

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ**

Милена Ж. Живојиновић

**ЕПИЗООТИОЛОШКА, СЕРОЛОШКА
И МОЛЕКУЛАРНА ИСТРАЖИВАЊА
ВРСТА РОДА *TRICHINELLA***

Докторска дисертација

Београд, 2013

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Milena Ž. Živojinović

**EPIZOOTIOLOGICAL, SEROLOGICAL
AND MOLECULAR INVESTIGATIONS
OF *TRICHINELLA* SPECIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Ментор:

Проф. др сци. Зоран Кулишић, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Чланови Комисије:

Научни саветник, др сци. Љиљана Софронић - Институт за примену нуклеарне енергије (ИНЕП) у Београду Универзитета у Београду;

Проф. др сци. Владо Теодоровић, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду;

Проф. др сци. Соња Радојичић, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду;

Доц. др сци. Милорад Мириловић, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

Датум одбране:

Епизоотиолошка, серолошка и молекуларна истраживања врста рода *Trichinella*

Резиме

У овом раду испитивана је присутност трихинела на ендемском подручју Браничева и Подунавља код домаћих и дивљих животиња, као и идентификација присутних врста рода *Trichinella*. Методом вештачке дигестије испитано је 211 узорака пореклом од домаћих свиња и позитиван налаз је добијен код 25 (11,85%) узорака. Установљена је сигнификантна разлика ($p < 0,01$) у проценту појављивања трихинелозе код домаћих свиња пореклом са индивидуалних газдинстава и индустријских фарми. Испитивањем је обухваћено и 338 узорака пореклом од дивљих животиња и 30 паса. Инфекција је утврђена код 7 од 174 (4,02%) испитаних дивљих свиња (*Sus scrofa*), код 8 од 118 (6,78%) лисица (*Vulpes vulpes*), код 8 од 42 (19,05%) шакала (*Canis aureus*), код сва 4 (100%) прегледана вука (*Canis lupus*) и 7 (23,33%) паса (*Canis familiaris*).

Имуноензимским тестом (ELISA тест) на 150 узорака крвних серума домаћих свиња пореклом са фарми није утврђено присуство специфичних антитела против врста рода *Trichinella*. На индивидуалним газдинствима установљено је 26 позитивних (12,68%) узорака крвних серума свиња, 6 (2,93%) је било слабо позитивно, а 13 (6,34%) негативно. Од укупно 11 прегледаних узорака крви паса луталица који су потицали са територије општине Пожаревац 8 узорака је реаговало позитивно, 1 слабо позитивно и 2 су реаговала негативно.

Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима месног сока дивљих животиња урађен је на 17 узорака, од чега је 7 било серолошки позитивно, док код 10 узорака није установљено присуство антитела против *Trichinella* spp. Резултати серолошких испитивања су били подударни са резултатима вештачке дигестије. Имуноблот методом је испитано 36 узорака крвних серума домаћих свиња. Сви узорци који су показали позитиван и слабо позитиван резултат у ELISA тесту (32 узорка) били су позитивни на Western blot тесту.

Узорци испитани multiplex PCR техником су потицали од 6 врста животиња и то: 25 домаћих свиња, 7 дивљих свиња, 8 лисица, 8 шакала, 4 вука и 7

паса. Резултати су добијени за 53 узорака, док код укупно 6 узорака идентификација није успела (10,2%) и тест PCR је проглашаван негативан. *Trichinella spiralis* је идентификована у 43 узорака (72,9%). *Trichinella britovi* је идентификована у 7 узорака (11,8%). Присуство обе врсте *T. spiralis* и *T. britovi* утврђено код 3 узорка (5,1%). *Trichinella spiralis* је утврђена код 25 домаћих свиња, 5 паса, 5 лисица, 5 шакала и 3 дивље свиње. *Trichinella britovi* је утврђена само код дивљих животиња и то 1 дивље свиње, 1 шакала, 1 лисице и 4 вука. Присуство мешовите инфекције (*T. spiralis* и *T. britovi*) утврђено је код 2 лисице и 1 шакала. У популацији домаћих свиња и паса лугалица утврђено је присуство само *T. spiralis*. У односу на географску распрострањеност на територији Подунавског округа утврђено је присуство *T. spiralis*, док је на територији Браничевског округа утврђено присуство *T. spiralis* и *T. britovi*.

На основу спроведених истраживања и добијених резултата за географско позиционирање утврђених случајева трихинелозе и идентификованих врста рода *Trichinella* код домаћих и дивљих животиња на територији епизоотиолошког подручја Браничевског и Подунавског округа, добијени су подаци о географским координатама (дужина/ширина), локације, а посебно тачке од интереса (индустријске фарме, ловишта), као потенцијалних извора инфекције за пријемчиве врсте животиња. Током овог истраживања по први пут је доказана мешовита инфекција са *T. spiralis* и *T. britovi* код дивљих животиња, што указује на мешање домаћег и сивлатичног циклуса и указује на потенцијални ризик за домаће врсте животиња. Уз то, резултати добијени применом имуноблота и multiplex PCR методе представљају значајан допринос епизоотиолошком надзору инфекције врстама рода *Trichinella* код домаћих и дивљих животиња.

Кључне речи: *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, домаће и дивље животиње, инфекција, епизоотиологија

Научна област

Ветеринарска медицина

Ужа научна област

Епизоотиологија, заразне болести животиња и болести пчела и свилопреља

УДК: 619:616.9

Epizootiological, serological and molecular investigations of *Trichinella* species

In this work we investigated presence of *Trichinella* species at endemic districts Branicevo and Podunavlje in population of domestic and wild animals. We examined 211 samples of muscular tissue from domestic pigs and 30 samples from dogs, by artificial digestion. Positive result was in 25 (11, 85%) samples from pigs and 7 (23,33%) dogs. Significant different ($p < 0, 01$) was in percentage of infection in population of pigs from backyards and pigs from industrial farms. Among wild life, 338 samples were examined. *Trichinella* infections were detected in 7 from 174 (4,02%) wild boars (*Sus scrofa*), in 8 from 118 (6, 78%) foxes (*Vulpes vulpes*), in 8 from 42 (19, 05%) jackals (*Canis aureus*) and in all for examined wolves (*Canis lupus*).

During serology survey, performed at industrial farms in 150 samples of swine sera we didn't detect anti-*Trichinella* antibodies by ELISA test. In backyards we confirmed positive results in 26 (12, 68%) swine sera, weakly positive results in 6 (2, 93%) sera samples and 13 (6, 34%) negative results. From 11 serum samples of stray dogs from municipality of Pozarevac, 8 have specific anti-*Trichinella* antibodies, 1 was suspect and 2 were negative.

We examined 17 samples of meet juice from wild boars when 7 samples were positive and in 10 samples we didn't detect anti-*Trichinella* antibodies by ELISA test. Results from serology investigation were confirmed by artificial digestion. All positive and weakly positive samples in ELISA test (32 samples) were confirmed as positive in Western blot test.

Samples examined by Multiplex PCR were from 6 animal species: 25 domestic swine, 7 wild boars, 8 foxes, 8 jackals, 4 wolves and 7 dogs. We obtained result from 53 samples and non result in 6 (10, 2%) samples. *Trichinella spiralis* were identified in 43 (72, 9%) samples and *Trichinella britovi* in 7 samples (11,8%). Mix infection with both species were in 3 samples (5, 1%). *Trichinella spiralis* was found in 25 domestic pigs, 5 dogs, 5 foxes, 5 jackals and 3 wild boars. *Trichinella britovi* was found only in wild animals (1 wild boar, 1 jackal, 1 fox and 4 wolves). Mix infection (*T. spiralis* и *T. britovi*) was found in 2 foxes and 1 jackal. In population of domestic pig and dogs only

T. spiralis was found. Geographical distribution showed at Podunavlje district only presents of *T. spiralis* and at Branicevo district presents of *T. spiralis* и *T. britovi*.

With epizootiological and geographical data, identification of *Trichinella* species in population of domestic and wild animals at Branicevo and Podunavlje district we obtained data about location (latitude/longitude), identified points of interest (industrial farms, hunting section) as potential source for infection. During this investigation, for the first time mix infection with *T. spiralis* and *T. britovi* was detected in wild animals, which point out possible circulation between wild and domestic cycles and potential risk for domestic animals. With results of Western blot and Multiplex PCR investigation this work has significant contribution for epizootiological surveillance of *Trichinella* infection in domestic and wild animals.

Keywords: *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, domestic and wild animals, infection, epizootiology

Science area

Veterinary Medicine

Field area

Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDK: 619:616.9

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	5
2.1. Историјат изучавања трихинелозе	5
2.2. Морфологија узрочника трихинелозе	6
2.2.1. Општа биологија	8
2.2.2. Животни циклус	10
2.3. Класификација узрочника трихинелозе - таксономска подела врста рода <i>Trichinella</i>	12
2.4. Отпорност паразита	21
2.5. Имуни одговор	22
2.5.1. Имуни одговор код различитих врста животиња	23
2.6. Филогенетска истраживања	26
2.7. Биогеографија	26
2.8. Слободно живећа фаза - The 'free-living' stage	27
2.9. Епидемиологија и епизоотиологија	27
2.10. Врсте рода <i>Trichinella</i> и пријемчиве врсте животиња	30
2.11. Географска распрострањеност врста рода <i>Trichinella</i> код различитих врста животиња на територији Европе	30
2.12. Симпатрија – просторно преклапање врста рода <i>Trichinella</i>	37
2.13. Земље у којима није присутна трихинелоза	37
2.14. Силватични циклус	38
2.14.1. Сисари	38
2.14.2. Птице	40
2.14.3. Гмизавци	40
2.14.4. Водоземци и рибе	40
2.14.5. Морски сисари	40
2.14.6. Бескичмењаци	41
2.15. Утицај човека на силватични циклус	41

2.16. Домаћи циклус и најважнији фактори ризика у домаћем циклусу	41
2.16.1. Улога пацова	43
2.16.2. <i>Trichinella</i> spp. код коња	44
2.17. Начини преношења <i>Trichinella</i> spp. у домаћем циклусу	45
2.18. Трихинелоза код људи	46
2.18.1. Патогенеза и клиничка манифестација код људи	49
2.18.2. Дијагностика трихинелозе код људи	54
2.18.3. Лечење	56
2.19. Лабораторијска дијагностика трихинелозе	56
2.20. Избор методе за дијагностику	58
2.20.1. Директне дијагностичке методе	59
2.20.1.1. Врста узорка	60
2.20.1.2. Величина узорка	61
2.20.1.3. Метода компресије – трихинелоскопија	62
2.20.1.4. Метода вештачке дигестије	63
2.20.1.5. Кључни елементи	64
2.20.1.6. Валидација директних дијагностичких метода	67
2.20.1.7. Контрола квалитета директних метода	68
2.20.2. Индиректне дијагностичке методе	68
2.20.2.1. ELISA тест	69
2.20.2.2. Антиген	70
2.20.2.3. Узорак за испитивање у индиректним дијагностичким методама	71
2.20.2.4. Коњугат и субстрат	72
2.20.2.5. Валидација ELISA теста	73
2.20.2.6. Western blot тест	74
2.20.3. Контрола квалитета индиректних метода	75
2.20.4. Остали индиректни тестови	76
2.20.5. Идентификација врсте рода <i>Trichinella</i> применом Multiplex PCR методе	76
2.20.5.1. Принцип PCR методе	77

2.21. Инспекцијски преглед меса у складу са Европским прописима ...	78
2.22. Инспекцијски преглед закланих свиња, коња и дивљачи на кланицама у земљама ЕУ	79
2.23. Сертификована производња свиња	81
3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА	83
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	84
4.1. Материјал	84
4.1.1. Узорци мишићног ткива пореклом од животиња са територије Браничевског и Подунавског округа	84
4.1.2. Узорци крвних серума свиња, паса и месног сока дивљих свиња	86
4.1.3. Узорци ларви рода <i>Trichinella</i>	86
4.2. Методе рада	86
4.2.1. Директна метода - Метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом	86
4.2.2. Индиректне методе	88
4.2.2.1. Имуноензимски тест (ELISA тест)	88
4.2.2.2. Имуноблот (Western blot)	89
4.2.3. Идентификација врсте ларви <i>Trichinella</i> - применом multiplex PCR методе	92
4.2.3.1. Дефиниције и појмови	92
4.2.3.2. Реагенси и опрема	93
4.2.3.3. Процедура за припрему узорка	94
4.2.3.4. Изолација геномске ДНК из ларви трихинела	94
4.2.3.5. Multiplex PCR у молекуларној идентификацији врсте паразита из рода <i>Trichinella</i>	95
4.2.3.6. Гел електрофореза	95
4.2.3.7. Тумачење резултата	96
4.2.4. Географско позиционирање	97
5. РЕЗУЛТАТИ	99
5.1. Налаз ларви <i>Trichinella</i> spp. методом вештачке дигестије	99
5.1.1. Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од	

домаћих свиња	99
5.1.2. Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од дивљих животиње	101
5.1.3. Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од паса	104
5.2. Имуноензимски тест (ELISA тест)	105
5.2.1. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима крвних серума домаћих свиња	105
5.2.2. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима крвних серума паса	106
5.2.3. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима месног сока дивљих животиња	107
5.3. Имуноблот (<i>Western blot</i>)	109
5.4. Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR)	110
5.5. Географска распрострањеност	112
6. ДИСКУСИЈА	122
7. ЗАКЉУЧЦИ	145
8. ЛИТЕРАТУРА	147

1. УВОД

Трихинелоза је космополитска паразитска зооноза коју изазива нематода из рода *Trichinella*. За сада је идентификовано девет врста (*Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murreli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae*, *Trichinella zimbabwensis* и *Trichinella T12* са предлогом имена *T. patagoniensis*) и три генотипа (*Trichinella T6*, *Trichinella T8* и *Trichinella T9*). Све врсте односно генотипови рода *Trichinella*, осим *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae* и *Trichinella zimbabwensis*, карактерише формирање капсуле од колагена око измењене мишићне ћелије у којој се развила инфективна, мишићна ларва (формација позната као „ћелија неговатељица“). Како не постоји јасна морфолошка разлика између врста и генотипа, оне се могу разликовати само на основу биохемијских и молекуларних испитивања.

Читав животни циклус паразита (развој одраслих нематода у танком цреву, дисеминација новорођених ларви путем крвотока и лимфотока и развој инфективних ларви у попречно-пругастој мускулатури) одвија се у истом домаћину. Одрасли облик паразита опстаје у танким цревима домаћина недељама или месецима, у зависности од врсте домаћина и имунолошког одговора који се развија. Мишићни стадијум има и акутну и хроничну фазу (зависно од врсте домаћина она траје: читав живот - код краткоживећих врста или више година код осталих врста животиња и људи). Природна инфекција трихинелама је забележена код више од 100 врста сисара, као и код рептила и птица. Постоји повезаност између класа кичмењака, њихове телесне температуре и врста трихинела. Код рептила са телесном температуром од 25°C до 29°C и код птица, код којих је телесна температура од 40,5°C до 42,5°C, паразитирају врсте трихинела које не стварају капсулу. Кичмењаци са телесном температуром која се креће у распону од 37,5°C до 40°C јесу домаћини и за неинкапсулиране и за инкапсулиране врсте рода *Trichinella*.

