razloga što su endemske prirode (uzročnik - *E. granulosus*), izazvane visoko prevalentnim uzročnikom (*T. gondii*) ili prisutne u Srbiji (uzročnik *T. canis*) (Djurkovic i sar., 2010; Debeljak i sar., 2016; Gabrielli i sar., 2017) indentifikovani su kao negativni u *Trichinella* c-ELISA testu. Reaktivnost humanih seruma inficiranih istim vrstama nematoda u *Trichinella* i-ELISA testu ispitana je od strane Gomez-Morales i sar. (2008), pa su *Echinococcus granulosus*-pozitivni serumi dali lažno pozitivan rezultat u 20% slučajeva (3/15 seruma), *Toxoplasma gondii* –pozitivni serumi u 24% slučajeva (8/33 seruma) a *Toxocara sp*-pozitivni serumi u 8% slučajeva (6/68 seruma). Serumi svinja izabrani za analizu analitičke specifičnosti testa dobijeni su ljubaznošću dr Maria Angeles-Gomes Morales (Istituto superiore di Sanita, Rome, It), a kriterijum za izbor predstavljala je reaktivnost ovih seruma u *Trichinella* i-ELISA testu (*Ascaris suum* (n=2), *Hyostrongylus rubidus* (n=1), *Trichuris suis* (n=4), *Oesophagostomum dentatum* (n=1), mešovite parazitarne infekcije: *Trichuris suis*, *Oesophagostomum dentatum*, *Eimeria spp* (n=2)). Maksimalna vrednost PI dobijena u *Trichinella* c-ELISA tesu u ovoj grupi uzoraka bila je 17% (serum svinje inficirane parazitom *Ascaris suum*). Na osnovu poredjenja rezultata dobijenih u INEPu i na ISS zaključeno je da je specifičnost *Trichinella* c-ELISA testa, baziranog na primeni 7C2C5 mAt, značajno veća u odnosu na indirektni format ELISA testa (poredjenje „in house“ testova iz ISS i iz INEPa).

Dijagnostički prozor koji se javlja prilikom detekcije različitih infektivnih oboljenja, posledica je kako vremena potrebnog da se specifična antitela sintetišu u organizmu domaćina kao odgovor na prisustvo infektivnog agensa, tako i usled niske senzitivnosti testova, odnosno nemogućnosti testova da detektuju niske koncentracije različitih klasa specifičnih antitela koje se na početku infekcije potencijalno mogu javiti. U ovde prikazanim istraživanjima pozitivan nalaz antitela u *Trichinella* c-ELISA testu dobijen je za pet seruma uzorkovanih u periodu 3-4 nedelje nakon konzumiranja mesa (rana akutna faza infekcije) koji su bili identifikovani kao *Trichinella*-negativni u i-ELISA i IFA testu, što ukazuje na povećanu osetljivost c-ELISA testa u odnosu na druge dve metode. Niska specifičnost testova za detekciju infekcije sa *Trichinella spp.* u početnoj fazi infekcije može imati negativne efekte na tok lečenja humane trihineloze. Ispitivanje senzitivnosti ELISA testova namenjenih detekciji *Trichinella*-specifičnih antitela u početnim fazama infekcije, nije nimalo jednostavan zadatak zato što su početni znaci trhineloze slični simptomima poremećaja rada

crevnog trakta (muka, povraćanje, dijareja) i analiza seruma tada obično nije usmerena na traganje za antitelima protiv parazita. Ovakvi serumi se veoma retko uzorkuju, s obzirom na činjenicu da se pacijenti inficirani sa *Trichinella spp.* javljaju u bolnicu tek nakon pojave simptoma koji bude sumnju na trihinelozu (otok lica, osip, temperatura i naročito bolovi u mišićima), što je najčešće nakon 4-6 nedelja nakon infekcije. Broj seruma dobijenih u nekom ranijem periodu p.i. ograničen je na slučajeve iz epidemija i koji su došli na kontrolu bez pojave sptoma ili sa blagim simptomima, a samo usled saznanja da je meso koje su potencijalno ili sigurno konzumirali inficirano larvama *Trichinella spp.*

U poređenju sa i-ELISA testom za detekciju *Trichinella* specifičnih antitela koji pre svega detektuje IgG klasu specifičnih antitela, veća osetljivost c-ELISA testa može se objasniti mogućnošću ovog testa da detektuje sve klase i subklase antitela koje se u početnim fazama infekcije potencijalno mogu javiti (ne samo IgG). Poznato je da se tokom akutne faze humane infekcije u većim slučajevima javlja povišeni nivo specifičnih IgE antitela (Bruschi i sar, 1990; Dević i sar, 2014). Pored IgE, IgA i IgM antitela takođe mogu biti prisutna u ovoj fazi, dok se IgG antitela najčešće detektuju u periodu od 12 do 60 dana nakon infekcije zavisno od broja unetih larvi tj. doze infekcije, a u organizmu mogu opstati i do 30 godina (Van Knapen i sar., 1982;. Bruschi i Murrell, 2002). Za dijagnozu trihineloze rano otkrivanje specifičnih antitela je od ključnog značaja za pacijente, jer svako kašnjenje u započinjanju lečenja favorizuje formiranje larvi u mišićnom tkivu (Bruschi i Murrell, 2002).

Praćenje senzitivnosti c-ELISA testa za detekciju infekcije kod svinja u početnim fazama infekcije omogućeno je korišćenjem seruma eksperimentalno inficiranih životinja, inficiranih različitim dozama infekcije (300, 500 i 10000 ML/kg). Rezultati su pokazali veću senzitivnost c-ELISA testa u odnosu na i-ELISA test za sve ispitivane doze infekcije u 21. danu praćenja (Tabela 7), pri čemu je za dozu od 1000 ML/g primenom c-ELISE postignuto 100% senzitivnosti već u tom period, dok je senzitivnost i-ELISA testa bila svega 33%. Nakon 4 nedelje p.i., c-ELISA test postiže 100% specifičnosti za sve doze infekcije. Primenom sličnih doza infekcije, Gamble (1996) je uočio da su kod tri grupe eksperimentalno inficiranih svinja (sa dozama infekcije od 2500, 500 i 100 ML *T. spiralis*), specifična IgG antitela postala detektabilna 28, 28-35, 35- 49 dana nakon infekcije, respektivno, primenom i-ELISA testa zasnovanog na upotrebi ES L1 Ag *T. spiralis*. Nockler i saradnici (2005) su još jednom pokazali da vreme serokonverzije nastale kao odgovor na eksperimentalnu infekciju svinja, zavisi upravo od primenjene doze infekcije i to tako što su specifična IgG antitela bila detektovana 40, 40 i 25 dana nakon infekcije za doze od 200, 1000 i 20000 ML *T. spiralis*/kg,

takođe primenom ES L1 i-ELISA testa. Korišćenjem komercijalno dostupnog ELISA testa (PrioCHECK *Trichinella* Ab), Gondek i saradnici (2017) su uočili detektabilan novo IgG antitela specifičnih prema *T. spiralis* u periodu od 27-30 dana nakon infekcije, u slučaju korišćenja 300 ML *T. spiralis*/kg za izvođenje eksperimentalne infekcije.

Kod životinja, kada se radi o ispitivanju raširenosti infekcije takodje je važno znati da se najčešće detektuju antitela IgG klase (Gamble, 1996; Gamble i sar., 2004; Gottstein i sar., 2009), dok se kod konja radi o posebnom problemu. Veća senzitivnost c-ELISA testa u odnosu na i-ELISA test ponovo može biti objašnjena nazavisnošću u detekciji c-ELISA testa od klase/subklase specifičnih antitela koja nastaju kao odgovor na infekciju domaćina. Prisustvo najmanje četiri podklase IgG antitela (IgGa, IgGb, IgGc i IgG (T) i pet drugih izotipova (10Sg1, IgM, IgA, IGB i IgE) kojima antitela u serumima konja mogu pripadati, prepoznato je kao značajana prepreka u detekciji primenom klasičnog i-ELISA testa u kome interpretacija rezultata zavisi od primenjene vrste sekundarnih antitela, najčešće su to anti-konjska IgG antitela (Sugiura i sar, 1998; Marti i sar, 2003).