Од 198 земаља на подручјима Европе, Северне и Јужне Америке, Африке, Азије и Пацифика, трихинелоза код домаћих животиња (пре свега свиња) регистрована је у 43 земље (21,72%), код дивљачи у 66 земаља (33,33%), а код људи у 55 земаља (27,78%). Пренос различитих врста трихинела је уско повезан са екологијом и врстом домаћина. Постоје два циклуса боравка овог паразита у природи, односно у популацији дивљих животиња (силватични циклус) и у популацији домаћих животиња (домаћи циклус). Оба циклуса су уско повезана присуством синантропних животиња (пацови, лисице, крзнашице, мачке, пси и др.). Присутни домаћини на одређеном подручју одређују ниво присутности силватичног циклуса. У преношењу заразе унутар популације домаћих животиња – домаћи циклус, постоји неколико основних извора заражавања, као што су исхрана домаћих животиња отпаcima хране који могу садржати делове термички недовољно обрађеног трихинелозног свињског меса и/или изловљене дивљачи, могућност приступа домаћих животиња лешевима трихинелозних свиња, присуство трихинелозних дивљих животиња у близини насељених места и простора за слободно напасање домаћих животиња. Добро адаптирана на свиње као домаћина, *T. spiralis* је најчешћи етиолошки агенс домаћег циклуса. Животиње инфициране овим паразитом не развијају клиничку слику, већ одржавају инфекцију и тако омогућавају преношење инфекције на људе. У случајевима исхране свиња отпаcima од меса инфициране дивљачи или код свиња на паши које се хране отпаcima у којима се налазе делови трупова дивљих животиња, могућ је пренос *Trichinella britovi* у домаћи циклус. Још једна врста, *T. pseudospiralis* је пренета на домаће свиње у Хрватској, Русији и Словачкој Републици.

Присуство паразита код домаћих и дивљих животиња, само по себи не представља значајан ризик да ће се обољење појавити код људи. Трихинелоза људи повезана је са културолошким навикама као што је исхрана људи сировим или недовољно термички обрађеним месом или производима од меса различитих врста животиња у којима се налазе инфективне, мишићне ларве трихинеле.

За здравствену заштиту људи неопходно је дијагностиковање инфекције код животиња и безбедно уклањање трихинелозног меса из ланца исхране. Уопштено, најважнији извор инфекције код људи у Србији је свињско месо и

производи од свињског меса, док је у Европи то до почетка овог века било на првом месту месо трихинелозних коња. У САД и Канади заражавање људи конзумирањем меса пореклом од домаћих свиња се готово не дешава јер је технологија гајења свиња и сама производња свињског меса и производа од меса знатно унапређена. До заражавања људи долази ипак у ретким случајевима конзумирања сировог или недовољно термички обрађеног меса које у себи садржи ларве а пореклом је од свиња која се гаје слободно или узгајају на фармама са органском производњом. У ланцу преноса инфекције од животиња на људе постоје три основне тачке: како се домаће животиње инфицирају, зашто је инфицирано месо доступно за људску употребу и како долази до инфекције људи. Инфекција домаћих свиња је последица како неодговарајућих услова узгајања тако и увођења трихинелозних животиња или меса из ендемског у неендемско подручје или земљу. Трихинелозно месо може бити употребљено за људску исхрану када изостане ветеринарска контрола (клање свиња и дивљачи за сопствене потребе без ветеринарског прегледа) или када дође до пропуста у систему контроле (нелегалан преглед од стране нестручног особља које није обучено за контролу свињског меса и производа од свињског меса).

Методe дијагностике трихинелозе код животиња у складу са Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008), могу се сврстати у две групе: а) директне и б) индиректне. Директне методе су паразитолошке методе - идентификација и откривање ларви у мишићном ткиву путем трихинелоскопије и вештачке дигестије. За паразитолошки преглед избор мишића који ће бити узорковани и прегледани захтева познавање предилекционих места у одређеној животињској врсти. Дијафрагма, жвакаћи мишићи и језик представљају мишиће који су на врху листе предилекционих места за утврђивања присуства ларви овог паразита. Поред врсте узорка неопходно је обезбедити адекватну количину како би се постигао задовољавајући ниво осетљивости дијагностичке методе. Осетљивост методе од 1-3 ларве по граму (l/g) је неопходно остварити како би се задовољио захтев везан за производњу здравствено исправних и безбедних намирница анималног порекла. За епизоотиолошко испитивање код животиња резервоара (дивље животиње) величину узорка би требало прилагодити постизању осетљивости теста за мање од 1 л/г, у складу са регулативом ЕУ

2075/2005. Због ограничених могућности утврђивања неинкапсулираних врста рода *Trichinella*, метода трихинелоскопије није препоручена од стране ОIE-а, за преглед свињског меса и дивљачи намењених за исхрану људи већ је препоручена метода вештачке дигестије (у Србији уведена осамдесетих година прошлог века).

Са биолошког и епизоотиолошког становишта данас је изузетно значајно идентификовати врсту унутар рода *Trichinella* и пратити њено кружење у природи и извршити географско позиционирање. Применом савремених молекуларних тестова могуће је утврђивање присуства, као и идентификације генотипова и врста унутар рода *Trichinella*. Индиректне методе подразумевају откривање инфекције утврђивањем присуства специфичних антитела или антигена у телесним течностима (индиректна имунофлуоресценција, ELISA, Western blot, Dot blot и др). Серолошке методе уз употребу географско информационог система су веома погодне за: откривање трихинелозних животиња пре клања, спречавање непотребних економских губитака који настају гајењем трихинелозних животиња, уклањање потенцијалних извора инфекције, сагледавање ефекта изведене систематске дератизације и дехелминтизације и спровођење једне од најбитнијих мера (серолошко испитивање животиња у домаћинству у којем је дијагностикована трихинелоза) које су предвиђене Правилником о мерама за сузбијање трихинелозе животиња (Сл. лист СРЈ бр. 20/95).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјат изучавања трихинелозе

Доступни историјски списи говоре о причи која почиње једне давне фебруарске зиме 1835. године. James Paget, студент прве године Медицинског факултета у Лондону, журећи на уобичајене вежбе из анатомије није ни слутио у каквом ће открићу бити непосредни учесник. У сали за аутопсију, болнице Свети Бартоломеј, хирурзи су вршили обдукцију леша Paola Bianchia, 51-годишњег Италијана. Било је то доба када је туберкулоза још увек била присутна у високом проценту, са високом стопом смртности. Тако је и смрт овог зидара била последица туберкулозе. Међутим, поред већ оправдано постављене сумње да је смрт непосредна последица туберкулозе, младом и љубопитљивом студенту пажњу је привукла дијафрагма која је била „песковитог изгледа“. Одсекао је део и нестрпљиво је употребио своју лупу са надом да ће открити узрок шкрипе која се чула приликом засецања дијафрагме. Када је погледао део дијафрагме кроз лупу, учинило му се да је видео малене црве, склупчане у појединачним израсталима унутар ткива. Непосредно пред одлазак у Британски Краљевски музеј у коме је могао наћи микроскоп са већим увећањем, јавио се једном од присутних хирурга који су учествовали у обдукцији. Микроскопским прегледом овог ткива пореклом од дијафрагме човека, Paget је установио присуство телашаца која се крећу, савијају и подсећају на увијене црве. Те ноћи пишући писмо брату, направио је свој први запис о „звери“ коју је открио (Campbell, W.C. 1983. a). У међувремену, хирург коме се Paget поверио односи део ткива пореклом од прегледаног леша код Richard Owena, помоћника кустоса Краљевског колеџа за хирургију који је имао првокласни микроскоп. Извршивши преглед Owen је угледао иста створења које је видео и млади James, али их је за разлику од младог и неискусног студента, описао и скицирао. Своје налазе је објавио након три недеље пред члановима Краљевског друштва, заборавивши да помене заслуге свог студента и његова прва запажања. Своје откриће Owen коначно дефинише тако што проглашава да је у питању паразит и даје му име *Trichinella spiralis*

(Blancou, 2001). Ипак, захваљујући свом раду, James Paget добија племићку титулу као веома познати патолог, док је Owen такође одликован за своје многобројне заслуге зоологији и палеонтологији. Прича се из Уједињеног Краљевства сели у Немачку, где је Rudolf Virchow са својим сарадницима у периоду од 1850. до 1870. године низом лабораторијских експеримената успео да разјасни животни циклус паразита рода *Trichinella* (Campbell, W.C. 1983.b). Тада је уведена обавезна ветеринарска инспекцијска контрола меса после клања свиња (Blancou, 2001).

Адаптација трихинеле на живот сисара, као домаћина је еволуционо врло стара (Campbell, W.C. 1983a). Постоје подаци о налазу ларви трихинеле у међуребарним мишићима египатских мумија из 1200. године пре Христа (Superlović and Djordjevic, 2003). У Србији трихинелоза код свиња откривена је први пут 1918. а 1923. године су забележени први случајеви трихинелозе људи (Superlović and Djordjevic, 2003). Контрола на кланицама у Југославији систематски је уведена 1958. године. Трихинелоза свиња је до краја седамдесетих година прошлог века успешно сузбијена до нивоа од 0,009%. Од тада се њена заступљеност прво у мањем обиму а затим нагло (период ратова и миграција становништва и животиња) повећава (0,17% у 1999. години) да би данас износила око 0,02%. Подручја на којима је трихинелоза препозната као ендемска појава проширила су се данас на више од 80% територије Србије. На годишњем нивоу број случајева трихинелозе људи износи између 100 и 200. Трихинелоза људи је и даље присутна упркос великим напорима који се чине у контроли ове зоонозе, јер постоји стално присуство паразита рода *Trichinella* код дивљих и домаћих животиња

2.2. Морфологија узрочника трихинелозе

Морфолошке разлике између врста трихинела су недовољне за разликовање врста (Superlović and Djordjevic, 2003). Све врсте су морфолошки истоветне, тако да се на основу упознавања морфологије једне врсте може упознати морфологија свих осталих врста трихинела. То је типична нематода чији је предњи део тела тањи у односу на задњи, има глатку, прстенасту и прозачну кутикулу.

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

Новорођене ларве су мале, са слабо отпорном кутикулом. После рођења оне продиру у слузокожу црева улазећи у лимфоток и крвоток. На тај начин инвадирају разна ткива и органе у домаћину, укључујући миокард, мозак, али само оне које продру у поречно-пругасте мишиће могу наставити развој. Када ларве инвадирају попречно пругасте мишиће ћелије, долази до промена у њиховој структури и оне постају ћелије неговатељице.

Инфективна ларва је облигатни интрацелуларни паразит. Захваљујући својим димензијама све врсте рода *Trichinella* су познате као примери највећих интрацелуларних паразита (Pozio, 2007). У предњем делу тела, налази се део налик бодезу, који омогућава продирање ларве у ћелију домаћина. Ту је такође смештен и једњак око кога се налажи жлездана структура - стихозом који се састоји од 5 врста ћелија названих стихоцити, а чији екскреторно-секреторни продукти имају велики значај у развоју клиничке слике трихинелозе и контроли имунског одговора домаћина. Секрети стихоцита мишићних ларви представљају антигене који се користе у имунодијагностици трихинелозе.

У литератури се користе одређени термини како би се дефинисале поједине фазе у току развоја паразита:

- Одрасли паразит (Adult Ad) – женка је дуга од 0,71 до 1,09mm иширока 25 до 40µm, док дужина мужјака износи од 0,62 до 1,58mm а ширина од 25 до 33µm;

- новорођена ларва (NBL New born larvae) – новоформирана ларва коју је створила женка паразита (дужине 80µm до 120µm, ширине 5µm до 7µm), када не постоји могућност разликовања мужјака и женке;

- мишићна ларва (L1) - прва фаза развоја у мишићној ћелији, инфективна фаза (дужине 0,65-1,45mm, ширине 0,026 - 0,040mm) која се дешава само после пенетрације ларве у цревну мукозу новог домаћина. Одређене морфолошке карактеристике омогућавају разликовање женке и мужјака;
- ћелија неговатељица – паразитска мишићна ћелија у којој ларва изазива снажне морфолошке и физиолошке промене, присутна је и код инкапсулираних и код неинкапсулираних врста;
- капсула – колагена структура која окружује комплекс ларва-ћелија неговатељица код инкапсулираних врста које паразитирају искључиво код сисара (Pozio, 2007).

2.2.1. Општа биологија

Јединствена карактеристика циклуса развоја ове нематодe која припада роду *Trichinella* јесте развој сва три животна стадијума у истом домаћину. Новорођена ларва трихинела мигрира из гравидне женке која је усађена у мукозу црева, директно у лимфне судове, затим у крвне судове и путем њих до попречно пругастих мишића у које се пробија активним радом усне хватаљке и литичких ензима. Новорођена ларва се развија у мишићној ћелији у L1 инфективну фазу (мишићна ларва) за око 15 дана. У мишићној ћелији ларва може преживети годинама до поновног уношења у новог домаћина: преко 20 година код поларних медведа (*Ursus maritimus*) и до 40 година код људи. Када нови домаћин унесе инфективно мишићно ткиво, ларве се ослобађају из мишићних ћелија у лумен желуца процесом дигестије. Одатле одлазе у танка црева, где продиру у цревне ресице и у току наредних два дана одвијају се четири фазе даљег развоја, све до одраслог облика. Мужјаци и женке се паре и 6-7 дана после инфекције, женка почиње да продукује новорођене ларве. Производња новорођених ларви се наставља још најмање недељу до две недеље или дуже. Крајњи исход је ослобађање домаћина од одраслих облика нематоде. Одрасли облици се могу наћи у цревима једино код експериментално инфицираних животиња. Врло је мала могућност налаза ларви у цревима, узорку фецеса или налаза новорођених ларви у крви код природних инфекција (Pozio, 2007).

Одрасли облици и мужјака и женке такође су интрацелуларни паразити, прецизније интрамултицелуларни паразити, инвадирају епителне ћелије на дну крипте вилуса кроз које се крећу користећи њихов цитоплазматски садржај за своју исхрану. (Despommier et al, 1994). За разлику од ларви, њихов метаболизам је аеробан, и одвија се активним транспортом супстанци мале молекулске масе преко своје површинске кутикуле или кроз поре хиподермалних жлезданих ћелија (Despommier et al, 1993). Сви развојни облици имају способност да метаболишу супстрате мале молекулске масе, синтетишући протеине, масти, ДНК и РНК (Despommier et al, 1993). Инфективна фаза је ларва (L1) која се налази у попречно пругастим мишићима домаћина. Тада се формира "ћелија неговатељица" (Despommier, 1988). Метаболизам ларве јој је искључиво анаеробан, упркос чињеници да је комплекс: ћелија неговатељица – парзит окружен мрежом крвних судова. Као и код осталих нематода, животни циклус обухвата четири ларвене развојне фазе. Наиме, након дигестије инфицираног мишића у желуцу новог домаћина ларва трихинела врло брзо пролази све фазе од L1 до L4, за само 28 сати од уношења, при чему се одмах након активирања компонената из жучи ларве смештају и све време док се „пресвлаче“ и сазревају до одраслих облика оне бораве у епителу танког црева. Присуство одраслих облика у цревима је доказано у експериментима на пацовима најраније 30-ог дана од инфекције (Despommier et al, 1993). За разлику од већине осталих нематода оне не мењају величину све док не пређу у фазу одраслих облика, када расту у дужину и остају исте ширине. После уноса мишићног ткива у коме се налази трихинела, у танким цревима новог домаћина процесом варења долази до ослобађања ларви, које тада продиру у ресице јејунума и илеума, где се одвија копулација, након чега настају новорођене ларве. Одрасле женке се задржавају у танким цревима и настављају да стварају ларве код већине домаћина неколико недеља. Свака женка продукује око 1.500 новорођених ларви. Овај број варира у зависности од врсте трихинела и врсте домаћина (Pozio et al, 2006). Новорођена ларва мигрира из танких црева лимфним и крвним системом у многа ткива, укључујући миокард и мозак. У овим ткивима бива или уништена или се враћа у крвоток. Ова миграторна фаза развоја је најпатогенија (Caro and Despommier, 1996) јер новорођене ларве могу да изазову фокална жаришта и некрозу ћелија у разним органима и ткивима са једним

изузетком: ћелија попречнопругастих мишића. Само ларве које доспеју до попречно пругастих мишића могу наставити свој развој. Као потпуно одрасла, мишићна ларва има анаеробни метаболизам. Ларве продиру кроз сарколему мишићних влакана и ту сазревају. Комплекс који се ствара између ћелије домаћина и паразита назива се ћелија неговатељица и захваљујући њему инфективна ларва опстаје месецима и годинама. Појачана циркулација која се одвија у попречно пругастим мишићима обезбеђује довољну количину хранљивих материја за опстанак паразита. Инкапулирана циста постаје калцификована у случају угинућа ларве. Након одређеног временског периода (недеље, месеци, године) долази до калцификације. Фаза која се лако препознаје у зараженом домаћину је ларва која паразитира у мишићној ћелији. Развојни циклус траје од 17 до 21 дана. Када одрасли облик паразита буде избачен из црева и мигрирајућа ларва доспе у мишићно ткиво, где формира капсулу, број ларви остаје на том нивоу. Јединка која је заражена ларвама трихинела је макар делом отпорна на нове инфекције захваљујући насталом имунитету (Pozio et al, 2006).

Имунски одговор домаћина код примарних инфекција са *T. spiralis* и *T. britovi* се разликује. За разлику од инфекција са *T. britovi* када не долази до развијања снажног имунолошког одговора, тако да су могуће реинфекције и са *T. britovi* и са *T. spiralis*, приликом заражавања домаћина са *T. spiralis* долази до развијања снажних имунолошких механизма па су реинфекције изузетно ретке (Bruschi et al, 1999, 2008).

2.2.2. Животни циклус

Уношењем комплекса ћелија неговатељица-паразит у домаћина, започиње инфекција. Зрела ћелија неговатељица је морфолошки потпуно различита од осталих ћелија сисара. Ни један други патолошки процес не доводи до стварања тако радикално различите, а опет функционалне ћелије. Комплекс ћелија неговатељица-паразит може преживети и до 30 година у организму човека. Паразит изазива имуносупресију домаћина и он га не може елиминисати у потпуности, те долази до успостављања еволуцијом дефинисаног система паразит-домаћин.

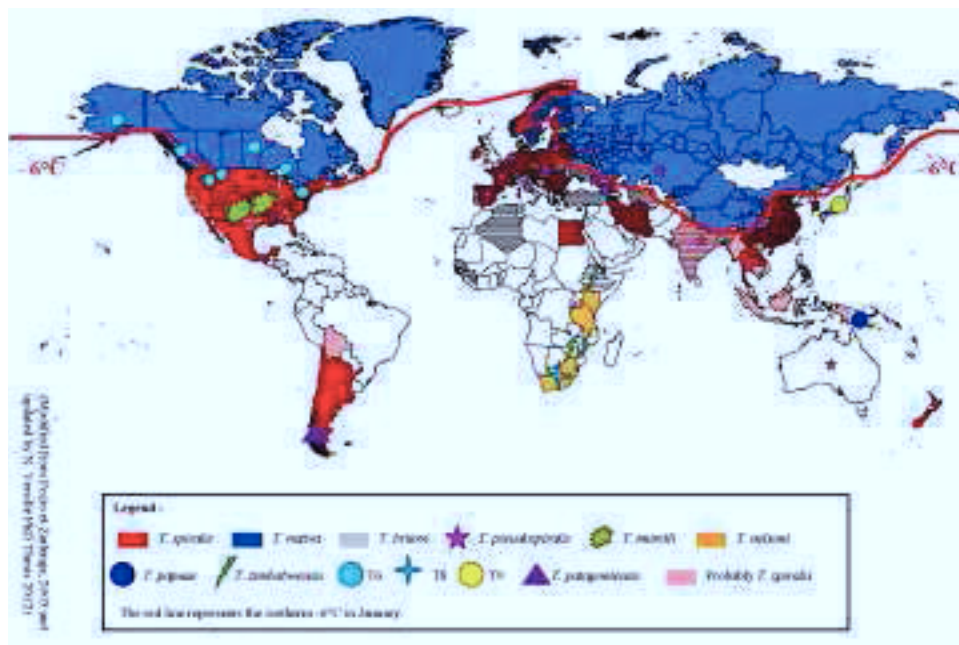
Ларве одмах буду ослобођене из ћелија неговатељица дејством ензима и бивају пренешене перисталтиком у горње две трећине танких црева. Одређена количина епикутикуларног материјала бива ослобођена дејством протеза, што омогућава да паразит прими спољне сигнале у лумену танких црева. Резултат тога је промена у понашању паразита (Caro and Despommier, 1996) јер ови стимулативни сигнали доводе до продирање паразита у епител. После копулације мужјак угине и бива избачен из организма домаћина. Оплођена женка пробија зид танког црева и продире до лимфних простора и у току наредних 30 сати развија се у одрасли облик. Период гестације траје 5 дана, а затим женка почиње да доноси живе новорођене ларве у цревним ресицама јејунума и илеума. Ларве се рађају континуирано у наредних неколико дана, различитим интензитетом у зависности од многобројних фактора, укључујући и имунитет домаћина. Тако број ларви веома варира од домаћина до домаћина, у зависности од старости, пола исте врсте (Despommier, 1993). Фаза развоја која се одвија у цревима код већине сисара, укључујући и човека, траје 2-3 недеље. Пут из црева се одвија преко лимфног и крвног система. Новорођене ларве насељавају сва ткива. Ларве које не доспеју у попречно пругасте мишиће, циркулацијом доспевају у ћелије других ткива и доводе до њихове смрти. Само ћелије скелетних мишића омогућавају даљи развој паразита (Jasmer, 1995). Када новорођена ларва продре у ову врсту ћелије, остаје у њој и започиње следећу фазу развоја, сада као интрацелуларни организам. У току 20 дана, ларва доводи до промена у ћелији присиљавајући је да се из контрактилне ћелије трансформише у ћелију која ће јој помоћи да достигне своју инфективност. Већ петог дана после инфекције, долази до растварања миофибрила, петнаестог дана долази до наглог повећања једра ћелије попречно пругастих мишића. Такође, десетог дана од инфекције настаје колгена заштита око инфициране ћелије. Ћелија неговатељица тако постаје животна потпора за паразит и може га тако одржати за дужи временски период, месец дана до годину (Despommier, 1993). Овакав еколошки систем опстанка, омогућава овој нематоди да се креће са својим домаћинима и буде широко географски распрострањена. Облик ћелија неговатељица је директни резултат реакције између домаћина и паразита. Огроман број ларви угине и остатак комплекса ћелија неговатељица - паразит калцификује (Gerwel et al, 1970). Инкапсулиране ларве су инфективне,

нису полно зреле и резистентне су на дејство физичких фактора. У самим ћелијама ларви налази се велика количина гликогена, који је главни извор енергије за паразит који веома брзо расте. Када пријемчива јединка поједе заражено месо, капсула буде сварена дејством ензима система за варење домаћина. Тако ослобођена ларва продире у мукозу црева, даље се развија, расте и у току сазревања се четири пута пресвлади.

2.3. Класификација узročника трихинелозе - таксономска подела врста рода *Trichinella*

Род *Trichinella* припада по систематизацији Stewart, 2003 класи Aenophorea, поткласи Ecnolia, реду Trichurata, супефамилији Trichocephaloidea, фамилији Trichinellide. Суперфамилија Trichinelloidea, којој припада *Trichinella*, дијагностикује се филогенетски по шизостоми, регији жлезданог езофагуса и штапићастим тракама, структурама које нису познате код осталих нематода (Zarlenga et al., 2006). У току првих 150 година научног познавања паразита *Trichinella* spp. као узročника трихинелозе код више од сто идентификованих врста сисара као домаћина, *T. spiralis* је била позната као једини представник рода (Campbell, 1983b). Тек са развојем молекуларних дијагностичких метода, посебно ланчане реакције полимеразе (PCR), извршена је тачна таксономска подела паразита и дефинисане су остале врсте у оквиру рода (Zarlenga et al., 1999). Биохемијске методе које се заснивају на различитости ензима паразита у њиховом аминокиселинском саставу, што за последицу има постојање разлика у покретљивости у електрофоретском пољу, омогућавају разликовање врста рода *Trichinella* (Zarlenga i La Rosa, 2000) Могућност заражавања једног домаћина са више врста рода *Trichinella* је описана у регионима у којима је присутан већи број врста овог паразита (Pozio and Murrell, 2006).

Трихинелоза је космополитска паразитска зооноза присутна широм земаљске кугле, са изузетком Антарктика (Слика 1).



Слика 1 – Дистрибуција познатих врста рода *Trichinella* у свету (Pozio and Zarlenga, 2005)

Разликују се две главне групе у роду *Trichinella*, једна која обухвата врсте које доводе до стварања капсуле и друга група којој припадају врсте које нису инкапулиране у мишићном ткиву домаћина (Pozio and Murrell, 2006). За сада је идентификовано девет врста и три генотипа (Pozio and Zarlenga, 2013.), који су именовани као *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa* и њој сродан генотип *Trichinella T6*, *Trichinella britovi* и њој сродан генотип *Trichinella T8*, *Trichinella murreli* и њој сродан генотип *Trichinella T9*, *Trichinella patagoniensis*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella T12*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae* и *Trichinella zimbabwensis* (Табела 1). Све врсте рода *Trichinella*, осим последње три, карактерише формирање капсуле од колагена око измењене мишићне ћелије у којој се развила инфективна, мишићна ларва (формација позната као „ћелија неговатељица“). Како не постоји јасна морфолошка разлика између врста и генотипа, оне се могу разликовати на основу биохемијских и молекуларних испитивања.

Табела 1 - Таксономска шема генуса *Trichinella* (Pozio et al., 2009b)

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

Trichinella spiralis (назива се и **T-1**) је врста кој је прва откривена и до сада је највише описивана. Присутна и код домаћих и код дивљих животиња у природи, високо инфективна за лабораторијске животиње, *Trichinella spiralis* представља веома често модел у разним биолошким истраживањима. Распрострањена је у регионима са умереном климом и пре свега повезана са циклусом домаћих свиња. Ширењу овог паразита, заједно са домаћинима у великој мери је допринела колонизација Европљана на Амерички континент, Нови Зеланд, Хаваје и Египат у току XVI и XX века. Слаба отпорност на ниске температуре је највероватнији разлог смањеног ширења унутар животињских врста које живе у хладнијем појасу Земље. Ова врста је високо инфективна за свиње, пацове и мишеве. Примарно је врста која се налази код домаћих свиња, дивљих свиња, коња и пацова, али се може наћи и код дивљих животиња нарочито у близини фарми где се одвија преношење из домаћег у циклус дивљих

животиња. *Trichinella spiralis* је врста која је идентификована код 87% изолата из домаћих свиња, код 67% из дивљих свиња, из 88% домаћих коња, из 79% синантропних пацова и само два изолата из синантропних оклопника (*Chaetophractus villosus*) (Pozio and Murrell, 2006). У многим деловима света, у трагању за храном, пре свега због могућности приступа отпадима на депонијама, близу људских насеља, где се одлажу отпаци са кланица, ова врста је пренета на дивље животиње, као што су шакал, црни и бели медведи (*Ursus americanus*, *Ursus arctos*), лисице (*Pseudolopex gracilis*, *Urocyon cinereoargenteus*, *Vulpes vulpes*), вукови (*Canis lupus*), јазавци (*Meles meles*), пуме (*Puma concolor*), ракун (*Nyctereutes procyonoides*), рис (*Lynx rufus*) (Pozio and Murrell, 2006). На територији Америке, Европе и Азије *Trichinella spiralis* је паразит дивљих животиња који се одржава у природи у сивлатичном циклусу (Pozio and Zarlenga, 2005). То је врста која је најчешћи етиолошки агенс у случајевима обољења трихинелозе људи и ретких смртних случајева широм света.

***Trichinella nativa* (Т-2)** је врста адаптирана на хладније климатске услове. У арктичком и субарктичком региону Америке, Европе и Азије је узрочник трихинелозе људи и широко је распрострањена код дивљих животиња тих регија. Експериментално је постављена јужна граница на изотермама -5°C до -4°C у јануару (Pozio and Zarlenga, 2005). Основна биолошка карактеристика ове врсте је низак репродуктивни индекс код лабораторијских пацова, домаћих и дивљих свиња, као и висока отпорност на смрзавање када се налази у мишићима месоједа (Pozio and Murrell, 2006). Уобичајни домаћини су копнени и морски месоједи који живе у арктичкој и субарктичкој регији: неколико врста куна (*Martes pennant*, *Martes martes*, *Martes zibellina*, *Meles meles*, *Gulo gulo*, *Mustela erminea*, *Mustela nivalis*), арктичка лисица (*Alopex lagopus*), црвена лисица (*Vulpes vulpes*), вук (*Canis lupus*), ракун (*Nyctereutes procyonoides*), домаћа и дивља мачка (*Felis silvestris*, *Felis euptylura*), рис (*Lynx lynx*), сибирски тигар (*Panthera tigris*), црни медвед (*Ursus americanus*), браон медвед (*Ursus arctos*), поларни медвед (*Ursus maritimus*), морж (*Odobenus rosmarus*) и неколико врста фока (*Phoca roenlandica*, *Phoca fasciata*, *Erignathus barbatus*, *Pusa hispida*). Има врло ограничену инфективност за свиње и врло се ретко налази код домаћих и дивљих свиња.

Важност дивљих месоједа као резервоара *T. nativa* у природи је потврђена и чињеницом да овај паразит преживљава у мишићима ових домаћина и преко 20 година. Забележени су случајеви инфекције људи који у конзумирали сирово месо заражених моржева, медведа и друге дивљачи (Pozio and Murrell, 2006).