Pokazano je i da je c-ELISA test primenljiv u detekciji infekcije izazvane sa *Trichinella britovi*. Navedena vrsta *Trichinella* po prvi put je dokazana (primenom PCR metode) kao uzročnik humane trihineloze u Srbiji nastale kao posledica konzumiranja mesa divljih svinja zaraženih sa *T. britovi*. Epidemija se dogodila u januaru 2016. g u opštini Čajetina, obuhvatila je 111 osoba, a uzrok zaraze su bile mesne prerađevine dobijene od mesa divljih svinja. Identifikacija vrste urađena je u NRLT, INEP, 2017. WB analizom 20 seruma iz pomenute epidemije, utvrđeno je da svi uzorci daju karakterističnu reakciju sa ES L1 Ag *T. spiralis*, takozvani triplet (45, 49 i 53 kDa). Test inhibicije sa pulom pomenutih seruma, odnosno sa antitelima usmerenim prema *T. britovi* dokazao je da antitela prepoznaju isti epitop kao i monoklonska antitela. Ovi nalazi idu u prilog ranijim nalazima publikovanim od strane Gamble i saradnika (1984) da su monoklonska 7C2C5 antitela specifična prema epitopu koji je karakterističan za čitav rod *Trichinella* (pokazano za sve vrste osim *T. britovi*).

Rezultat kojim je ostvaren jedan od ciljeva doktorske disertacije je kreiranje pouzdanog "Capture" *Trichinella* IgE ELISA testa za otkrivanje specifičnih antitela IgE klase protiv *Trichinella spp* u humanim serumima.

Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgG antitela u humanim serumima predstavlja dokaz postojanja infekcije ali ne ukazuje na činjenicu kada je ta infekcija nastala tj. ukazuje na to da je pacijent u nekom periodu svog života bio inficiran ovim parazitom (Froscher i sar., 1988).

Hroničnu fazu infekcije nije moguće razlikovati od akutne faze infekcije samo na osnovu prisustva IgG specifičnih antitela (Calcagno i sar. 2017). Poznato je da je kod značajnog broja inficiranih ljudi klinička slika u akutnoj fazi infekcije blaga ili čak potpuno izostaje. Određeni simptomi, kada su jako izraženi tokom akutne faze infekcije zahtevaju hospitalizaciju, ali već tokom prva 3 meseca postaju blaži ili čak potpuno nestaju (nakon 6 do 12 meseci). Hronična faza infekcije traje sve dok u organizmu parazit opstaje tj. od nekoliko do 30 god (Dupouy-Camet and Bruschi, 2007). Za uspostavljanje adekvatne dijagnoze, praćenje toka bolesti i prognozu bolesti od velikog je značaja definisanje faze infekcije u kojoj se pacijent nalazi. Istraživanje markera akutne faze infekcije, odnosno markera koji bi razlikovali akutnu od hronične faze, kao i ispitivanje antigena koji bi se u ELISA testovima koristili za ranu detekciju infekcije obuhvaćeno je većim brojem istraživanja (Calcagno i sar., 2017.) ali do većih pomaka na polju imunodijagnostike rane faze infekcije nije došlo. Neki autori su objavili da se IgE specifična antitela sintetišu pre svega tokom rane faze infekcije, dok se tokom vremena koncentracija ovih antitela značajno smanjuje i u serumima domaćina opstaje detektabilna najviše godinu dana p.i. (Murrell i Bruschi, 1994). Sa druge strane, Calcagno i sar. (2017) su pokazali da ne postoji značajna razlika u distribuciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u ranoj i kasnoj fazi infekcije, U ranoj fazi infekcije iznosila je 94% dok je u kasnoj fazi ovaj procenat iznosio 92%. Navedeni nalazi ustanovljeni su primenom tehnike imunoelektrotransfer blota. Očigledno je da jasnih zaključaka na ovu temu nema, a jedan od glavnih razloga dobijanja kontradiktornih rezultata jeste primena nepouzdatih testova, pa čak i apsolutno neprihvatljivih za detekciju parazit-specifičnih IgE antitela. Iz istog razloga, uloga parazit specifičnih - IgE i IgG4 antitela u odbrani domaćina ostaje nerazjašnjena (Maizels i Yazdanbakhsh, 2003; Turner i sar. 2005; Adjobimey i Hoerauf, 2010).

Da bi smo razjasnili dileme na ovom polju primenili smo dva pristupa u rešavanju problema detekcije specifičnih IgE antitela. Naime, pre rada na kreiranju novog "capture" ELISA testa za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u serumima pacijenata, ispitali smo mogućnost primene do sada najčešće korišćenih pristupa.

U našem radu je prvo potvrđeno da pojačani indirektni ELISA test sa ES L1 antigenom nije pogodan za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela jer je distinkcija između pozitivnih i negativnih nalaza u testu bila mala. Specifična IgE antitela bila su detektovana u 65% uzoraka seruma obolelih pacijenata kada su u indirektnom ELISA testu korišćeni netretirani uzorci seruma, a raspon izmerenih OD vrenosti bio je 0.111-0.450. Pojačana indirektna ELISA, kao jedan od najčešće korišćenih metoda detekcije parazit-

specifičnih IgE antitela (Bruschi i sar., 1990; Watanabe i sar., 2005), u određenoj meri rešava problem detekcije veoma niskih koncentracija specifičnih IgE antitela u serumima, ali ne rešava problem interferencije uzrokovane prisustvom koncentracijski dominantnijih klasa specifičnih antitela (IgG). Detekcija parazit-specifičnih IgE antitela u velikoj meri je otežana činjenicom da je koncentracija ovih antitela u serumima pacijenata dosta niska, i da je udeo ovih antitela u odnosu na druge klase parazit specifičnih antitela, pre svega IgG, zanemarljiv. Mada u literaturi nisu prikazani precizni podaci o nivou kompeticije uzrokovane koncentracijski zastupljenijom klasom specifičnih IgG antitela u slučaju detekcije *Trichinella*-specifičnih IgE antitela primenom indirektnog ELISA testa, postaje podaci dobijeni kod drugih vrsta parazita. Tako je utvrđeno da je u serumima *Schistosoma*-inficiranih pacijenata, vezivanje više od 90% parazit-specifičnih IgE antitela inhibirano parazit specifičnim IgG antitelima kada se merenje vrši primenom klasičnog indirektnog IgE ELISA testa (Rihet i sar., 1991).

Uklanjanjem IgG antitela iz uzoraka seruma primenom različitih vrsta absorbenata, uz primenu klasičnog ili pojačanog indirektnog ELISA testa za detekciju parazit-specifičnih IgE antitela u tako tretiranim serumima, predstavlja jedan od najčešće korišćenih pristupa rešenju problema kompeticije opisanih u literaturi (Estambale i sar., 1995; Kurniawan i sar., 1995; Mamuni i sar., 2010). U radu je pokazano da je primena RF absorbenta (anti humana IgG antitela, INEP, Srbija), koncentracijski optimizovanih za ovu namenu, uz primenu gore opisanog pojačanog indirektnog ELISA testa za detekciju *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u tako tretiranim serumima, broj pozitivnih nalaza u testu povećan na 87.5%, sa rasponom izmerenih OD vrednosti od 0.112-0.824. Međutim, kontrola kvaliteta poslednjeg testa u prvi plan iznosi problem reproducibilnosti testa. Naime, iako je dokazan visok nivo kvaliteta RF absorbenta, u smislu efikasnosti uklanjanja serumskih IgG antitela kao i ponovljivosti dobijenih rezultata u različitim tretmanima, kada se takvi serumi koriste u i-ELISA testu dobijaju se nekonzistentni rezultati (varijacije u inter- i intra-assay ispitivanjima za određene uzorke bile su i do 16%). Navedene vrednosti varijacija dobijene u ovom testu pripadaju zoni dopuštenih grešaka (Jacobson, 1998), ali se ipak, bazirano na iskustvu SrNLRT u razvoju i korišćenju dijagnostičkih testova, smatraju nedovoljno tačnim za pouzdanu upotrebu. Uzrok lošoj reproducibilnosti testova koji koriste RF tretirane serume, verovatno leži u činjenici da se prilikom uklanjanja IgG klase antitela iz seruma, uklanja i određena količina IgE antitela koja se potencijalno mogu naći u kompleksima sa IgG klasom. Primena protein A i protein G- sefarnih kolona za uklanjanje IgG antitela (Estambale i sar., 1995; Kurniawan i sar.,

1995; Mamuni i sar., 2010), komplikovana je i vremenski zahtevna tehnika, posebno kada se analizira veliki broj uzoraka. Lakši i brži način uklanjanja IgG interferirajućih antitela prikazan u literaturi predstavlja korišćenje protein A i protein G agaroznih zrnaca u Ependorf tubama (Jaoko i sar., 2001), kao i korišćenje različitih komercijalno dostupnih IgG absorbenata - RF absorbenata, koji su se pokazali nedovoljno efikasnim u uklanjanju IgG antitela prisutnih u ispitujućim serumima (Ajax i sar., 1998; Souza-Atta i sar., 1999).