***Trichinella britovi* (Т-3)** је утврђена углавном код дивљих животиња, мада се повремено проналази код свиња и коња. Изолати пореклом из Европе и Азије су названи по Руском научнику Бритову (Britov and Voev, 1972; Shaikenov and Voev, 1983; Pozio et al., 1992). Широко је распрострањена у умереном појасу Европе и Азије, од Иберијског полуострва до Далеког Истока, све до јужног дела Северне и Западне Африке, што је чини географски најраспрострањенијом врстом. Северна географска граница је одређена изотермама -6°C до -5°C у јануару. Тако је неколико пута забележена мешовита инфекција истог домаћина са *T. britovi* и *T. nativa* у подручју са изотермама између -4°C и -6°C , на територији Естоније, Финске и Литваније (Pozio and Murrell, 2006). *Trichinella britovi* је врста која преовлађује код силватичних месоједа као што је: куна (*Meles meles*, *Martes foina*, *Martes martes*, *Lutra lutra*), фамилија Viverrida (*Nandinia binotata*, *Viverra civetta*), црвена лисица (*Vulpes vulpes*), шакал (*Canis aureus*), вук (*Canis lupus*), мрки медвед (*Ursus arctos*). Идентификована је у 83% изолата код црвених лисица (*Vulpes vulpes*), 30% код дивљих свиња (*Sus scrofa*) и 11% код домаћих свиња (*Sus scrofa domestica*) на територији Европе. Забележени су случајеви заражавања мрког пацова (*Rattus norvegicus*) који живи на фармама или ђубриштима на територији Италије и Естоније. Могућност заражавања људи са *T. britovi* постоји код конзумирања меса дивљих свиња (*Sus scrofa*), црвених лисица (*Vulpes vulpes*), шакала (*Canis aureus*), коња (*Equus caballus*) и домаћих свиња (*Sus scrofa domestica*) које се гаје слободно или се хране отпаcima пореклом од дивљих месоједа (Pozio and Murrell, 2006).

***Trichinella murrelli* (Т-5)** је врста која је раширена код дивљих месоједа: дивља мачка (*Lynx rufus*), мрки медвед (*Ursus americanus*), којот (*Canis latrans*), ракун (*Procyon lotor*), куна златица (*Martes americana*), црвена лисица (*Vulpes vulpes*), али и код домаћих животиња (пас, коњ, мачка) на територији Сједињених

Америчких Држава (Калифорнија, Конектикат, Џорџија, Илиноис, Индиана, Мериленд, Нови Мексико, Пенсилванија, Вирџинија, Висконсин и Тексас), код дивљих животиња у регији Ванкувера у Канади (Pozio and Murrell, 2006). До сада није забележен случај природног заражавања домаћих свиња, али је код коња утврђена могућност природне инфекције. Изотерма од -6°C у јануару се може дефинисати као северна граница дистрибуције ове врсте. Јужна граница није тачно дефинисана због недостатка података са територије Мексика и Централне Америке. Мешовита инфекција истог домаћина мрког медведа (*Ursus americanus*) са *T. murrelli* и *T. spiralis* је забележена у Калифорнији. Инфекција људи настаје као последица конзумирања термички необрађеног меса дивљачи, најчешће мрког медведа (*Ursus americanus*) и коњског меса. Значајне информације о клиничкој манифестацији код људи су прикупљене приликом епидемије у Француској 1985. која је настала као последица конзумирања коњског меса увеженог са територије Сједињених Америчких Држава (Ancelle, 1998).

Trichinella nelsoni (Т-7) се спорадично проналази код дивљих животиња у источној Африци (од Кеније до Јужне Африке). Постоји могућност много шире географске дистрибуције, јер су подаци оскудни и заснивају се само на неколико организованих истраживања. Као домаћини јављају се: пругаста и пегава хијена (*Hyena hyena*, *Crocuta crocuta*), пругасти шакал (*Canis adustus*), мрки шакал (*Canis mesomelas*), лисица са мишоликим ушима (*Otocyon megalotis*), домаћи пас (*Canis lupus familiaris*), лав (*Panthera leo*), леопард (*Panthera pardus*), гепард (*Acinonyx jubatus*), афричка дивља мачка (*Leptailurus serval*). Утврђена је код врста дивљих свиња у Африци (*Potamochoerus larvatus*, *Phacochoerus aethiopicus*), чије месо је било узрок заражавања људи (Nelson, 1970). Забележено је мање од стотину случајева заражавања људи овом врстом *Trichinella* у Кенији и Танзанији. *Trichinella nelsoni* показује нижу инфективност за лабораторијске глодаре и свиње (Nelson et al., 1966; Kapel and Gamble, 2000) у односу на *T. spiralis*, али већу у односу на *T. nativa*. Карактерише је већа отпорност на више температуре у односу на остале врсте (за $2-3^{\circ}\text{C}$ више).

Trichinella T-12 је новооткривена инкапсулирана врста код сисара месождера у Јужној Америци. Утврђена је код кугуара (*Puma concolor*) у Аргентини. Као нови генотип је дефинисана на основу молекуларних истраживања, коришћењем митохондријалних и рибонуклеинских маркера, при чему је утврђена највећа биолошка сличност са *T. britovi* и *T. murrelli*. Ларве које су паразитирале у мишићима месождера задржавале су инфективност за мишеве и после замрзавања на -5°C у трајању од три месеца, али је инфективност изгубљена после замрзавања на -18°C у трајању од седам дана. Регија DNК, позната као сегмент В је показала јединствену секвенцу која се разликује од свих до сада познатих генотипова у оквиру рода *Trichinella*. Подаци о биолошким, географским и молекуларним особинама дају основу за класификацију новог генотипа *Trichinella T12* као нове врсте широко распрострањене у Неотропском региону, за коју је дат предлог имена: *Trichinella patagoniensis* sp. (Krivokapich et al., 2012).

Три генотипа рода *Trichinella* које немају капсулу су: T-6, T-8 и T-9.

Trichinella T-6 је нађена код месождера браон и мрког медведа (*Ursus americanus*, *Ursus arctos*), вука (*Canis lupus*), сиве лисице (*Urocyon cinereoargenteus*), којота (*Canis latrans*), прождрљивца (*Gulo gulo*), куне златице (*Martes pennanti*), пуме (*Puma concolor*), дивље мачке (*Lynx rufus*) на територији арктичке и субарктичке регије Канаде, дуж планинског венца стеновитих планина и Апалахија (Rocky Mountains и Appalachians) у САД (Аљаска, Ајдахо, Монтана, Охајо, Пенсилванија, Вајоминг и Онтаријо) (Pozio and Murrell, 2006). Слична је врсти *Trichinella nativa* по неким биолошким карактеристикама, као што је отпорност на температуре смрзавања у мишићима месоједа, ниска инфективност за лабораторијске пацове и мишеве и домаће и дивље свиње (Kapel and Gamble, 2000). Описана је способност укрштања са *Trichinella nativa* у лабораторијским условима и природи, код вукова (*Canis lupus*) на Аљасци (La Rosa et al., 2003). Значајно се разликује по биохемијским и молекуларним карактеристикама, али је њена раширеност на северном делу Земљине полулопте мања.

Trichinella T-8 је забележена једино у Африци, код лавова (*Panthera leo*) на територији Националног парка Етхоса у Намибији и код пегаве хијене (*Crocuta crocuta*) у Националном парку Кругер у Јужној Африци, где опстаје заједно са *T. nelsoni*. Слична је *T. britovi*, али се од ње ипак разликује по биохемијским и морфолошким карактеристикама (Pozio et al., 1992).

Trichinella T-9 се јавља код дивљих животиња у Јапану и може се јасно разликовати од *T. britovi* молекуларним техникама. На самом почетку је идентификована као *T. britovi* која је нађена код дивљих животиња у Јапану. Као домаћини идентификовани су: ракун (*Nyctereutes procyonoides*), јапански мрки медвед (*Ursus thibetanus*), црвена лисица (*Vulpes vulpes*) на острву Хокаидо, где опстаје заједно са *T. nativa*. До сада није забележен ни један случај заражавања људи са T-8 или T-9 (Pozio and Murrell, 2006).

За сада су утврђене три врсте рода *Trichinella* које не доводе до формирања капсуле у домаћинима (сисари, једна врста птица и две врсте рептила). То су *T. pseudospiralis*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis*.

Trichinella pseudospiralis је космополитска врста *Trichinella*, нађена код 14 врста сисара и 13 врста птица (Pozio, 2005, Petrov et al., 1999) и то у много већем броју код сисара, на територији Европе, Азије, Северне Америке и Аустралије. Три популације које се могу на основу молекуларних особина издвојити су нађене у области Палеартика, Неарктика и Аустралије (Тасманија) (La Rosa et al, 2001). У литератури је забележен случај заражавања човека у Тасманији, као и три епидемије у којима је заражено деведесет и двоје људи на Камчатки, Тајланду и Француској (Pozio and Murrell, 2006). У 21. веку забележено је присуство и у земљама у окружењу, као што је Хрватска (Back et al., 2009) и Босни (Софронић лична комуникација).

Trichinella papuae је пронађена код домаћих и дивљих свиња (*Sus scrofa*), фармских крокодила (*Crocodylus porosus*) који су храњени сировим свињским месом у Папуа Новој Гвинеји (Pozio 2001b, Pozio et al., 2005, Pozio and Murrell, 2006). У експерименталним условима показује високе репродуктивне капацитете

код крокодила и гуштера (*Varanus exanthematicus*, *Caiman crocodylus*), али веома мале код корњача и питона (*Python molurus*, *Pelomedusa subrufa*). Захваљујући способности да доведе до инфекције гмизаваца, представља потенцијални инфективни агенс за људе који конзумирају месо корњача и гуштера, што може бити објашњење за раније забележене случајеве заражавања људи који су конзумирали месо корњача и браон гуштера (*Varanus nebulosus*) на Тајланду (Khamboonruang, 1991).

Trichinella zimbabwensis је слична врсти *T. papuae*, пре свега због способности да инфицира и гмизавце и дивље месождере (*Python molurus*, *Pelomedusa subrufa*, *Varanus exanthematicus*, *Caiman crocodylus*). Када је први пут идентификована ова врста, утврђено је њено присуство код 256 (39,5%) фармских крокодила на Нилу (*Crocodylus niloticus*) и код 18 (62,1%) фармских крокодила Зимбабвеа. Забележени су случајеви природне инфекције у Африци (Зимбабве, Мозамбик, Етиопија), само код фармских гмизаваца (*Crocodylus niloticus*, *Varanus niloticus*), али не и код људи. Експериментално је доказана инфективност за свињу, миша, пацова, хрчка, лисицу (*Vulpes vulpes*), и мајмуна (*Papio spp.*, *Cercopithecus aethopis*) (Pozio and Murrell, 2006; Pozio et al., 2007).

Веома важна особина овог паразита, која олакшава његово преношење јесте физиолошки механизам преживљавања ларве у мишићном ткиву који је захваћен трулежним процесима. Упркос чињеници да ларва доводи до ангиогенезе око ћелије неговатељице, после уласка ларве у мишићну ћелију метаболизам ларве је анаеробан (Desprommier, 1990), што је од великог значаја за њено преживљавање у мишићном ткиву које је захваћено трулежним процесима. Временски период преживљавања је дужи код инкапсулираних у односу на неинкапсулиране врсте. Период преживљавања ларве у месоу које је захваћено трулежним процесима зависи и од услова средине, као што су степен влажности и температура средине. Ова фаза развоја одговара фази јаја већине осталих нематода (Pozio and Murrell, 2006).

2.4. Отпорност паразита

У току истраживања Pozio and Murrell (2006) су утврдили могућност преживљавања *T. britovi* и до годину дана, као и опстанка *T. nativa* и *Trichinella* T6 у трајању од неколико година у замрзнутом мишићном ткиву стрвинара. То поткрепљује велику вероватноћу заражавања животиња које се слободно крећу у дивљини или домаћих животиња којима су доступни отпаци животињског порекла (лешеви, делови трупова закраних животиња). Два одвојена механизма као што су анаеробан метаболизам (Despommier, 1990) и отпорност на веома ниске температуре омогућавају преживљавање у условима замрзавања. Ниска температура и висока влажност повећавају могућност опстанка ларви чак у потпуно разграђеном мишићном ткиву услед трулежних процеса. Отпорност је највећа на температурама од 0°C до -18°C (Табела 2).

Табела 2. Отпорност различитих врста и генотипова рода *Trichinella* у мишићном ткиву различитих животињских врста (подаци добијени у експерименталним условима) (Dupouy-Camet and Bruschi, 2007)

<i>Trichinella</i> - врста или генотип	Домаћин	Температура	Време опстанка
<i>T. nativa</i>	Поларна лисица (<i>Alopex lagopus</i>)	-18°C	4 године
	Поларна лисица (<i>Alopex lagopus</i>)	-18°C	12 до 14 месеци
	Поларна лисица (<i>Alopex lagopus</i>)	-18°C	3 године
	Поларни медвед (<i>Ursus maritimus</i>)	-18°C	5 година
	Поларни медвед (<i>Ursus maritimus</i>)	-18°C	6 месеци
	Ракун (<i>Procyon lotor</i>)	-18°C	9 месеци
	Лабораторијски миш	-10°C	8 до 22 дана
<i>Trichinella</i> T6	Гризли медвед (<i>Ursus arctos horribilis</i>)	-65°C до -20°C	34 месеца
	Лабораторијски миш	-10°C	5 до 13 дана
<i>T. britovi</i>	Вук (<i>Canis lupus</i>)	-20°C	6 месеци
	Црвена лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	-15°C	11 месеци
	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	-20°C	3 недеље
	Лабораторијски миш	-10°C	4 до 7 дана
<i>Trichinella</i> T5	Лабораторијски миш	-10°C	12 до 108 сати
<i>T. spiralis</i>	Лабораторијски миш	-10°C	12 до 48 сати
<i>T. nelsoni</i>	Лабораторијски миш	-10°C	не преживљава
<i>T. pseudospiralis</i>	Лабораторијски миш	-10°C	не преживљава

Важно је истаћи да се способност преживљавања мишићне ларве на температурама смрзавања одвија углавном када ларве паразитирају у попречно пругастим мишићима месоједа, као што су медведи (*Ursidae*), вукови (*Canis lupus*), лисице (*Vulpes vulpes*), док се период преживљавања значајно скраћује на неколико дана или недеља када исте врсте паразитирају у мишићима других сисара, као што су свиње (*Sus scrofa*) или глодари (*Rodentia*). Развој колагене капсуле код инкапсулираних врста, потпомаже њен опстанак у трулом ткиву (Jovic et al., 2001) (Табела 2).

2.5. Иmunски одговор

Ларве трихинела у организму домаћина доводе до сложеног ћелијског и хуморалног имунског одговора у току цревне фазе, као и фазе миграције кроз организам, па све до периода боравка ларви у мишићима. Специфична антителига IgA, IgM и IgG се обично налазе две до три недеље после уношења ларви у организам. IgG показују највиши ниво од свих имуноглобулина и могу се открити у току дужег временског периода. Важно је истаћи да фактори као што су специфичност животињске врсте која се испитује, разлике у индивидуалном имунском одговору јединки, присуство матерналних антителига, синдром имунодефицијенције могу компромитовати резултате теста (Nockler et al., 2000). Најранији период инфекције ларвама трихинела, познат као “дијагностички прозор“ током кога долази до инкапсулирања ларви се завршава најраније за 17 дана, али се тада антителига још увек не могу утврдити. У том периоду се могу добити лажно негативни серолошки резултати у поређењу са директним методама (OIE, 2008). У уобичајним околностима, ниво антителига у крвном серуму после достигнутог највишег нивоа, полако опада. Осим у експерименталним, у природним условима није могуће одредити у ком је тренутку од момента инфекција узоркована крв (Nockler et al., 2000).