U radu je dat i potpuno novi pristup u detekciji parazit specifičnih IgE antitela - Capture *Trichinella* IgE ELISA test. Baziran je na primeni dva para monoklonskih antitela, anti humanih IgE antitela i 7C2C5 anti *Trichinella* monoklonskih antitela. U i-ELISA formatu, antigen na čvrstoj fazi vezuje specifična antitela svih izotipova u koncentraciji proporcionalnoj ukupnoj koncentraciji u serumu. U Capture IgE ELISA formatu, za površinu mikrotitracionih ploča vezana su monoklonska anti-humana IgE antitela koja u reakciji sa uzorcima seruma vezuju IgE antitela (ukupna, specifična i nespecifična antitela) iz seruma u koncentraciji proporcionalnoj ukupnoj koncentraciji u serumu, dok se sve druge klase antitela iz sistema uklanjaju ispiranjem. U ovom koraku dolazi do uklanjanja i svih potencijalno interferirajućih parazit-specifičnih antitela. Detekcija *Trichinella* specifičnih IgE antitela vršena je primenom kompleksa ES L1 Ag i mAt 7C2C5 (7C2C5 mAt - HRP). Obeležavanjem mAt 7C2C5 (petovalentnih molekula IgM prirode) peroksidazom iz rena i korišćenjem ovog konjugata u capture ELISA testu, postiže se amplifikacija signala koji je za detekciju, često veoma niskih koncentracija, specifičnih IgE antitela neophodna. Dobijeni rezultati ukazuju na veliku pouzdanost testa u detekciji *Trichinella* specifičnih IgE antitela u humanim serumima. Na osnovu ROC analize i usvojene cut-off vrednosti (0.185 OD), postignute su dijagnostička senzitivnost i specifičnost testa od 97.6% i 97.5%, respektivno. Nijedan od korišćenih seruma za definisanje analitičke specifičnosti testa nije dao lažno pozitivan rezultat u testu (analitička specifičnost testa iznosila je 100%). Pored analize seruma pacijenata sa različitim alergijskim poremećajima koji sa sobom nose povećani nivo ukupnih IgE antitela, ispitan je uticaj različitih, tačno definisanih koncentracija IgE antitela (raspon koncentracija 0-180 kIU/l – kontrolni serum, INEP, Srbija). Ispitane koncentracije IgE antitela u testiranim uzorcima nisu imale uticaj na rezultat testa. Može se zaključiti da ovde prikazan Capture *Trichinella* IgE ELISA test predstavlja pouzdanu metodu za detekciju i praćenje nivoa specifičnih IgE antitela u serumima.

Primena 7C2C5 monoklonskog antitela omogućila je ostvarivanje važnog cilja ove teze, a to je izolacija i karakterizacija imunokompetentnosti proteina koje ova

monoklonska antitela prepoznaju – tzv. 7C2C5 Ag, sa ciljem da se definiše uloga navedenih proteina u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora na modelu humanih dendritskih ćelija *in-vitro*.

Kao što se iz ovde prikazanih rezultata vidi, nakon uspešnog kloniranja 7C2C5 hibridoma, aplikovanja miševima i izolacije ascita, monoklonska antitela su prečišćena i uspešno upotrebljena za afinitivno izolovanje tri komponente (triplet 45, 49 i 53 kDa) iz sastava ES L1 Ag. Sposobnost 7C2C5 mAb da prepozna navedene komponente ES L1 antigena bila je ranije pokazana i od strane drugih autora (Gamble i Graham, 1984; Ilic i sar., 2014). Antigeni koje smo označili kao 7C2C5 Ag sadrže imunodominantni epitop odgovoran za stvaranje protektivnih antitela u serumima inficiranih domaćina (Appleton i sar., 1991, Gnjatovic i sar., 2017). Navedeni epitop je u svim fazama infekcije ljudi, svinja i konja (dokazano praćenjem eksperimentalno inficiranih životinja) prepoznat od strane različitih klasa serumskih *Trichinella*-specifičnih antitela. Pretpostavilo se da kao takav, 7C2C5 Ag može biti odgovoran i za pokretanje i usmeravanje imunskog odgovora domaćina.

Naša dosadašnja ispitivanja imunomodulatornih funkcija 7C2C5 Ag na animalnom modelu ukazala su da ove komponente ES L1 antigena imaju potencijal da pokrenu usmeravanje imunskog odgovora u istom pravcu kao i ukupni produkti mišićnih larvi (Cvetković i sar. 2016). Na modelu DA pacova ustanovljeno je da 7C2C5Ag pokreće vrlo sličan nivo ekspresije površinskih molekula na DĆ (MHC II, CD86 i CAM-1) značajnih za interakciju sa T limfocitima, kao i ES L1 antigen. Produkcija citokina koji definišu funkciju DĆ (IL-12p70, IL-10 i TGF- β) bila je na sličnom nivou za obe vrste primenjenih antigena.

Kako se novi pristupi u kreiranju terapije namenjene lečenju inflamatornih bolesti baziraju na ćelijama koje bi ispoljavale anti-zapaljensko dejstvo, bilo je neophodno iskustva i znanja stečena na animalnim modelima proveriti u *in vitro* uslovima i to na ćelijama humanog porekla. Značaj ovde prikazanih istraživanja je u tome što je u ovom radu, po prvi put pokazano kakav je uticaj pojedinačnih komponenti produkata helmintskih antigena na humane dendritske ćelije.

Stimulacija DĆ izolovanih iz periferne krvi zdravih ljudi (dobrovoljnih davalaca) sa ES L1 Ag *T. spiralis* i 7C2C5 Ag rezultirala je nepotpunim sazrevanjem DĆ koje se karakteriše niskom ekspresijom CD83, CD86 i HLA DR molekula, kao i značajnom ekspresijom CD40. U humanom modelu visoka ekspresija molekula CD83 se smatra jasnom potvrdom pune zrelosti DĆ koja ukazuje na dobru spremnost imunskog odgovora organizma da odgovori na infekcije virusima i bakterijama. Nizak nivo ekspresije CD83 koji se javlja

kao posledica infekcija sa helmintima ukazuje na veliku sposobnost parazita da “gase” zapaljenje na mestu gde se zadržavaju u domaćinu. Donekle veći potencijal 7C2C5 Ag da utiče na DĆ da eksprimiraju HLA DR molekule, u odnosu na potencijal ES L1 Ag, ukazuje na značaj ovih komponenti iz sastava ukupnog ES L1 Ag u polarizaciji imunskog odgovora na način koji je karakterističan za infekciju sa *T. spiralis*, a takodje ukazuje da 7C2C5 Ag posledično mogu da deluju i na T limfocite i usmere ih ka anti-zapaljenskom tipu odgovora.

Rezultati dobijeni ispitivanjem funkcionalnih karakteristika humanih DĆ pokazali su da 7C2C5 Ag slično ES L1 Ag, indukuje značajno veću produkciju citokina IL-10 (odgovornog za imunosupresiju zapaljenskih reakcija) u odnosu na negativnu kontrolu, dok je produkcija pro-inflamatornog citokina IL-12 potpuno suprimirana u odnosu na pozitivnu kontrolu. Za razliku od rezultata dobijenih na animalnom modelu gde je pod dejstvom oba navedena antigena *Trichinella* došlo do povećane produkcije anti-inflamatornog citokina TGF- β (odgovornog i za stimulaciju proliferacije Treg) u humanom *in vitro* modelu nije detektovana produkcija TGF- β . Ovde je bitno istaći da se po svim opisanim karakteristikama ćelije stimulirane 7C2C5 Ag mogu svrstati u grupu tolerogenih DĆ (tolDĆ), što će biti predmet naših daljih istraživanja. Takodje, ovakvi rezultati ilustruju zašto se otkrića dobijena na animalnim modelima ne mogu preslikati na humani model i ukazuju na neophodnost *in vitro* ispitivanja DĆ kako kod zdravih ljudi tako i onih sa autoimunskim bolestima radi boljeg predviđanja efekata potencijalne terapije sa tolDĆ kod ljudi.

U radu je po prvi put pokazano da imunodominantne komponente ES L1 Ag, označene kao 7C2C5 Ag, poseduju potencijal za generisanje humanih tolerogenih DĆ *in vitro*.