Најзаступљенији антигенски епитоп који препознаје организам домаћина је такозвана TSL-1 група, која се налази у ћелијама стихоцита и на површини паразитске кутикуле. Њих активно производе ларве прве фазе развоја у мишићима (Appleton et al., 1991; Ortega-Pierres et al., 1996). TSL-1 антигенски епитоп

препознаје антитета свих животиња и људи заражених врстама рода *Trichinella* (Appleton et al., 1991).

2.5.1 Имуни одговор код различитих врста животиња

Свиње

Многобројна експериментална испитивања на популацији свиња инфицираних са *T. spiralis* показала су да је време сероконверзије уско повезано са степеном инфекције и бројем ларви у мишићном ткиву домаћина (Табела 3).

Табела 3 – Однос између сероконверзије и инфективне дозе (*T. spiralis*) код свиња (Smith and Snowdon, 1989, Gamble, 1996, Nockler et al, 2005), коња (Gamble et al, 1996, Voigt et al, 1997), дивљих свиња (*Sus scrofa*) (Kapel, 2001), црвених лисица (*Vulpes vulpes*) (Moller et al, 2005) и сребрних лисица (*Vulpes vulpes fulva*) (Nockler and Voigt, 1997)

Врста животиње	Инфективна доза (број ларви по животињи)	Број ларви у граму испитујућег узорка	Време сероконверзије (после инфекције, изражено у недељама)
Свиње	100	1,62- 6,50(a)	5-7
	500	18,4-48,6(a)	4-5
	1000	26,3-90,6(г)	4-6
	2.500	87,6-99,5 (a)	4
	8.000	12,1-81,4 (б)	3
	20.000	699,2-1103,5 (г)	3-4
	64.000	221,4-466,6(б)	2,5-3
Коњи	1.000	0,10-0,26 (a)	3-4
	4.000	0,39-7,8 (a)	3-7
	5.000	0,02-8,9 (г)	2-4,5
	10.000	6,6-60,0 (a)	3-4
	40.000	484- 1060 (в)	2-3
Дивље свиње	10.000	43-100 (г)	3-4
Сребрна лисица	500	7,4-14,7 (г)	4-6
	2.000	4,7-66,9 (г)	2
Црвена лисица	10.000	7,7 202,7 (г)	3

а) језик

б) мешавина језика, жвакаћих мишића, дијафрагме, међуребарних и трбушних мишића

в) жвакаћи мишићи

г) дијафрагма

У случају вештачке инфекције са 100 ларви, ELISA тестом је утврђена сероконверзија након 5-7 недеља, док је вештачка инфекција са 500 ларви

доводила до сероконверзије за 4-5 недеља. Антитела су се могла утврдити након 4 недеље после инфекције са 2500 ларви *T. spiralis* (Gamble, 1996, 1998). Са повећањем броја ларви на 8.000 и 64.000 по свињи сероконверзија је утврђена раније, већ 2,5 до 3. недеље од инфекције (Smith and Snowdon, 1989). Слични резултати су добијени у експерименту са свињама расе Јоркшир и Ибериан (гајеним у специјалним условима слободним од других патогена) које су биле инфициране са 100, 1.000 и 20.000 ларви *T. spiralis* по јединки (Nockler et al., 2005). Током истог истраживања, у мишићном ткиву свиња инфицираних са истим бројем ларви *T. pseudospiralis* и *T. britovi*, методом вештачке дигестије утврђен је мањи број ларви по граму (LPG) мишићног ткива у поређењу са инфекцијом изазваном са *T. spiralis*, што је за последицу имало и каснију сероконверзију, 8. до 10. недеље од инфекције. Код инфекције са 1.000 и 20.000 ларви *T. nativa* по јединки, установљена је сероконверзија код свиња код којих или није утврђено присуство ларви у мишићном ткиву или се радило о само неколико мишићних ларви. Овај феномен се објашњава развојем имунског одговора још за време цревне фазе и/или миграционе фазе ларви после инфекције (Nockler et al., 2005). Приликом експерименталне инфекције свиња са *T. nativa*, *T. murrelli* и *Trichinella* Т6, ниво антитела код свиња као лоших домаћина за ове врсте рода *Trichinella* је опадао упоредо са смањењем броја мишићних ларви, док је код инфекција изазваних са *T. spiralis*, *T. britovi* и *T. nelsoni* ниво антитела био висок, највероватније захваљујући израженој антигенској стимулацији мишићних ларви ових врста рода *Trichinella* (Kapel and Gamble, 2000), при чему *Trichinella* антитела код заражених свиња остају дуго присутна (Nockler et al., 1995).

Коњи

Код коња експериментално инфицираних са 1.000, 4.000, 10.000 и 40.000 ларви *T. spiralis* по јединки, сероконверзија је утврђена 2. до 7. недеље након инфекције (Gamble et al., 1996, Hill DE et al., 2007, Sofronic et al., 2005) док је код експерименталне инфекције са 5.000 ларви *T. spiralis* по коњу, сероконверзија утврђена 2. до 4.5 недеље после инфекције (Табела 3). Код ове врсте за разлику од свиња, полуживот IgG је релативно кратак. Ниво антитела почиње да опада 15. недеље, када су инфективне ларве још увек присутне у мишићном ткиву (Voigt et

al., 1997). Подаци о инфекцији понија са 50.000 ларви *T. spiralis*, *T. britovi* и *T. pseudospiralis* указују на врло брзу сероконверзију 2. до 3. недеље после инфекције која достиже највиши ниво 8. недеље и затим нагло опада. Просечан број ларви по граму (LPG) мишићног ткива био је 112, 5 и 66 када је сероконверзија утврђена 10. недеље по инфекцији са ове три врсте *Trichinella* (Kapel, необјављени подаци). Изнети подаци потврђују ранија истраживања која су показала да ниво специфичних антитела пада испод граничне вредности за детекцију ELISA тестом у 14. недељи након инфекције (Soule et al., 1989, 1993), тако да нису ни утврђена код природно заражених коња упркос налазу великог броја ларви у мишићном ткиву методом вештачке дигестије (Pozio et al., 1997, 1998, 1999). Тестом индиректне имунофлуоресценције (IFT) присуство антитела било је могуће утврдити до 32. и 40. недеље после инфекције (Soule et al., 1989; Pozio et al., 2002; Murrel et al., 2004). На основу досадашњих добијених резултата ICT не препоручује серолошке методе за индивидуална као и за епизоотиолошка испитивања код коња (Gamble et al., 2004).

Дивље свиње

Током једног експерименталног истраживања, 36 дивљих свиња је инфицирано са девет различитих врста рода *Trichinella*, при чему је праћена дистрибуција ларви у инфицираним јединкама и титар антитела (Kapel, 2001). Присуство специфичних антитела је утврђено код свих дивљих свиња од 3. до 5. недеље после инфекције (Табела 3). Висок ниво специфичних антитела за *T. spiralis* и *T. nelsoni* је утврђен у периоду од 70 дана после инфекције, док је сероконверзија за неинкапсулирану врсту *T. pseudospiralis* утврђена нешто касније. Титар антитела је остао исти код дивљих свиња инфицираних са *T. spiralis*, *T. britovi* и *T. nelsoni*, али је опадао код оних инфицираних са *T. nativa*, *T. murrelli* и *Trichinella* Т6, што се сматра директном последицом веома брзог смањења броја ларви у мишићном ткиву (Kapel, 2001).

Остале врсте животиња

Експериментално инфицирана популација сребрних лисица (*Vulpes vulpes fulva*) са 500 и 2.000 ларви *T. spiralis* показала је сероконверзију 4. до 6. недеље

после инфекције (Табела 3). Дугорочна истраживања лисица у природним условима показала су могућност утврђивања специфичних IgG до 76 недеља после инфекције. Овај период се уствари поклапа са просечним трајањем животног века лисице у природном станишту (Nockler and Voigt, 1997). Слични резултати су добијени током истраживања спроведеног на лисицама (*Vulpes vulpes*) гајеним у контролисаним условима, када су лисице орално инфициране са 150 ларви *T. spiralis* по килограму телесне масе. Висок ниво специфичних IgG је утврђен 3. до 7. недеље после инфекције и остао је на том нивоу у току целог периода посматрања (700 дана) (Wacker et al., 1999). Код црвених лисица (*Vulpes vulpes*) експериментално инфицираних са девет различитих врста *Trichinella* (10.000 ларви по јединки) све испитиване лисице су показале резултате сероконверзије 3. недеље после инфекције. Висок титар антитела се задржао све до краја експеримента (40. недеље по инфекцији).

2.6. Филогенетска истраживања

Циљ филогенетских истраживања управо је постављање хипотезе о еволуцијском развоју таксономских група проучаваног узрочника. Филогенеза врста и генотипова рода *Trichinella* је изучавана коришћењем варијација три гена: једарни SSU rDNA и ITS2, митохондријални LSU rDNA и COI DNA (Zarlenga et al., 2006). Добијени резултати су показали да су се постојеће врсте трихинела успоставиле и гранале у последњих 10 до 20 милиона година, што се поклапа са раздвајањем фамилија *Suidae* од фамилије *Tayassuidae* током периода Раног Миоцена. *Trichinella spiralis* се сматра најстаријом инкапсулираном врстом (Zarlenga et al., 2006).

2.7. Биогеографија

Изучавањем биогеографије инкапсулираних врста и генотипова *Trichinella* Zarlenga et al. (2006), дошло се до закључка да је порекло овог стабла из Источне Азије. У току Раног Миоцена и периода Плеистоцена, дошло је до три независна догађаја спајања континената и преласка *T. nelsoni*, *Trichinella* T8 и *T. britovi* из Евроазије на Афрички континент. На основу биохемијских подударности Pozio E. et al. 2005 је утврђено да је најскорији догађај пренос *T. britovi* из Западне Европе

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

2.8. Слободно живећа фаза - The 'free-living' stage

Веома важна особина овог паразита, која олакшава његово преношење јесте физиолошки механизам преживљавања ларве у мишићном ткиву који је захваћен трулежним процесима. Упркос чињеници да ларва доводи до ангиогенезе око ћелије неговатељице, после уласка ларве у мишићну ћелију метаболизам ларве је анаеробан (Desrommier, 1990), што је од великог значаја за њено преживљавање у мишићном ткиву које је захваћено трулежним процесима. Временски период преживљавања је дужи код инкапсулираних у односу на неинкапсулиране врсте. Период преживљавања ларве у месу које је захваћено трулежним процесима зависи и од услова средине, као што су степен влажности и температура средине. Ова фаза развоја одговара фази јаја већине осталих нематода (Pozio and Murrell, 2006).

2.9. Епидемиологија и епизоотиологија

Трихинелоза домаћих животиња (пре свега свиња) регистрована је у 43 земље (од 198 земаља, тј. 28,9%), дивљачи у 66 земаља (33,3%), људи у 55 земаља (27,8%) на подручјима Европе, Северне и Јужне Америке, Африке, Азије и Пацифика. Пренос различитих врста рода *Trichinella* је уско повезан са екологијом и врстом домаћина. Приликом истраживања овог паразита идентификована су два циклуса његовог боравка у природи: силватични (популација дивљих животиња) и домаћи циклус (популација домаћих животиња). Оба циклуса су уско повезана захваљујући присуству синантропних животиња (пацови, лисице, крзнашице, мачке, пси и др). Силватични циклус је присутан на

свим континентима, са изузетком Антарктика (за који нема података). Степен присутности сивлатичног циклуса је директно одређен присуством потенцијалних домаћина у том региону. У домаћем циклусу (преношење заразе унутар популације домаћих животиња) постоји неколико основних извора заражавања. Ти извори су: а) исхрана домаћих животиња отпацама хране који могу садржати делове термички недовољно обрађеног трихинелозног свињског меса и/или изловљене дивљачи; б) могућност приступа домаћих животиња лешевима трихинелозних свиња; ц) присуство трихинелозних дивљих животиња у необезбеђеном простору за слободно напасање. Иако је најчешћи етиолошки агенс домаћег циклуса *T. spiralis*, јер је добро адаптирана на свиње као домаћина, постоје забележени случајеви присуства *T. britovi* и *T. pseudospiralis* у домаћем циклусу, када основни извор инфекције за домаће свиње представљају отпаци у којима се налази месо инфициране дивљачи. Присуство паразита код домаћих и дивљих животиња, само по себи не представља значајан ризик да ће се обољење појавити код људи. Трихинелоза људи повезана је са културолошким навикама као што је исхрана сировим или недовољно термички обрађеним месом или производима од меса различитих врста животиња у којима се налазе инфективне, мишићне ларве трихинеле. Дијагностиковање инфекције код животиња и безбедно уклањање трихинелозног меса из ланца исхране неопходно је у свим срединама које нису препознате као зоне „слободне од трихинелозе“ што наравно ствара значајне економске губитке, али истовремено представља и неопходан корак у здравственој заштити људи. Спорадичне, мале епидемије трихинелозе у ЕУ су у последњих неколико година описане као импортоване епидемије. У САД и Канади заражавање људи конзумирањем меса пореклом од домаћих свиња је готово ишчезло јер су знатно унапређени услови производње и технологије гајења свиња, затим детекције ларви у узорцима меса закланих свиња на кланицама, као и технолошке обраде, чувања и продаје меса (месо замрзнуто у комадима на тржишту за САД). У овим земљама, повремено заражавање људи настаје као последица конзумирања сировог или недовољно термички обрађеног трихинелозног меса пореклом од свиња која се гаје слободно или узгајају на фармама са органском производњом. У ланцу преноса инфекције од животиња на људе постоје три основна проблема. Први од њих је - како се домаће животиње

инфицирају, други - зашто је инфицирано месо доступно за људску употребу и трећи - како долази до инфекције људи. Инфекција домаћих свиња је последица како неодговарајућих услова узгајања тако и увођења трихинелозних животиња или меса из ендемског у неендемско подручје или земљу. Трихинелозно месо постаје доступно за људску употребу онда када изостане ветеринарска контрола (клање свиња и дивљачи за кућне потребе без ветеринаског прегледа) или када дође до пропуста у систему контроле (нелегалан преглед од стране нестручног особља које није обучено за контролу свињског меса и производа од свињског меса). Ипак, до инфекције људи долази само онда када су испуњена два услова: када навике у исхрани подразумевају конзумирање сировог или термички недовољно обрађеног меса и када је инфицирано месо доступно за исхрану.

Све нематоде у роду *Trichinella* су потпуно зависне од карнивора, због начина преношења од домаћина до домаћина. Оне представљају опасност за веома велики број кичмењака. Сви сисари показују одређени степен пријемчивости на инфекцију са *T. spirallis*, што омогућава широку географску распрострањеност овог паразита, као и могућу високу инциденцију. Пренос различитих врста рода *Trichinella* је уско повезан са екологијом и врстом домаћина. Врста која је прва идентификована у роду *Trichinella* била је *T. spiralis* и то код домаћих животиња. Дивље животиње су примарни домаћини за припаднике других врста овог рода. Када су услови гајења домаћих и дивљих животиња неадекватни, врсте *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis* се преносе из сиватичног у домаћи круг, често преко синантропних животиња. У принципу, неке врсте (*T. spiralis*) могу циркулисати у оба смера од домаћих животиња ка дивљим и обрнуто.

Како се *T. spiralis* и *T. britovi* преносе и домаћим и сиватичним циклусом, њихове епизоотиолошке карактеристике су зависне од боље адаптираности *T. spiralis* на домаће свиње као домаћине, док су за *T. britovi* домаћини пре свега месоједи. Познавање епизоотиолошких карактеристика ових врста рода *Trichinella* омогућава процену ризика за земљу на чијој су територији присутне.

Сиватични циклус је присутан на свим континентима, са изузетком Антарктика (за који нема података). Степен заступљености сиватичног циклуса је директно одређен присуством потенцијалних домаћина у том региону. Као што

је већ речено, основне особине месоједа и кичмењака сваштоједа (карниворизам, канибализам, стрвождерство, могућност слободног кретања, животни век у трајању од неколико до десетину година и положај на врху ланца исхране) доприносе одржавању овог паразита у силватичном циклусу, док за преношење заразе унутар популације домаћих животиња постоји неколико основних извора заражавања. Синантропне животиња омогућавају повезаност силватичног и домаћег циклуса.

2.10. Врсте рода *Trichinella* и пријемчиве врсте животиња

Постоји значајна разлика у проценту заступљености врста *T. spiralis* и *T. britovi* код различитих домаћина, припадника редова *Carnivora* (месоједи), *Artiodactyla* (свиње) и *Rodentia* (глодари). Такође је утврђена различитост између фамилија унутар истог реда и између врста унутар фамилије. Тако је код *Canida* утврђено присуство *T. britovi* код 90% црвених лисица, али само 52% код ракуна који се сматрају већим сваштоједима са стрвождерским карактеристикама (Kauhala et al., 1993). Код ласица, које нису стрвинари, утврђено је само присуство *T. britovi*. Код рисева, чији су чест плен црвене лисице (главни домаћини *T. britovi* у природи), утврђено је присуство *T. britovi*, а експериментална испитивања нису показала разлику у инфективности *T. spiralis* за ове две врсте (Kapel and Gamble, 2000; Kapel, 2001). Дивље свиње у природи лако долазе до лешева угинуле или изловљене дивљачи, док домаће свиње имају ретко приступ остацима трупова дивљих месоједа (свиње гајене у слободном режиму или храњене термички необрађеним остацима пореклом од дивљачи) (Pozio and Murrell, 2006). Процент *T. spiralis* и *T. britovi* у популацији домаћих свиња и популацији мрког пацова се поклапа, што потврђује чињеницу о блиском односу ове две животињске врсте у домаћем циклусу.

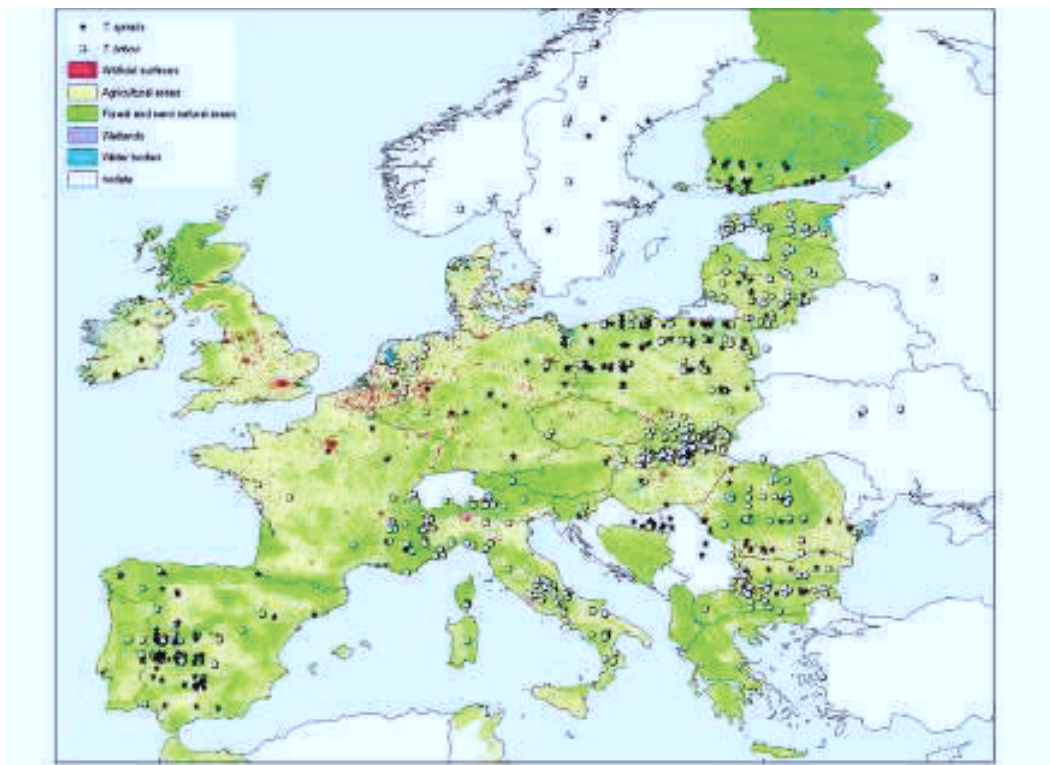
2.11. Географска распрострањеност врста рода *Trichinella* код различитих врста животиња на територији Европе

Значај идентификације врсте рода *Trichinella* инфекције и врсте домаћина огледа се у расветљавању улоге појединих врста трихинела у домаћем и

силватичном циклусу, улоге појединих животињских врста као резервоара у природи и посебних карактеристика станишта у којима су утврђени.

У складу са важећом законском регулативом ЕУ, све земље чланице су у обавези да прегледају на присуство паразита рода *Trichinella*, месо пореклом од домаћих и дивљих свиња намењено за исхрану људи и да све изолате доставе Међународном референтном центру за трихинелозу (ITRC) ради идентификације врсте. Зато је било могуће систематизовати репрезентативне податке о врстама рода *Trichinella* које циркулишу у Европи и врстама животиња које представљају домаћине (Pozio et al. 2009b). Тако је једно од најобимнијих испитивања о географској раширености врста рода *Trichinella* за територију Европе изведено од стране Међународног референтног центра за трихинелозу (ITRC, www.iss.it/site/Trichinella/index.asp), када су *T. spiralis* и *T. britovi* идентификоване као две најчешће врсте рода *Trichinella* које циркулишу у Европи. Обухваћена је последња декада прошлог века и прва декада 21. века. У обзир су узети само изолати за које су постојали подаци о тачној географској локацији заражене животиње и научни назив домаћина. Географски информациони систем је употребљен у односу на званичне границе држава (Слика 2).

Тако је од укупно 1.316 изолата који су испунили оба услова, 540 изолата идентификовано као *T. spiralis* и 776 изолата као *T. britovi* (Pozio et al., 2009c). Први изолати су потицали из 22 земље ЕУ, са изузетком Грчке где није спроведено истраживање, Данске где је присуство *Trichinella* sp. изузетно ретко (Eneamark et al., 2000), Кипра, Малте и Луксембурга где овај паразит највероватније и није присутан (Pozio, 2007). Веома је значајна чињеница да су увршћени подаци који се односе и на изолате пореклом из земаља које су на територији Европе, али нису чланице ЕУ, као што су Босна и Херцеговина, Хрватска, Македонија, Норвешка, Белорусија, Русија, Србија, Швајцарска и Украјина.



Слика 2 – Дистрибуција *Trichinella spiralis* и *Trichinella britovi* на територији Европе (Pozio et al., 2009c)

До 60-61° северне географске ширине *Trichinella spiralis* и *Trichinella britovi* су две најраспрострањеније врсте *Trichinella* (Pozio E., 1998, 2007). Друге две врсте трихинела које су идентификоване на територији Европе су *T. nativa* и *T. pseudospiralis*. Њихова улога за популацију домаћих животиња је секундарна. Присуство *T. nativa* је утврђено у арктичком и субарктичком региону код дивљих месоједа (изотерма -4°C у јануару, сматра се јужном границом), али није нађена код домаћих и дивљих свиња. За *T. pseudospiralis* још увек нема довољно релевантних података како би се у потпуности разјаснила њена циркулација у природи (Pozio and Murrell, 2006; Pozio, 2007). На подручју целокупне Европе утврђена је шира географска распрострањеност *T. britovi* (62,5 до 100% изолата) у односу на *T. spiralis* (0,0 до 37,5%), за разлику од територије Финске, Немачке, Пољске и Шпаније где је преваленција *T. spiralis* виша (56,3 до 84,2% изолата). У Румунији однос утврђених врста је био сличан (49,2% за *T. spiralis* и 50,8% за *T. britovi*) што се објашњава високом преваленцијом присутних жаришта у запатима

домаћих свиња (Blaga et al., 2007). *Trichinella spiralis* је утврђена као доминантна врста у Хрватској и Србији, с тим што се мора имати у виду да је тек након овог истраживања отпочело испитивање код већег броја дивљих животиња на овој територији (Zivojinovic et al., 2010). На територији Ирске је утврђено само присуство *T. spiralis* у популацији црвених лисица, док је у Белгији, Италији, Португалији, Швајцарској и Холандији забележено само присуство *T. britovi*, са изузетком једног случаја заражене црвене лисице са *T. spiralis*, која је одстрелена у Алпима, 100м од границе са Француском. У односу на врсте животиња, *T. britovi* је заступљенија више од *T. spiralis* код дивљих месоједа (89% према 11%), док је преваленција *T. spiralis* виша у односу на *T. britovi* код домаћих свиња (82% према 18%), дивљих свиња (62% према 38%) и глодара (75% према 25%). Приближно исти проценат присуства *T. spiralis* код домаћих свиња и синантропског мрког пацова указује на јаку повезаност ове две животињске врсте као домаћина. На територији пољопривредних газдинстава у Румунији заступљеност обе врсте је уједначена 41,1% *T. spiralis*, 46,0% *T. britovi*, што је слично налазу у природи 45,5% *T. spiralis* и 46,6% *T. britovi*. Процент утврђених случајева у урбаним срединама је био занемарљив (2,2% и 0,9%)

У Европи су вршена различита испитивања заступљености ове две врсте, међутим, мора се имати у виду да је примењени дијагностички метод омогућавао само превенирање клинички манифестне болести код људи (инфекција >3 ларве по граму), што није пружио могућност откривања правог броја ларви овог паразита у појединачним домаћинима (Nöckler and Kapel, 2007). До сада је у укупно 17 земаља испитано мање од 15 врста животиња. У Аустрији, Белгији, Чешкој Републици, Ирској, Норвешкој, Португалији, Словенији, Швајцарској, Холандији и Великој Британији је велики број пријемчивих врста животиња испитан и утврђена је ниска преваленција (Van der Giessen et al., 2001; Rafter et al., 2005; Davidson et al., 2006; Schynts et al., 2006; Pozio, 2007). У Шведској је утврђена ниска преваленца *T. spiralis* и *T. britovi*, али је укупна преваленца за врсте рода *Trichinella* висока захваљујући присуству других врста рода *Trichinella* (Pozio et al., 2007).

Добијени резултати који указују на већу присутност врсте *T. spiralis* у популацији домаћих свиња су у сагласности са експериментално добијеним

результатима о мањој инфективности *T. britovi* за домаће свиње и мрке пацове у односу на *T. spiralis* (Kapel and Gamble, 2000; Malakauskas et al., 2001). Виша преваленција *T. britovi* у укупној популацији на територији Европе се подудара са историјом биогеографије инкапсулираних врста рода *Trichinella* (Zarlenga et al., 2006) и са чињеницом да су изолати *T. spiralis* на тлу Европе “скорашњег” порекла (Rosenthal et al., 2008). Према резултатима досадашњих истраживања, највероватнији главни домаћин *T. spiralis* у дивљем циклусу су дивље свиње. Сам степен инфекције, односно броја ларви *T. spiralis* код дивљих свиња може значајно бити виши уколико је присутан у популацији домаћих свиња и постоји могућност преношења кроз конзумирање непрописно уклоњених трупова заражених свиња (приступ ђубриштима, исхрана термички необрађеним месом и сл.)

Процент потврђених изолата *T. spiralis* код дивљих месоједа сисара је низак (11%), што иде у прилог тврдњи да ове животиње немају улогу у одржавању овог паразита у природи. Сасвим супротно, дивље свиње имају кључну улогу у ширењу *T. spiralis* у силватичном циклусу. У подручјима где не живе дивље свиње, као што је Ирска, домаћи циклус је нестао услед побољшања општих биосигурносних мера на фармама свиња, тако да *T. spiralis* веома тешко опстаје и њено присуство је врло мало заступљено, најчешће као веома ниска инфекција црвених лисица (Rafter et al., 2005; Pozio, 2007) или је у потпуности нестала као што је случај са Сицилијом и Великом Британијом (Pozio and La Rosa, 1998; Zimmer et al., 2008). Утицај човека на услове животне околине доводи често до промена у епидемиологији многих узрочника заразних обољења животиња, међу којима је и *Trichinella* spp., као и на саме домаћине (Daszak et al., 2000; Root et al., 2003). Тако је у последњих 100 година на тлу Европе пораст необрађених површина и шума и смањење броја организованих фарми животиња, праћено повећањем броја дивљих свиња. Ову појаву свакако би требало имати у виду јер дивље свиње представљају значајан резервоар *T. spiralis*, зато повећање њиховог броја може имати за последицу повећање присутности *T. spiralis*, са последичним ризиком од преношења инфекције на домаће свиње.

Током истраживања у Европи (Pozio and Murrell, 2006; Pozio et al., 2006) већина *Trichinella* изолата је потицала од уловљене дивљачи током ловне сезоне,

тако да су се резултати односили на услове станишта у току зимског годишњег доба. Ниво инфекције са *T. britovi* је био виши у односу на просечан број ларви *T. spiralis* по граму код испитиваних врста животиња. Објашњење се може наћи у односу на карактеристике самих врста рода *Trichinella* и чињенице да је станиште дивљих месоједа (главни домаћини *T. britovi*) на вишим надморским висинама (хладнија клима) у односу на домаће и дивље свиње (главни домаћини за *T. spiralis*). *Trichinella britovi* је отпорнија на температуре смрзавања, може преживети и до 11 месеци у мишићном ткиву месоједа на -15°C , у мишићном ткиву свиња на -20°C и до три недеље, док ларве *T. spiralis* опстају неколико дана до највише неколико недеља. Постоје резултати истраживања који указују на повећано присуство лисица у урбаним срединама (Romig et al., 2006), чиме се се сивлатични циклус потврђује као могући вид одржавања и мешања врста рода *Trichinella* између домаћег и сивлатичног циклуса (Pozio, 1998) У сваком случају, за добијање статуса региона или фарме слободне од присуства врста рода *Trichinella*, неопходно је спроводити и мониторинг дивљих животиња (Еуропеан Community, 2005). Као један од најважнијих резултата овог истраживања сматра се могућност дефинисања врста животиња за мониторинг. Тако је за подручја у којима је *T. britovi* дефинисана као најприсутнија врста, мониторингом потребно обухватити сисаре месоједе, за разлику од подручја на којима доминира *T. spiralis*, где је популација дивљих свиња основна врста за испитивање.