Od početka 21. veka, brojni rezultati dobijeni na animalnim modelima potvrđuju da DĆ mogu biti tretirane na taj način da razviju tolerogene osobine, i da kao takve mogu uticati na ublažavanje autoimunskih bolesti (Terrazas i sar., 2010; Anderson i sar., 2017). Pokazano je da ovakve ćelije imaju fenotip nezrelih ili poluzrelih ćelija, da proizvode niske koncentracije pro-inflamatornih (IL-12), i povećanu produkciju anti-inflamatornih citokina (TGF-beta, IL-10), i poseduju mogućnost da prezentuju antigene u tolerogenoj formi i kapacitet da indukuju T ćelije regulatornog tipa (Treg). Danas se smatra da tolerogene DĆ predstavljaju potencijalnu ćelijsku terapiju primenljivu u tretmanu autoimunskih bolesti, hroničnih inflamacija i transplatacione terapije (Raker i sar., 2015). Dobro je poznato da parazitski antigeni modulišu imunski odgovor preko DĆ, indukujući Th2 i regulatorni

odgovor dok u isto vreme inhibiraju Th1 i Th17 odgovor (White i Artavanis-Tsakonas, 2012), a neki od ispitivanih antigena parazita pokazuju kapacitet da indukuju tolerogeni DC fenotip (Terezias i sar., 2011; Klaver i sar., 2015). Tolerogene DC dobijene tretiranjem ES L1 Ag, primenjene u animalnom modelu multiple skleroze, dovele su do ublažavanja toka EAE (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2015).

Ranije studije na animalnim modelima su pokazale da Th2 i regulatorni tip odgovora, koji se razvija tokom hronične faze infekcije uzrokovane parazitom *T. spiralis*, može značajno ublažiti Th1/Th17-indukovanog EAE (Sofronic-Milosavljevic i sar., 2013; Radovic i sar., 2015), experimentalnog kolitisa (Cho i sar., 2012; Ashour i sar., 2013) i dijabetesa tipa 1 (Saunders i sar., 2007). Može se pretpostaviti da bi definisanje pojedinačnih komponenta iz sastava ES L1 Ag koje poseduju imunomodlatorna svojstva predstavljalo korak dalje u kreiranju terapije namenjene lečenju inflamatornih bolesti. Zato su istraživanja u ovom radu bila usmerena pre svega na utvrđivanje potencijala 7C2C5 Ag (izolovanog iz ES L1 Ag primenom 7C2C5 antitela) za pokretanje imunskog odgovora domaćina (sazrevanje DC).

6. ZAKLJUČAK

- *Trichinella* c-ELISA test dobijen je upotrebom 7C2C5 monoklonskog antitela u inovativnom kompetitivnom ELISA modelu razvijenom za potrebe detekcije *Trichinella*-specifičnih antitela. Dobijen je test značajno povećane specifičnosti (100%) i senzitivnosti (100%) u odnosu na sve postojeće ELISA testove koji imaju istu namenu.

- Ovako konstruisan *Trichinella* c-ELISA test, jedini je univerzalan test namenjen detekciji infekcije sa *Trichinella* spp, koji omogućava detekciju specifičnih antitela u serumima ljudi ili različitih vrsta životinja (svinje, konji, divlje svinje) primenom istih komponenti testa, protokola i dijagnostičkih parametara testa. Definisana jedinstvena cut-off vrednost testa za sve ispitivane vrste domaćina iznosi 19.4%.

- *Trichinella* c-ELISA test je u ispitivanim serumima uspešno detektovao prisustvo antitela protiv 3 vrste *Trichinella*: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*.

- *Trichinella* c-ELISA test je lak za primenu (u jednom koraku ili jedan korak inkubacije) i brzo se izvodi (za samo 45 min te zahteva kraće vreme u odnosu na bilo koji drugi format ELISA testa).

- *Trichinella*-specific IgE “Capture” ELISA test je novi pristup rešenju problema detekcije parazit-specifičnih IgE antitela s obzirom da omogućava potpuno pouzdano praćenje koncentracije specifičnih IgE antitela u serumima pacijenata, sa senzitivnošću (97.6%) i specifičnošću testa (97.5%) većom u odnosu na sve do sada prikazane metode detekcije.

- Korišćenjem *Trichinella*-specific IgE “Capture” ELISA testa u praksi bilo bi omogućeno sagledavanje dijagnostičkog značaja detekcije *Trichinella*-specifičnih IgE antitela, kao potencijalnog markera akutne faze infekcije.

- Kroz razvoj “Capture” *Trichinella* IgE ELISA testa prikazan je potpuno novi pristup rešenju problema kompeticije izazvane prisustvom koncentracijski zastupljenijih klasa specifičnih antitela u serumima pacijenta, a koji može biti iskorišćen za razvoj ELISA testova namenjenih detekciji drugih vrsta parazit-specifičnih antitela u serumima ljudi i različitih vrsta životinja.

- 7C2C5 Ag je uspešno izolovan korišćenjem istoimenih monoklonskih antitela i pokazano je da se u njegovom sastavu nalazi triplet molekula čija je molekulska masa 45, 49 i 53 kDa.

- Izvršeno ispitivanje uloge 7C2C5 Ag u pokretanju i usmeravanju imunskog odgovora na modelu humanih dendritskih ćelija *in-vitro* pokazalo je da ovi antigeni poseduju kapacitet da indukuju diferencijaciju delimično zrelih dendritskih ćelija koje se karakterišu slabom ekspresijom HLA-DR I CD83, umerenom ekspresijom CD86 i izrazitom ekspresijom CD40.

- Efekat 7C2C5 Ag na funkciju DC sličan je ES L1 Ag, u smislu smanjene produkcije pro-inflamatornog citokina IL-12p70 i povećane produkcije anti-inflamatornog citokina IL-10.

Literatura:

1. Adjobimey T., Hoerauf A. (2010) Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. *Ann Trop Med Parasitol.* 104:455–464.
2. Allen J.E., Maizels R.M. (2011) Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev. Immunol.* 11:375–88.
3. Appleton J.A., Bell G.R., Homan W. and van Knapen F. (1991) Concensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today.* 7:190-192.
4. Ashour D., Othman A., Shareef M., Gaballah H., Mayah W. (2013) Interactions between *Trichinella spiralis* infection and induced colitis in mice. *J. Helminthol.* 88: 210–218.
5. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Li Y., Pulendra B., Palucka K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
6. Beiting D., Bliss S., Schlafer D., Roberts V., Appleton J. (2004) Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 72(6):3129-3137.
7. Bien J., Näreaho A., Varmanen P., Gozdzik K., Moskwa B., Cabaj W., Nyman T., Savijoki K. (2012) Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional difference gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteome. Sci.* 10:10.
8. Boireau P., Vallee I., Roman T., Perret C., Mingyuan L., Gamble H.R., Gajadhar A. (2000) *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.* 93:309–320.
9. Boireau, P., Vayssier, M., Fabien, J., Perret, C., Calamel, M. and Soule, C. (1997) Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitol.* 115:641-651.
10. Bolas-Fernandez F., Corral Bezara L. (2006) TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res. Vet. Sci.* 81(3):297-303.
11. Bruschi F., Moretti A., Wassom D., Piergili Fioretti D. (2001) The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite* 8:S141–S143.
12. Bruschi F., Murell K.D. (2002) New aspect of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad. Med. J.* 78: 15-22.
13. Bruschi F., Tassi C., Pozio E. (1990) Parasite-specific antibody response in *Trichinella* sp. 3 human infection: a one year follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43:186-193.
14. Bruschi, F. (2002) The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. Current drug targets. *Immune, endocrine and metabolic disorders.* 2(3):269-280.
15. Bruschi, F., Chiumiento, L. (2011) *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy. *Parasites & Vectors.* 4(1):42.

16. Calcagno M.A., Forastiero M.A., Saracino M.P., Vila C.C., Venturiello S.M. (2017) Serum IgE and IgG4 against muscle larva excretory-secretory products during the early and late phases of human trichinellosis. *Parasitol. Res.* 116(11):2933-2939.
17. Cho M., Park M., Kang S., Choi S., Ahn S., Yu H. (2012) *Trichinella spiralis* infection suppressed gut inflammation with CD4 + CD25 + Foxp3 + T cell recruitment. *Korean J. Parasitol.* 50:385–390.
18. Dea-Ayuela M., Bolas-Fernandez F. (1999) *Trichinella* antigens: a review. *Vet. Res.* 30(6):559-71.
19. Debeljak. Z., Boufana, B., Interisano, M., Vidanovic, D., Kulisic, Z. & Casulli, A. (2016) First insights into the genetic diversity of *Echinococcus granulosus sensu stricto* (s.s.) in Serbia. *Vet. Parasitol.* 223:57-62.
20. Despommier D. (1998) How does *Trichinella spiralis* make itself at home?. *Parasitol. Today.* 14(8):318-323.
21. Dević M, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic Lj. (2014) Detection of a *Trichinella-specific* IgE in human trichinellosis - the creation of a new test. *J. Serb. Chem. Soc.* 79: 1477-1490.
22. Djurkovic-Djakovic O., Bobic B., Klun I. (2010) Toxoplasmosis in Serbia: time for an action plan. *Parasite.* 17:187-192.
23. Dupouy-Camet J., Bruschi F. (2007) Management and diagnosis of human trichinellosis. pp. 37-68 in J. Dupouy-Camet, J. and Murrell, K.M. (eds) *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis.* FAO/WHO/OIE, Paris, France.
24. Escalante M., Romaris F., Rodriguez M., Rodriguez E., Leiro J., Ga'rate M.T., Ubeira F.M. (2004) Evaluation of *Trichinella spiralis* larva group 1 antigens for serodiagnosis of human trichinellosis. *J. Clin. Microbiol.* 42:4060–4066.
25. Estambale B.A.A., Simonsen P.E., Vennervald B.J., Knight R., Bwayo J.J. (1995) Bancroftian filariasis in Kwale District of Kenya. III. Quantification of the IgE response in selected individuals from an endemic community. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89:287-295
26. Fabre M., Beiting D., Bliss S., Appleton J. (2009a) Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Vet. Parasitol.* 159(3-4):245- 248.
27. Fabre M., Beiting D., Bliss S., Appleton J. (2009c) Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Vet. Parasitol.* 159(3-4):245- 248.
28. Fabre V., Beiting D., Bliss S., Gebreselassie N., Gagliardo L., Lee N., Lee J., Appleton J. (2009b) Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J. Immunol.* 182(3):1577- 1583.
29. FAO/WHO/OIE (2007) *Guidelines for the survivalence, menagment, prevention and control of trichinellosis.* Paris, France, WHO/FAO/OIE.
30. Forbes L.B., Appleyard G.D., Gajadhar A.A. (2004) Comparison of synthetic tyvelose antigen with excretory–secretory antigen for the detection of trichinellosis in swine using enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 90:835-840.

31. W., Gullotta F., Saathoff M., Tackmann W. (1988) Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur. Neurol.* 28:221-226.
32. Gabrielli S., Tasić-Otašević S., Ignjatović A., Fraulo M., Trenkić-Božinović M., Momčilović S., Cancrini G. (2017) Seroprevalence and Risk Factors for *Toxocara canis* Infection in Serbia During 2015. *Foodborne Pathog. Dis.* 14:43-49.
33. Gamble H. R., Patrascu I.V. (1996) Whole blood, serum and tissue fluids in an EIA for swine trichinellosis. *J. Food Prot.* 59:1213-1217.
34. Gamble H. R., Pozio E., Bruschi F., Nöckler K., Kapel C.M.O, Gajadhar A.A.A. (2004) International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite.* 11:3-13.
35. Gamble H.R., Graham C.E. (1984a) Comparison of monoclonal antibody-based competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of swine trichinosis. *Vet. Immunol. Immunop.* 6:379-389.
36. Gamble H.R., Graham C.E. (1984b) Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *Am. J. Vet. Res.* 45:67-74.
37. Gnjatovic M, Gruden-Movsesijan A, Miladinovic-Tasic N, Ilic N, Vasilev S, Cvetkovic J, Sofronic-Milosavljevic L. (2017) A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of antibodies against *Trichinella spiralis* and *T. britovi* - one test for humans and swine. *J. Helminthol.* 23:1-9.
38. Gomez-Morales M.A., Ludovici A., Amati M., Cherchi S., Pezzotti P., Pozio E. (2008) Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clin. Vaccine. Immunol.* 15:1723–1729.
39. Gomez-Morales M.A., Ludovisi A., Amati M., Blaga R., Zivojinovic M., Ribicich M., Pozio E. (2012) A distinctive western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs. *Int. J. Parasitol.* 42:1017–1023.
40. Gottstein B., Pozio E., Nockler K. (2009) Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:127–145.
41. Grabitzki J., Lochnit G. (2009) Immunomodulation by phosphocholine-Biosynthesis, structures and immunological implications of parasitic PC-epitopes. *Mol. Immunol.* 47(2-3):149-163.
42. Granucci F., Zanoni I., Ricciardi-Castagnoli P. (2008) Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell. Mol. Life. Sci.* 65(11):1683-1697.
43. Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Mostarica-Stojkovic M., Stosic-Grujicic S., Milic M., Sofronic-Milosavljevic Lj. (2011) Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. *Parasite. Immunol.* 32:450–459.
44. Guiliano D., Oksov Y., Lustigman S., Gounaris K., Selkirk M. (2009) Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol.* 39(5):515-524.
45. Harms G., Binz P., Feldmeier H. (1993) Trichinosis: a prospective controlled study of patients ten years after acute infection. *Clin. Infect. Dis.* 17:637-643.

46. Hill D.E., Forbes L., Gajadhar A.A., Gamble H.R. (2007) Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue. *Vet. Parasitol.* 146: 102-106.
47. Ilic N., Gruden-Movsesijan A., Zivojinovic M., Sofronic-Milosavljevic L. (2014) Characteristic Band Pattern in Western Blots for Specific Detection of Anti-*Trichinella Spiralis* Antibodies in Different Host Species. *Acta Vet-Belgrade* 64:33-43.
48. Ivanoska D., Cuperlovic K., Gamble H.R., Murrell K.D. (1989) Comparative efficacy of antigen and antibody detection tests for human trichinellosis. *Journal of Parasitology.* 75:38-41.
49. Jacobson R.H. (1998) Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).* 17:469-486.
50. Jaoko W.G., Lund M., Michael E., Simonsen P.E. (2001) A simple and quick method for enhanced detection of specific IgE in serum from lymphatic filariasis patients. *Acta. Trop.* 80: 51-57.
51. Jasmer D. (1993) *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J. Cell Biol.* 121(4):785-793.
52. Jasmer D., Bohnet S., Prieur, D. (1991) *Trichinella spp.*: Differential expression of acid phosphatase and myofibrillar proteins in infected muscle cells. *Exp. Parasitol.* 72(3):321-331. 154.
53. Jung D., Teifke J.P., Karger A., Michael K., Venz S., Wittmann W., Kindermann K., Nockler K., Mundt E. (2007) Evaluation of baculovirus-derived recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* for detection of *Trichinella-specific* antibodies in domestic swine by ELISA. *Parasitol. Res.* 100:429-437.
54. Kapel C.M.O. (2009) Sylvatic and domestic *Trichinella spp.* in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *Int. J. Parasitol.* 87:309–314.
55. Kapel C.M.O., Gamble H. (2000) Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella spp.* in experimentally infected pigs. *Int. J. Parasitol.* 30:215–221.
56. Kapsenberg, M. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3(12):984-993.
57. Kaslow D.C., Quakyi L.A., Syin C, Raum M.G., Keister D.B., Coligan J.E., Mccutchan T.F., Miller L.H. (1988) A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains, *Nature (London).* 333:74-76.
58. Klaver E. J., Kuijk L. M., Laan L. C., et al. (2013) *Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *Int. J. Parasitol.* 43(3-4):191–200.
59. Kurniawan A., Atkinson R., Sartono E., Partono F., Yazdanbakhsh M., Maizels R.M. (1995) Differential decline in filaria-specific IgG1, IgG4 and IgE antibodies in *Brugia malayi* infected patients after diethylcarbamazine chemotherapy. *J. Infect. Dis.* 172:1567-1572.
60. Lalic, R., M. Movsesijan, K. Cuperlovic, Petrovic M. (1979) Antibodies during infection with *Trichinella spiralis*. *Periodicum Biologorum* 81: 485-487.