У Финској је домаћи циклус још увек присутан, али је инциденција веома ниска (0,0001%). Присутне врсте су: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* и *T. pseudospiralis* (Oivanen et al., 2002; Pozio and Murrell, 2006). За висок проценат *T. spiralis* у популацији дивљих животиња на територији Немачке тешко је наћи објашњење, с обзиром на чињеницу да је домаћи циклус нестао још пре 30 година, а последњи забележени случај инфекције са *T. spiralis* код свиња гајених у слободном режиму био је 2006. године. Претпоставка је да је степен инфекције код појединачних животиња у прошлости био доста виши у поређењу са осталим земљама Европе. Историјски подаци говоре у прилог чињеници да је ова зоозооза била озбиљан здравствени проблем, тако да је Немачка била прва земља која је успоставила званични програм контроле 1863. године (Campbell, 1983).

Скорашња истраживања биогеографских и филогенетских карактеристика *Trichinella* spp. су пружила јаке доказе о месоједима из фамилија *Ursidae*, *Canidae* и *Felidae* као преносиоцима овог паразита у Холарктички екосистем, који се простире кроз целу Европу, преко Беринговог мореуза до Северне Америке (Zarlenga et al., 2006). Препознавање значаја зоонозног ризика допринело је расветљавању географских карактеристика самог паразита и разноликих домаћина (Pozio and Murrell, 2006). Захваљујући све чешћој примени PCR дијагностичких метода, створена је база података о врстама рода *Trichinella*, домаћинима и њиховој географској локацији (Zarlenga et al., 1999). Географско информациони системи имају значај у мапирању тренутне дистрибуције истраживане врсте агенса. Модел који је коришћен - The Maxent model је атрактиван јер пружа могућност да се са ограниченим информацијама о локацији може предвидети географска распрострањеност и изврши валидација овог предвиђања (Guisan et al., 2006). Идентификацијом тачне географске области у којој су заступљени паразитски зоонозни агенси, могу се унапредити епизоотиолошка и епидемиолошка истраживања, што би допринело развоју ефикасне превентивне стратегије (Burke et al., 2008).

Употребом ГИС-а може се одредити утицај човека и климатских промена на саму дистрибуцију паразита (Penny et al., 2009). Тако је утврђен могући утицај климатских промена на преношење *T. nativa* у популацију арктичких моржева и повећан ризик за популацију људи који живе у њиховом окружењу (Rausch et al. 2007). Тако је утврђено да нестајање станишта вукова и мрких медведа, има за последицу смањење броја животиња које припадају овим врстама, а самим тим и потенцијалних домаћина *T. nativa* (Schipper et al., 2008).

Неопходно је истаћи да на територији Европе, популација дивљих животиња, представља најзначајнији резервоар трихинела без обзира на чињеницу да преваленција може бити изразито ниска у периоду и до неколико година (Rafter et al., 2005). Слични резултати су добијени на територији Северне Америке (Masuoka et al., 2009). То у великој мери отежава контролу и чини готово немогућим искорењивање ове зоонозе. Зато су дивље животиње најзначајнији извор инфекције за домаће животиње, које затим постају извор за остале гајене врсте (нпр. коње) (Pozio and Murrell, 2006).

2.12. Симпатрија – просторно преклапање врста рода *Trichinella*

Постоји много примера симпатрије између различитих врста трихинела: у Сједињеним Америчким Државама и Канади *T. nativa* и *T. murrelli*; у Европи и Азији *T. nativa* и *T. britovi*; у Јужној Африци *T. nelsoni* и *Trichinella* T8. Подручје на коме се простире *T. spiralis*, пасивно пренета људима, домаћим и синантропским животињама се преклапа у многим регијама са присутним врстама *T. nativa*, *T. britovi* и *T. murrelli*. Присуство неинкапсулиране врста *T. pseudospiralis* је утврђено у истим регијама где се *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* и *T. murrelli* налазе. Потребно је још истраживачких података како би се у потпуности потврдила чињеница да се и неинкапсулирана врста *T. zimbabwensis* преклапа са *T. britovi*, *T. nelsoni* и *Trichinella* T8 у неким деловима Африке. Симпатрија овог паразита има за резултат инфекцију природних домаћина са различитим врстама рода *Trichinella* истовремено: *T. spiralis* са *T. nativa*, или *T. britovi*, или *T. murrelli*, или *T. pseudospiralis*; *T. nativa* са *T. britovi* или *Trichinella* T6; *T. britovi* са *T. pseudospiralis*. Заражавање домаћина са већим бројем врста указује на висок ниво изложености домаћина могућој инфекцији у одређеним условима (Pozio and Murrell, 2006).

2.13. Земље у којима није присутна трихинелоза

Постоји недостатак информација о могућем присуству *Trichinella* spp. како код људи, тако и код домаћих и дивљих животиња за многе земље на свету. То указује само на недостатак истраживања и никако не искључује могуће присуство ове зоонозе (Pozio et al., 2009b). Може се претпоставити да је *Trichinella* spp. свеприсутна у популацији дивљих животиња (сисари, птице и рептили), док је њено присуство у популацији људи и домаћих животиња релативно ретко на нивоу целе земаљске кугле. Присуство *Trichinella* spp. до сада није забележено на територији:

- Африка: Капе Берде, Коморос, Мадагаскар, Маурициус, Сао Томе Принципе и Сејшели;
- Америка: Карибска острва Антигуа-Барбуда, Бахами, Барбадос, Куба, Доминиканска република, Гренада, Хаити, Јамајка, Холандски антили, Свети Кит-Невис, Света Луција, Свети Бинсент-Гренадин и Тринидад – Тобаго;

- Азија: Источни Тимор, Малдиви, Филипини, Сингапур, Шри Ланка и Тајван;
- Европа: Кипар и Малта;
- Океанија: Фиџи, Кирибати, Маршалска острва, Микронезија, Науру, Палау, Самоа, Соломонска острва, Токелај, Тонга, Тувалу и Бануату.

2.14. Силватични циклус

Силватични циклус се одвија на свим континентима, са изузетком Антарктика, за који не постоје подаци о истраживању врста животиња на том подручју, као што су морски сисари и птице. Постоји повезаност између класа кичмењака, њихове телесне температуре и врста рода *Trichinella*. Код рептила са телесном температуром од 25°C до 29°C и код птица, код којих је телесна температура 40,5°C-42,5°C паразитирају неинкапсулиране врсте рода *Trichinella*. Кичмењаци са телесном температуром која се креће у распону од 37,5°C до 40°C су домаћини и за неинкапсулиране и за инкапсулиране врсте рода *Trichinella*.

2.14.1. Сисари

Природна инфекција са *Trichinella* spp. је забележена код више од 100 врста сисара који су сврстани у 11 редова (*Marsupialia*, *Insectivora*, *Edentata*, *Primates*, *Lagomorpha*, *Rodentia*, *Cetacea*, *Carnivora*, *Perissodactyla*, *Artiodactyla* и *Tylopoda*). За припаднике *Insectivora*, *Lagomorpha*, *Cetacea*, *Tylopoda*, већине *Rodentia* потребно је извршити још истраживања како би се дошло до коначне потврде (Pozio, 2005). У експерименталним условима, све врсте су способне да обаве животни циклус у свим поменутих врстама сисара. Међутим, само одређене врсте сисара у природним условима имају улогу у силватичном и/или домаћем циклусу врста рода *Trichinella*. Преношење различитих силватичних врста и генотипова директно је условљено еколошким карактеристикама њихових домаћина.

На територији Европе код дивљих свиња (*Sus scrofa*) у готово истом броју се јавља инфекција са *T. spiralis* (49%) и *T. britovi* (47%). Разлике су последица одређених посебности појединих средина, навике и понашања људи у појединим земљама. Код црвене лисице (*Vulpes vulpes*) присуство одређених врста се

разликује (*T. spiralis* 7% и *T. britovi* 92%). Слична ситуација је у Северној Америци, где је *T. spiralis* заступљена са 12%, сиватичне врсте као што су *T. murrelli*, *T. nativa* и *Trichinella T6* су утврђене у 87% случајева (Pozio and Murrell, 2006). Свиња, као животињска врста нема никакву улогу (није одговарајући домаћин) као резервоар *T. nativa*, *T. murreli* и *Trichinella T6* у региону Евроазије и Северне Америке (Gamble et al., 1999), где су присутне само ове врсте трихинела. Улога малих сисара (углавном глодара и инсективора) у сиватичном циклусу још увек није са сигурношћу дефинисана, пре свега због малог броја забележених случајева заражавања ових врста и недостатка организованог испитивања - надзора над већим бројем ових сисара (Pozio and Murrell, 2006). Од примата, само је код људи забележено заражавање у природним условима. Заражавање коња (*Perissodactyla*), глодара (поготово пацова), оклопника (*Chaetophractus villosus*) забележено је само у случајевима лоших хигијенских услова, када постоји могућност конзумирања зараженог меса. Торбари (*Marsupialia*) као резервоари су идентификовани на територији Тасманије (Pozio, 2007). У Северној Америци је потврђено присуство паразита код опосума (*Didelphis virginiana*). Упркос потенцијално широком спектру могућих домаћина за *Trichinella* spp, највећи број ових паразита се налазе код месоједа (*Carnivora*) и фамилије *Suidae* углавном домаћа свиња, различите расе дивље свиње (*Sus scrofa*), пегава свиња (*Potamochoerus* spp.), афрички дивљи вепар (*Phacochoerus ethiopicus*) (Pozio and Murrell, 2006). Спорадичан је налаз природног заражавања биљоједа, како дивљих врста као што је ирвас (*Rangifer tarandus*), срна (*Capreolus capreolus*) тако и домаћих оваца (*Ovis aries*), коза (*Capra aegagrus hircus*) и крава (*Bos taurus*). У експерименталним условима је доказана пролазна зараженост говеда, оваца и коза. Потребна су детаљнија истраживања на молекуларном нивоу, како би се научно потврдило присуство ларви ове нематоде, као и шира епизоотиолошка истраживања о могућности природне инфекције биљоједа у подручјима где је трихинелоза ендемски присутна код свиња (Takahashi et al, 2000; Pozio, 2001a).

2.14.2. Птице

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

2.14.3. Гмизавци

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

2.14.4. Водоземци и рибе

Описан је један случај експерименталне инфекције водоземаца: жабе (*Salientia*) и мексичког саламандера (*Ambystoma mexicanum*) са *T. spiralis*, при чему је развој ларве у мишићним ћелијама био некомплетан. Покушај заражавања риба са *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* и *T. zimbabwensis* је такође био неуспешан (Pozio and Murrell, 2006).

2.14.5. Морски сисари

Trichinella nativa је утврђена код морских сисара у арктичком региону, код малог броја врста домаћина. Обично се налази код поларних медведа (*Ursus maritimus*), још више код моржева (*Odobenus rosmarus*), када представља и могући извор заразе за људе. Зато су уведени програми контроле на присуство ларви трихинела у ланцу мера провере здравствене исправности меса пореклом од гајених моржева намењених за исхрану људи у неким од земаља Арктичке регије (Proulx et al., 2002). Код брадатих фока (*Erignathus barbatus*) и прстенстих фока (*Phoca hispida*) ретко се налазе ларве трихинела. Забележен је један налаз код белог кита (*Delphinapterus leucas*) (Pozio, 2007). Код месоједа који су настањени у Арктичкој регији, као што су поларни медвед (*Ursus maritimus*), поларна лисица (*Alopex lagopus*), поларни пси преваленца инфекције са *T. nativa* је висока. Лешеви

угинулих животиња врло често доспевају у океан, па тако моржеви као стрвождери бивају изложени инфекцији. Фоке и китови се највероватније заражавају или конзумирањем заражених трупова или индиректно конзумирањем амфипода (мали морски ракови) који су се хранили остацима заражених животиња.

2.14.6. Бескичмењаци

Проучавана је и могућа улога бескичмењака као домаћина за одрасли и ларвени облик. Опстанак ларви трихинела у овим домаћинима директно зависи од спољашње температуре. Ниже температуре омогућавају дужи опстанак. Резултати истраживања указују да је улога бескичмењака као домаћина и резервоара трихинела веома ограничена у природним условима (Pozio and Murrell, 2006).

2.15. Утицај човека на силватични циклус

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

2.16. Домаћи циклус и најважнији фактори ризика у домаћем циклусу

Домаћи циклус трихинела је могућ у условима гајења домаћих животиња када су присутни неки од следећих поступака:

1) исхрана домаћих животиња отпацама, помијама (Gamble et al., 2000) или могући приступ домаћих животиња труповима уинулих или закланих свиња и/или дивљачи, што је уобичајно код свиња које се слободно гаје (Pozio and Murrell, 2006)

2) могући приступ домаћих животиња ђубриштима и депонијама

3) исхрана домаћих животиња месом дивљачи, као и отпацама заосталим од изловљене дивљачи

4) исхрана коња отпацама пореклом од свиња или делова трупова крзнашица

5) исхрана паса за вучу санки деловима трупова других паса или дивљачи на Арктику

6) коришћење трупова закланих крзнашица за исхрану других фармски гајених крзнашица

7) коришћење меса закланих крокодила за исхрану фармски гајених крокодила у Африци

8) коришћење свињских помија за исхрану младих крокодила у Папуа Новој Гвинеји

Најчешћи врста рода *Trichinella* у домаћем циклусу је *T. spiralis*, која је веома добро адаптирана на свиње и синантропске врсте као домаћине. Она опстаје у домаћинима, показујући врло висок репродуктивни ниво, не изазивајући тешке патолошке промене, осим код врло високог нивоа инфекције. *Trichinella britovi* се повремено јавља у домаћем циклусу у случајевима исхране свиња отпацама пореклом од изловљене дивљачи, као и код свиња које се гаје слободно и имају приступ депонијама на којима се налазе делови трупова уинуле или изловљене дивљачи (Pozio and Murrell, 2006). На територији Русије и Словачке Републике забележени су случајеви инфекције домаћих свиња са *T. pseudospiralis*. У Африци је дошло до преношења *T. papuae* и *T. zimbabwensis* у популацију крокодила који живе у мору и Нилу (*Crocodylus porosus* и *Crocodylus niloticus*) као и врста које се гаје фармски.