61. Lee K., Ko R. (2006) Cell-mediated response at the muscle phase of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* infections. *Parasitol Res.* 99(1):70-77.
62. Liu Y., Kanzer H., Soumelis V., Gilliet M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2(7):585-9.
63. MacDonald A., Maizels R. (2008) Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J. Exp. Med.* 205(1):13-17.
64. Maizels R.M., Yazdanbakhsh M. (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 3:733-744.
65. Mamoni R.L., Rossi C.L., Camargo Z.P., M. Blotta M.H.S.L. (2001) Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin e in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 237-241.
66. Marti E., Horohov D.W., Antzak D.F., Lazar S., Lunn, D.P. (2003) Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico, and Hortobagy, Hungary. *Vet. Immunol. Immunopath.* 91:233-243.
67. Mellman I. (2013) Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunology Research.* 1(3):145-149.
68. Mosmann T. (1991) Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subsets. *Immunol. Res.* 10(3-4):183-188.
69. Murrell K. D., Bruschi F. (1994) Clinical trichinellosis, *Progress in clinical parasitology.* CRC Press, Boca Raton, FL. 117-150.
70. Murrell K.D., Djordjevic M., Cuperlovic K., Sofronic Lj., Savic M., Djordjevic M., Damjanovic S. (2004) Epidemiology of *Trichinella* infection in the horse: the risk from animal product feeding practices. *Vet. Parasitol.*, 123:223-33.
71. Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. (2008) Species-specific antibody responses to the recombinant 53-kilodalton excretory and secretory proteins in mice infected with *Trichinella spp.* *Clin. Vaccine. Immunol.* 15:468-473.
72. Nakada T., Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. (2005) Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 96(6):354-360.
73. Nataša I., Gruden-Movsesijan A., Cvetkovic J., Tomic S., Bozidar Vucevic D., Aranzamendi C., Colic M., Pinelli E., Sofronic-Milosavljevic Lj. (2018) *Trichinella spiralis* Excretory-Secretory Products Induce Tolerogenic Properties in Human Dendritic Cells via Toll-Like Receptors 2 and 4. *Front. Immunol.* 9: 11.
74. Nockler K., Kapel C.M.O. (2007) Detection and surveillance for *Trichinella*: Meat inspection hygiene, and legislation, in J. Dupouy-Camet & K.D. Murrell (eds.), *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*, pp. 69-97, World Organisation for Animal Health Press, Paris.
75. Nockler K., Serrano F.J., Boireau P., Kapel C.M., Pozio E. (2005) Experimental studies in swine on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.* 132:85-90.
76. Nockler K., Voigt W.P., Protz D., Miko A., Ziedler K. (1995) Indirect ELISA for the diagnosis of trichinellosis in living pigs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 108:167-174.
77. Office International des Epizooties. (2004) Trichinellosis, chapter 2.2.9. In *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*, 5th ed. Office International des Epizooties, Paris, France.

78. Ortega-Pierres G., Yopez-Mulia L., Homan W., Gamble H.R., Lim P.L., Takahashi Y., Wassom D.L, Appleton J.A. (1996) Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite. Immunol.* 18:273-284
79. Patel N., Kreider T., Urban J., Gause W. (2009) Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *Int. J. Parasitol.* 39(1):13-21.
80. Patrascu I., Gamble H.R., Sofronic-Milosavljevic L., Radulescu R., Andrei A., Ionescu V., Timocanu V, Boireau P., Cuperlovic K., Djordjevic M., Murrell K.D., Noeckler K., Pozio E. (2001) The lateral flow card test: an alternative method for the detection of *Trichinella* infection in swine. *Parasite.* 8:240-2.
81. Peters P. J., Gagliardo L., Sabin E.A., Betchen A., Ghosh K., Oblak J., Appleton J. (1999) Dominance of immunoglobulin G2c in the antiphosphorylcholine response of rats infected with *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* 67(9):4661-7.
82. Pozio E, Varese P, Morales MA, Croppo GP, Pelliccia D, Bruschi F. (1993) Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(4):568-75.
83. Pozio E., Paterlini F., Pedarra C., Sacchi L., Bugarini R., Goffredo E., Boni P. (1999) Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *J. Helminthol.* 73:233-237.
84. Pozio E., Sofronic-Milosavljevic Lj., Gomez Morales M., Boireau P., Nöckler K. (2002) Evaluation of ELISA and Western blot analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.* 108:163-178.
85. Rajul P., Annie M., Shefali P., Chandra S., Ravi T. (2008) Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian J. Ophthalmol.* 56(1): 45–50.
86. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. (2015) Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front. Immunol.* 6:569.
87. Reason A.J., Ellis L.A., Appleton J.A., Wisnewski N., Grieve R.B., Mc Neil M. et al. (1994) Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary A^αglycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology.* 5:593-603.
88. Rigsby P., Rijpkema S., Guy E.C., Francis J., Das R.G. (2004) Evaluation of a candidate international standard preparation for human anti-*Toxoplasma* immunoglobulin G. *J. Clin. Microbiol.* 42:5133-5138.
89. Rihet P., Demeure C., Bourgois A., Prata A., Dessein A.J. (1991) Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.* 21 :2679-86.
90. Robinson M., Connolly B. (2005) Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. *Proteomics.* 5(17):4525-4532.
91. Romarís, F., Escalante, M., Lorenzo, S., Bonay, P., Gárate, T., Leiro, J. and Ubeira, F. (2002) Monoclonal antibodies raised in Btkxid mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Mol. Biochem. Parasit.* 125:173-183.

92. Ruangkunaporn, Y., Watt, G., Karnasuta, C., Jongsakul, K., Mahannop, P., M. Chongsanguan, M., Chaicumpa, W. (2011) Immunodiagnosis of trichinellosis: efficacy of somatic antigen in early detection of human trichinellosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 12:39–42.
93. Saunders K., Raine T., Cooke A., Lawrence C. (2007) Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect. Immun.* 75:397–407.
94. Sofronic-Milosavljevic Lj., Ilic N., Pinelli E., Gruden-Movsesijan A. (2015) Secretory Products of *Trichinella spiralis* Muscle Larvae and Immunomodulation: Implication for Autoimmune Diseases, Allergies, and Malignancies. *Journal of Immunology*.
95. Sofronic-Milosavljevic, Lj., Radovic, I., Ilic, N., Majstorovic, I., Cvetkovic, J., Gruden-Movsesijan, A. (2013) Application of dendritic cells stimulated with *Trichinella spiralis* excretory–secretory antigens alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Med. Microbiol. Immunol.* 202:239–429.
96. Soule C., Dupouy-Camet J., Georges P., Ancelle T., Gillet J.P., Vaissaire J., Delvigne A., Plateau E. (1989) Experimental trichinellosis in horses: biological and parasitological evaluation. *Vet. Parasitol.* 31:19-36.
97. Souza-Atta M.B.L., Araujo M.I., D'Oliveira Junior A., Ribeiro-deJesus A., Almeida R.P., Atta A.M., Carvalho E.M. (1999) Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 1101–1105.
98. Srimanote P., Ittiprasert W., Sermsart B., Chaisri U., Mahannop P, Sakolvaree Y., Tapchaisri P., Maleewong W., Kurazono H., Hayashi H. (2011) *Trichinella spiralis*-specific monoclonal antibodies and affinity-purified antigen based diagnosis, *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 18:37–45.
99. Steel C., Guinea A., Ottesen E.A. (1996) Evidence for protective immunity to Bancroftian filariasis in the Cooks Islands. *J. Infect. Dis.* 174:598-605.
100. Sugiura, T., Kondo, T., Imagawa, H., Kamada, M. (1998) Production of monoclonal antibodies to six isotypes of horse immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 62 (2):145–151.
101. Takahashi Y. (1997) Antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Today.* 13: 104-109.
102. Takahashi Y., Homan W., Lim P.L. (1993) Ultrastructural localization of the fosforilcholine-associated antigen in *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* 79: 604- 617.
103. Takahashi Y., Uno T., Mizuno N., Suzuki H., Wada T., Araki T. (1990) Immunocytochemical evaluation of *Trichinella spiralis* larval antigen. *J. Electron. Microsc.* 39:155-159
104. Terrazas C., Gómez-García L., Terrazas L. (2010) Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int. J. Parasitol.* 40:1051–1062.
105. Turner J.D., Faulkner H., Kamgno J., Kennedy M.W., Behnke J., Boussineq M., Bradley J.E. (2005) Allergen-specific IgE and IgG4 are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. *Microbes Infect.* 7:990–996.
106. van Beelen A., Zelinkova Z., Taanman-Kueter E., Muller F., Hommes D., Zaat S., Kapsenberg M., de Jong E. (2007) Stimulation of the intracellular bacterial sensor

- NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*. 27(4):660-669.
107. Voigt W., Nöckler K., Freischem B., Henriksen S., Van Knapen F., Martinez-Fernandez F., Pfeiffer G., Pozio E., Reuter G., Ring C. (1998) Detection of low levels of *Trichinella spiralis* in experimentally infected horses, *Trichinellosis*. 9th International, Conference on *Trichinellosis*, Germar Press, Nonoalco Tlateloco, Mexico. 629–634.
108. Wakelin D., Goyal P. K., Gehlawi M. S., Hermanek J. (1994) Immune responses to *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* in mice. *Immunology*. 81(3):470-475.
109. Wang L., Wang Z., Hu D., Cui J. (2013) Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Bio. Med. Research International*. 1-7.
110. Wang, L., Cui, J., Hu, D., Liu, R. and Wang, Z. (2014) Identification of early 164 diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. *Parasites & Vectors*, 7(1):40.
111. Watanabe N, Bruschi F, Korenaga M. (2005) IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends. Parasitol*. 21:175–178
112. White R.R., Artavanis-Tsakonas K. (2012) How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Virulence*. 3(7):668–77.
113. Wisnewski N., Mcneil M., Grieve R.B., Wassom D. (1993) Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasit*. 61, 25-36 .
114. Wu L., Dakic A. (2004) Development of dendritic cell system. *Cellular & molecular immunology*., 1(2):112-8.
115. Wu Z., Sofronic-Milosavljevic Lj., Nagano I., Takahashi Y. (2008) *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasite Vectors*. 19: 27-47.
116. Yang Y., Caib N.Y., Tongc M.W., Sunc N., Xuana Y.H., Kanga Y.H., Valléed I., Pascal B., Chengc S., Liu M.Y. (2015) Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health*. 2:25–30.
117. Yepez-Mulia L., Hernandez-Bello R., Arizmendi-Puga N., Fonseca-Linan R. I., Ortega-Pierres G. (2007) Contribution to the study of *Trichinella spiralis* TL-1 antigens in host immunity. *Par. Immunol*. 29: 661-670.
118. Zarlenga D. S., Gamble H.R. (1990) Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Mol. Biochem. Parasitol*. 42:165-174.
119. Zhang G.P., Guo J.Q., Wang X.N., Yang j.X., Yang Y.Y., Li Q.M., Li X.W., Deng R.G., Xiao Z.J., Yang J.F. (2006) Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection, *Vet. Parasitol*. 137:286–293.
120. Zweig M.H., Campbell G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry*. 39:561-577.

Sadržaj slika:

1. Životni ciklus *T. spiralis*. Nakon konzumiranja inficiranog mesa, pod uticajem hlorovodonične kiseline i enzima, *Trichinella* larve se oslobađaju iz ćelija negovateljica. Oslobođene larve prodiru u mukozu creva gde se presvlače i sazrevaju u adulte. Adulti kopuliraju i ženke proizvode novorođene larve koje putem cirkulatorne mreže dospevaju u poprečno-prugastu muskulaturu gde formiraju kompleks larva-ćelija negovateljica (Izvor: https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2010/Angelia_Wang/TrichinosisSiteFINAL.htm).
2. Inkapsulirana mišićna larva *T. spiralis* (Izvor: http://uvmecoparasit.wikia.com/wiki/Trichinella_spiralis)
3. Indirektni imunofluorecentni test. Primer pozitivnog nalaza u testu (a); primer negativnog nalaza u testu (b).
4. Reprezentativan primer Western blot obrasca reaktivnosti ekskretorno-sekretornog antigena *T. spiralis* sa serumima – (a) inficiranih svinja, M - markeri molekulske težine u kDa, trake 1-3 predstavlja uzorke seruma sa potvrđenom infekcijom (Gomez-Morales i sar., 2012); -(b) inficiranih ljudi, M - markeri molekulske težine u kDa, trake 1-4 predstavlja serumime inficiranih ljudi različitog nivoa pozitivnosti (Gomez-Morales i sar., 2008).
5. Šematski prikaz *Trichinella* c-ELISA testa
6. Šematski prikaz pojačanog indirektnog ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela
7. Šematski prikaz "Capture" IgE ELISA testa
8. Reaktivnost mAt7C2C5 sa ES L1 antigenom *T. spiralis* i njihova sposobnosti da inhibiraju vezivanje anti-*Trichinella* antitela prisutnih u serumima različitih vrsta. Western blot analiza: ES L1 antigen je, nakon SDS elektroforeze pod redukujućim uslovima, prebačen na nitrocelulozne trake i inkubiran sa: mAt 7C2C5 (traka 1); serumom pacijenta inficiranog sa *T. spiralis* (traka 2); serumom pacijenta inficiranog sa *T. britovi* (traka 4); serumom svinje inficirane sa *T. spiralis* (traka 6). Test inhibicije: pre-inkubacija nitroceluloznih traka (sa ES L1 Ag) sa 7C2C5 mAt rezultirala je inhibicijom vezivanja antitela iz seruma dobijenih od ljudi inficiranih sa *T. spiralis* (traka 3), *T. britovi* (traka 5) i seruma svinje inficirane sa *T. spiralis* (Traka 7).
9. Kinetika vezivanja serumskih *Trichinella*-specifičnih antitela i mAt 7C2C5-HRP antitela u indirektnom ELISA formatu. Uticaj različitih koncentracija antitela na kinetiku u i-ELISA formatu. Inkubacija u i-ELISA testu vršena je uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi.

10. Uticaj koncentracije serumskih specifičnih antitela na procenat inhibicije (PI) dobijen u *Trichinella* c-ELISA testu. Analiza je rađena uz kontinuirano mešanje na sobnoj temperaturi. Da bi potvrdili da je inhibicija vezivanja mAt 7C2C5-HRP za imobilisani ES L1 antigen specifična i rezultat isključivo prisustva anti-*Trichinella* antitela u uzorku seruma, korišćena su dvostruka serijska razblaženja visoko pozitivnog humanog seruma (IFA titar ispitivanog humanog seruma bio je 1:1280). Vrednosti PI opadaju sa smanjenjem količine anti-*Trichinella* antitela.
11. Ispitivanje uticaja mešanja na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa. Analizirana su tri seruma različitog nivoa pozitivnosti. Inkubacija je vršena na sobnoj temperature, u trajanju od 30 min.
12. Grafik distribucije OD vrednosti (a) i procenata inhibicije (PI) (b) za 100 seruma dobrovoljnih davaoca krvi (negativni kontrolni serumi) i 80 *Trichinella*-pozitivnih humanih seruma dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu sa prikazom ključnih statističkih parametara (srednja vrednost, 95% CI, SD, minimum, maksimum).
13. ROC analiza urađena za 100 seruma dobrovoljnih davaoca krvi (negativni kontrolni serumi) i 80 *Trichinella* pozitivnih humanih seruma. ROC analiza prikazana je za vrednosti PI(%).
14. Grafik distribucije OD vrednosti (a) i procenata inhibicije (PI) (b) dobijenih u *Trichinella* c-ELISA testu za 70 *Trichinella*-negativnih seruma i 45 seruma svinja inficiranih sa *T. spiralis* sa prikazom ključnih statističkih parametara (srednja vrednost, 95% CI, SD, minimum, maksimum).
15. ROC analiza urađena za 70 *Trichinella*-negativnih seruma svinja (negativni kontrolni serumi) i 45 *Trichinella*-pozitivnih seruma svinja. ROC analiza prikazana za vrednosti PI(%).
16. Distribucija PI vrednosti dobijenih testiranjem *Trichinella*-negativnih seruma konja u *Trichinella* c-ELISA testu.
17. Kinetika antitelnog odgovora praćena kod tri eksperimentalno inficirane svinje, određivanjem prisustva specifičnih antitela primenom *Trichinella* c-ELISA testa. Životinje su inficirane različitim dozama ML *T. spiralis* (300, 500 i 10000 ML). Uzorci seruma prikupljeni su 0, 15., 21., 41. i 60. dana p.i. Broj larvi detektovanih po gramu testiranog mesa prikazan je u zagradi.
18. Kinetika antitelnog odgovora dobijena analizom seruma eksperimentalno inficiranih konja u *Trichinella* c-ELISA testu. Tri odrasla konja, srpske domaće planinske rase (DMB) (Konji I, II i III) inficirana sa 1100 larvi *T. spiralis*. Uzorci seruma prikupljeni su nultog dana, 4 nedelje posle infekcije (p.i.) a zatim u dvonedeljnim intervalima do kraja eksperimenta. Konji su žrtvovani u 32. nedelji infekcije.

19. Detekcija *Trichinella*-specific IgE antitela u humanim serumima primenom pojačanog indirektnog ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trihinella*-pozitivnih seruma i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza dobijenih rezultata.
20. Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima tretiranim RF absorbentom primenom pojačanog indirektnog IgE ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trihinella*-pozitivnih seruma i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza dobijenih rezultata.
21. Detekcija *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u humanim serumima primenom Capture *Trichinella* IgE ELISA testa. (a) Grafik distribucije OD vrednosti (merenih na 450 nm) dobijenih za 40 *Trihinella*-pozitivnih i 40 seruma zdravih osoba (dobrovoljnih davaoca krvi). (b) ROC analiza.
22. Analiza izolovanog 7C2C5 antigena. (a) Na elucionom profilu dobijenom nakon HPLC analize (BioSuite ekskluziona hromatografska kolona visoke rezolucije, sa 0.05 M PBS, pH 7.2), jasno su uočljiva četiri pika (I-IV) dobijena na 5.7, 7.2, 15.9 i 17.1 min., predstavljene u arbitralnim jedinicama (AU), (b) Elektroforeza urađena pod ne-redukujućim (traka 1 – markeri molekulskih težina) i redukujućim uslovima (traka 2 – molekulske težine izolovanih proteina). Traka 3 pokazuje imunoblot analizu izolovanih antigena primenom 7C2C5 mAt.
23. Uticaj ES L1 i 7C2C5 antigena na ekspresiju površinskih markera dendritskih ćelija. Stimulacija humanih DĆ sa LPS-om (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ES L1 i 7C2C5 antigenima (50 µg/ml) i bez stimulusa (gajene samo u medijumu - negativna kontrola) tokom 48 sati. a) Reprezentativni plotovi. Siva linija predstavlja negativnu kontrolu (ekspresija markera na netretiranim ćelijama), a crvena predstavlja ekspresiju ispitivanih molekula na tretiranim DĆ. b) Procenat ekspresije površinskih markera stimulisanih i nestimulisanih DĆ. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.
24. Uticaj ES L1 i 7C2C5 antigena na produkciju citokina dendritskih ćelija. DĆ, kultivisane iz koštane srži mužjaka DA pacova, stimulisane su LPS-om (pozitivna kontrola, 200 ng/ml), ES L1 i 7C2C5 antigenima (50 µg/ml) ili su gajene samo u medijumu bez stimulacije (negativna kontrola) 48 sati. Citokinski nivoi IL-12p70 (a), IL-10 (b) i TGF-β (c) su mereni u ćelijskim supernatantima korišćenjem ELISA testova. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD iz tri nezavisno izvedena eksperimenta; * p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Sadržaj tabela:

1. Odnos vremena serokonverzije i doze infekcije kod svinja, konja, divlja svinja, lisica i čoveka. Uzročnik infekcije svih analiziranih vrsta domaćina bila je *T. spiralis* (Yong i sar., 2016).
2. Uticaj vremena inkubacije (20, 30, 60 minuta i preko noći) na rezultat *Trichinella* c-ELISA testa na primeru humanih seruma različitog nivoa pozitivnosti (visok, srednji ili nizak) i primeru negativnog seruma.
3. Ispitivanje uticaja mešanja tokom procesa inkubacije na ponovljivost *Trichinella* c-ELISA testu u intra-assay ispitivanju.
4. Paleta seruma korišćena za definisanje analitičke specifičnosti *Trichinella* c-ELISA testa sa prikazom maksimalnih PI vrednosti dobijenih po grupama.
5. Klasifikacija rezultata testa u kategorije istinito i/ili lažno pozitivnih i negativnih nalaza u testu. Cut-off vrednost korišćena u klasifikaciji rezultata testa po kategorijama iznosila je 19.4 %.
6. Intra- i inter-assay ponovljivost *Trichinella* c-ELISA testa.
7. Poređenje senzitivnosti *Trichinella* i-ELISA i *Trichinella* c-ELISA testa u 21 danu infekcije eksperimentalno inficiranih svinja. Relativna senzitivnost testa prikazana je u zagradi.
8. Ispitivanje efikasnosti RF absorbenta u uklanjanju serumskih IgG antitela.
9. Ispitivanje ponovljivosti i-ELISA testa namenjenog detekciji *Trichinella*-specifičnih IgE antitela u slučaju korišćenja RF tretiranih uzoraka.
10. Ispitivanje ponovljivosti Capture *Trichinella* IgE ELISA testa.
11. Analitička specifičnost Capture *Trichinella* IgE ELISA test.
12. Uticaj dodavanja različitih koncentracija nespecifičnih IgE antitela na rezultat Capture *Trichinella* IgE ELISA testa.

Biografija

Marija Lj. Gnjatović (rođ. Dević), diplomirani inženjer tehnologije, rođena je 19.07.1983. godine u Smederevu. Osnovnu školu kao i Gimnaziju završila je u Smederevu a za uspehe tokom školovanja nagrađena je Vukovom diplomom kao i drugim diplomama za postignute rezultate na republičkim takmičenjima iz biologije i hemije. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 2002/2003. godine. Diplomirala je na smeru Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija maja 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.00. Diplomski rad pod nazivom "Primena modifikovanih ugljeničnih nanocevi za uklanjanje jona kadmijuma iz vode" odbranila je sa ocenom 10.00. Školske 2009/2010. godine upisala je doktorske studije na smeru Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, pod mentorstvom dr Branka Bugarskog, red. prof, i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9.70, uključujući i završni ispit pod nazivom "Strukturne i funkcionalne karakteristike normalnih i monoklonskih imunoglobulina – tehnologija proizvodnje i izolacije".

Od 01.01.2011. (7 god.) godine zaposlena je na Institutu za primenu nuklearne energije - INEP, kao istraživač-pripravnik, a od aprila 2012. godine prelazi u zvanje istraživač-saradnik. Angažovana je na projektu osnovnih istraživanja pod nazivom „Izučavanje mehanizama imunskog odgovora na infekciju ili produkte parazita i njihov uticaj na modulaciju i/ili prevenciju drugih bolesti“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta: 173047B). Bila je učesnik i na nacionalnom inovacionom projektu „Proizvodnja i primena proteina i peptida surutke i mleka“ (broj projekta: 451/03/2802/2013-16/176). Pored ovoga, učesnik je i na dva međunarodna projekta, *the European Cooperation in Science and Technology (COST) Action BM1305: Action to Focus and Accelerate Cell-based Tolerance-inducing Therapies (A FACTT) (2014-2018)* i *FA COST Action FA1408: A European Network for Foodborne Parasites (2015-2019)*.

U okviru proizvodne i uslužne delatnosti instituta na kome radi, Marija Lj. Gnjatović angažovana je na polju proizvodnje i razvoja imunodijagnostičkih testova namenjenih detekciji parazitskih i autoimunskih bolesti, kao i na polju imunodijagnostike istih. U okviru proizvodnog procesa bavi se izolovanjem i karakterizacijom prečišćenih antigena koji se koriste u postupku imunizacije životinja, proizvodnjom i izolacijom

poliklonskih i monoklonskih antitela, vezivanjem antitela i antigena za čvrstu fazu, obeležavanjem antitela fluorescentnim i enzimskim obeleživačima, pripremom konjugata i antiseruma za INEP-ove IIF i ELISA testove.

Član je i sledećih društava: Srpskog hemijskog društva, Društva parazitologa Srbije i Biohemijskog društva Srbije.

Posebno značajna stručna usavršavanja Marije Lj. Gnjatović odnose se na boravke u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite, Rim, Italija (European reference laboratory for parasites, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy), na temu “Serološka detekcija infekcije sa *Trichinella* spp, - razvoj i validacija dijagnostičkih testova” (2013., 2017. god).

Marija Lj. Gnjatović do sada je bila autor ili koautor 7 radova štampanih u celini i to: dva (2) rada publikovana u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), četiri (4) rada publikovana u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), jedan (1) rad publikovana u međunarodnom časopisu (M23) kao i šest (6) saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34).

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Љ. Гњатовић

Број индекса 4031/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање
инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе
имунодоминантни епитоп

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

Потпис аутора

У Београду, 10.09.2018



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Љ. Гњатовић

Број индекса 4031/2009

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Примена 7C2C5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп

Ментори др Бранко Бугарски, редовни професор и др Љиљана Софронић-Милосављевић, научни саветник

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 10.09.2018



Изјава о коришћењу

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

Примена 7С2С5 моноклонског антитела у развоју ЕЛИСА тестова за откривање инфекције са *Trichinella spp.* и изолацију компоненти паразита који носе имунодоминантни епитоп

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 10.09.2018.