Добро је позната могућност дугогодишњег егзистирања *T. spiralis* у популацији домаћих свиња уколико се не предузимају било какве мере за побољшање општих услова држања. Уз то, резултати новијих истраживања

(Pozio et al., 2009c) указују и на могућност присуства *T. britovi* у домаћем циклусу на територији Бугарске, Хрватске, Естоније, Италије, Македоније, Пољске, Румуније, Шпаније и Украјине. Жаришта инфекције у домаћем циклусу са *T. britovi* обично трају током једне генерације свиња или ретко неколико генерација, највероватније због ниске инфективности *T. britovi* за домаће свиње (Kapel and Gamble, 2000; Cortés-Blanco et al., 2002; Jarvis et al., 2002; Kurdova et al., 2004; Rodríguez de las Parras et al., 2004; Cabaj, 2006; Malakauskas et al., 2007; Petkova et al., 2008; Pozio et al., 2009b). У Немачкој, Финској, Пољској и Шпанији утврђена је виша преваленција за *T. spiralis* у односу на *T. britovi*. У Пољској је домаћи циклус *T. spiralis* још увек активан, што доприноси одржавању инфекције и сталном ризику од преношења на сивлатични циклус (Ramisz et al., 2001). Слична је ситуација са Шпанијом, ако се узме у обзир да је већина прегледаних узорак потицала из региона у коме је домаћи циклус био врло активан до недавно (Pérez-Martín et al., 2000).

2.16.1. Улога пацова

У домаћим стаништима где трихинела кружи унутар популације домаћих животиња, чест је налаз *T. spiralis*, ређе *T. britovi* или *T. pseudospiralis* код мрког пацова (*Rattus norvegicus*) (Pozio and Zarlenga, 2005). Улога ове врсте животиња је и даље предмет дебата: да ли је то прави резервоар трихинела (одржавање инфекције унутар врсте без укључивања других врста домаћина) или је вектор (због случајних инфекција) за пренос до домаћих животиња. Позната је Леукартова “Пацовска теорија“ из 19. века, која поставља пацове као главне резервоаре *T. spiralis* за инфекцију домаћих свиња. Друга теорија коју је развио Зенкер 1871. говори о пацовима само као индикаторима присутности врста рода *Trichinella* и заступа мишљење да прави извор инфекције и за свиње и за пацове представљају остаци и отпаци настали после клања заражених свиња. Не постоје забележени случајеви инфекције популације мрког пацова (*Rattus norvegicus*) са *T. spiralis* на фармама на којима су свиње за које је утврђено да нису заражене или уопште више нема свиња. Ипак, веома битна улога у преношењу *T. spiralis* мора се увек имати на уму код формирања програма за биосигурносне мере на фармама. Приступ биосигурносним мерама које се морају примењивати мора

бити широк, не само на самим фармама, већ на ширем околном подручју како би се спречило могуће ширење популације заражених пацова на околне фарме и насеља. Неправилна употреба средстава за дератизацију може подстаћи преношење инфекције, јер се отровани пацови успорено крећу и постају лак плен за свиње. Улога пацова као вектора је још већа у случајевима неадекватне исхране свиња.

2.16.2. *Trichinella* spp. код коња

Иако припадају биљоједима 32% коња конзумира месо када им се понуди у исхрани. У неким земљама је још увек пракса исхране коња производима животињског порекла (Murrell et al., 2004). Ипак, широм света преваленција трихинелозе код коња је веома ниска (од 1975. забележено је само 32 случајева заражавања људи инфицираним коњским месом и производима зараженог коњског меса). Становништво ЕУ је конзумирало близу седам милиона закланих коња у периоду од 1975 до 2005. године, од којих је код 28 утврђена инфекција са врстама рода *Trichinella*. Сви заражени коњи су потицали из земаља са високом преваленцијом трихинелозе свиња и/или дивљих животиња, што указује на блиску повезаност заражености ових врста животиња и коња (Pozio, 2001a; Murrell et al., 2004). Тако је у Француској заражено 2.296 људи у осам епидемија, у Италији 1.038 заражених људи у седам епидемија у периоду од 1975 до 2005. године. Људи су конзумирали коњско месо пореклом из Канаде, са територије бивше Југославије, Мексика, Пољске и САД (Pozio and Murrell, 2006). Негативан налаз приликом прегледа меса које је било извор инфекције за људе је највероватније последица прегледа неадекватног узорка. Зато је у ЕУ уведен обавезни преглед 5 до 100 g одговарајућег мишићног ткива, уместо дотадашње количине од 1 g. Захваљујући новим прописима, утврђено је присуство ларви трихинела код 18 коња пореклом из Мексика, Пољске, Румуније и територије бивше Југославије (Pozio and Zarlenga, 2005). Посебан епидемиолошки значај имају инфекције људи зараженим коњским месом, јер заражавања већег броја особа може бити последица конзумирања меса пореклом од само једног коња. Последице су далекосежне не само на здравље, већ и на трошкове лечења, продају коњског меса која увек опадне после епидемија. Неминовне последице су промене

у законским и административним регулативама, како у земљама где се епидемије одвијају, тако и на међународном нивоу (Ancelle, 1998).

2.17. Начини преношења *Trichinella* spp. у домаћем циклусу

Заражавање свиња врстама рода *Trichinella* може настати једино као резултат конзумирања ларве прве фазе развоја, која се налази у мишићима заражене животиње. Фактори ризика за настајање инфекције ларвама рода *Trichinella* код свиња на фармама су зато ограничени на: исхрану свиња сировим или непрокуваним помијама које у себи садрже месо, могућност приступа свиња зараженим глодарима, зараженим дивљим животињама, као и зараженим свињским труповима и отпацама након клања или угинућа свиња, о чему постоји велики број документованих записа (Hanbury et al., 1986; Schad et al., 1987; Murrell et al., 1987; Leiby et al., 1988; Gamble et al., 1999; Malakauskas et al., 2007). Као ризик се мора узети у обзир околност када се домаће свиње гаје у условима у којима им је омогућен приступ дивљим животињама и њиховим труповима, које су домаћини за неколико врста трихинела (Pozio, 2005; European Food Safety Authority, 2005). Преношење инфекције из домаћег циклуса и циклуса дивљих животиња се стално одвија уз помоћ синантропских врста и човека (Murrell et al., 1987; Leiby et al., 1988; Malakauskas et al., 2006, Teodorović V. et al., 2007). Популација глодара која се налази у окружењу фарме свиња често није примарни резервоар, већ постаје заражена тек након контакта са лешевима трихинелозних свиња. Тада се свиње у окружењу заражених глодара инфицирају (Leiby et al., 1990; Schad et al., 1987). Појава трихинелозе код свиња се може повезати са одређеним специфичним условима или догађајима који повећавају ризик од излагања инфекцији. Тако је заражавање свиња које су се храниле на ђубриштима у раним 1990. у САД, у великој мери смањено после доношења законских прописа о обавезној термичкој обради свих отпадака након клања. Почетком овог века, у неким земљама Источне Европе, као што су Србија и Румунија, непрописно одлагање отпада после клања свиња, као и неадекватна ветеринарска контрола имала је за последицу пораст преваленције трихинелозе код свиња и појаву болести код људи (Djordjevic et al., 2003; Superlovic et al., 2005; Blaga et al., 2007). Стални ризик за свиње које се гаје у слободном режиму је присутан широм света

(Gamble et al., 1999; Nockler et al., 2004; Liu and Boireau, 2002; Malakauskas et al., 2007). У овом случају, степен ризика је директно пропорционалан нивоу инфекције код популације дивљих животиња. То би свакако требало имати у виду приликом организоване, такозване органске производње и начина гајења свиња у природним условима. Пример различитог нивоа ризика је доказан током истраживања присуства трихинела код слободно гајених свиња у Немачкој и Хрватској (Nockler et al. 2004). Резултати су показали да су све свиње гајене на територији Немачке биле негативне, за разлику од свиња у Хрватској које су биле заражене, што је указало на велику важност дивљих животиња као потенцијалног ризика и извора инфекције за домаће свиње. Тај ризик није сталан, већ је променљив у односу на појаву нових жаришта у природи. Тако је у региону Медитеранских острва (Корзика и Сардинија), која су сматрана слободним од трихинелозе, инфекција утврђена код свиња које се слободно гаје, а забележени су и случајеви заражавања људи (Pozio et al. 2009a, Pozio et al., 2006). У регионима где је трихинела инфекција ендемски присутна у популацији дивљих животиња, релативно је једноставно предвидети степен ризика за домаће свиње (Malakauskas et al., 2007), који је сигурно повећан у малим газдинствима, где се не примењују биосигурносне мере, свиње се хране са непрокуваним помијама и остацима хране у којима се налази месо, отвореним приступом за глодаре и дивље животиње. Често се свиње са оваквих газдинстава не продају легалним токовима и не пролазе редовну ветеринарску контролу. Иако су овакви услови препознатљиви за земље у развоју, таква ситуација је присутна у изненађујуће великом броју земаља света.

2.18. Трихинелоза код људи

Заражавање људи је повезано са културолошким обичајима, начином спремања хране, који укључује сирова или термички недовољно обрађена јела која у себи садрже месо пореклом од сисара, птица и рептила сваштоједа и месоједа. Само присуство трихинела у домаћим и дивљим животињама није довољно за заражавање људи. Тако се у Финској, Шведској и Швајцарској где постоји стално присуство трихинела у популацији дивљих животиња и повремено код домаћих животиња, не дешава заражавање људи, што се објашњава пре свега традиционалном исхраном људи само добро термички обрађеним месом (Pozio,

1998). У већини афричких земаља јужно од Сахаре, где живе углавном Банту етничка популација која веома ретко конзумира месо, заражавање људи је изузетно ретко. Верски закони не дозвољавају Муслиманима исхрану свињским и месом пореклом од месоједа, те се трихинелоза припадника ове популације сматра изузетним случајевима. Нажалост, недостатак законске регулативе о контроли приликом клања или изловљавања дивљачи у тим земљама, има за последицу велики број епидемија људи осталих вероисповести (Pozio and Murrell, 2006). У периоду од 1986 до 2009. године документовано је 65.818 клиничких случајева обољевања људи. Најчешћи извор инфекције за људе је сирово свињско месо. Остали, веома важни извори заражавања људи јесу сирово месо и производи од сировог меса пореклом од месоједа као што су: медведи, кугуари, лисице, јазавци, шакали и пси, сваштоједа (дивље свиње), биљоједа (коњи) (Gottstein et al., 2009). Већина забележених случајева трихинелозе људи (87%) регистрована је у Европи. Чак 50% од тих случајева у Европи пореклом је из Румуније, углавном у периоду од 1990. до 1999. године (Murrell and Pozio, 2011). Инциденција у Румунији се кретала од 1,1 до 8,5 случајева у 100.000 (Blaga et al., 2007).

Просечна годишња инциденција код људи у свету је приближно десет хиљада случајева, са стопом морталитета од 0,2% (Duroou-Samet and Bruschi, 2007). Број непријављених случајева је сигурно већи. Како се трихинелоза људи у већини земаља ЕУ ретко јавља, чест је случај непрепознавања обољења и кашњења у дијагностици (недостатак одговарајућих серолошких тестова, неискуство лекара), што дозвољава ларвама *Trichinella* продор у мишићно ткиво, формирање колагене капсуле и самим тим стицање отпорности на лекове (Duroou-Samet et al., 2002). Свеукупно, свињско месо и производи од свињског меса остају главни извор инфекције за људе. На разним континентима забележени су случајеви трихинелозе људи: у централној Америци Мексико, у Јужној Америци Аргентина, Чиле (Ortega Pierres et al., 2000; Ribicich et al., 2005), у Азији Народна Република Кина, Лаос, Мианмар, Тајланд, Вијетнам (Takahashi et al., 2000; Liu and Voireau, 2002), у Европи Босна и Херцеговина, Хрватска, Бугарска, Белорусија, Хрватска, Латвија, Литванија, Пољска (Ramisz A. et al., 2001), Румунија, Русија, Србија, Украјина (Pozio and Zarlenga, 2005).

Врсте животиња чије је месо било извор инфекције за људе и порекло (земља или континент) (Pozio, 2007):

Дивља свиња (*Sus scrofa*) – Азија, Европа, Северна, Јужна Америка и Папуа
Нова Гвинеја, Тајланд;

Брадавичаста свиња (*Phacochoerus aethiopicus*) - Етиопија, Сенегал,
Танзанија;

Аутохтона раса свиња у Африци (*Potamochoerus* spp.) - Кенија;

Коњ – Француска, Италија;

Морж (*Odobenus rosmarus*) - Канада и Гренланд ;

Мрки медвед (*Ursus americanus*) - Канада, САД;

Браон медвед (*Ursus arctos*) – Аљаска, Канада, Народна Република Кина,
Бугарска, Казахстан, Румунија, Русија, Сибир;

Јапански црни медвед (*Ursus thibetanus*) - Јапан;

Поларни медвед (*Ursus maritimus*) – Аљаска, Канада, Гренланд, Сибир;

Кугуар (*Puma concolor*) – САД, Аргентина;

Јазавац (*Meles meles*) – Кореја, Бугарска, Русија;

Црвена лисица (*Vulpes vulpes*) - Италија;

Шакал (*Canis aureus*) - Тајланд, Алгерија;

Куна (*Mustela lutreola*) - Швајцарска;

Пас – Народна република Кина, Гренланд, Словачка Република,
Швајцарска;

Оклопници (*Chaetophractus villosus*) - Аргентина;

Веверица (*Sciurus vulgaris*) - Тајланд

Гајени гуштер (*Varanus nebulosus*) - Тајланд;

Корњача (*Testudines*) - Тајланд;

Говече, овца, коза – Народна Република Кина (захтева још истраживања до
коначног закључка).

У неким од горе наведених земаља заражено месо које је било извор
епидемија код људи потицало је из других земаља (нелегалним токовима
пренето).

Миграција људи је често имала за резултат прихватање нових обичаја у
начину спремања хране (јела од сировог или термички недовољно обрађеног

свињског меса и производа од свињског меса) и директну изложеност могућем заражавању, што је за последицу имало епидемију у имигрантским комунама у подручјима где је трихинелоза ендемски присутна. Посебно ризичне су популације имиграната из предла Камбоџе, Лаоса, Тајланда и Вијетнама, на територији САД и Израела где контрола домаћих и дивљих свиња није законски обавезна (Pozio and Murrell, 2006). Стално повећање броја туриста који се баве ловом и посећују ендемска подручја, често је за последицу имало развијање клиничке слике као последице инфекције трихинелом код људи после повратка у њихове земље. Дијагностика је била посебно отежана јер су се јављали као појединачни случајеви са неспецифичном симптоматологијом, без породичних и/или већих епидемија (Pozio and Murrell, 2006). Тако је забележена трихинелоза туриста који су приликом посете Африци конзумирали месо брадавичасте свиње (*Phacochoerus aethiopicus*), месо медведа у Канади и Гренланду, свињско месо у Народној Републици Кини (традиционално спремање термички необрађених јела од свињског меса, месне кнедле), Египту, Индонезији (Острво Бали), Лаосу и Малезији, месо дивље свиње (*Sus scrofa*) у Турској и Алжиру (Pozio and Murrell, 2006). Људи пореклом из земаља Источне Европе који раде у ЕУ, након повратка са одмора у својим домовинама, доносећи производе од свињског меса које је било заражено, својим пријатељима у Немачку, Италију, Велику Британију су довели у више наврата до епидемија трихинелозе (Pozio and Zarlenga, 2005).

2.18.1. Патогенеза и клиничка манифестација код људи

Циклус паразита у организму човека се као и код животиња одвија у две фазе: цревна фаза и парентерална (обухвата дисеминацију ларви и мишићну фазу), која траје од неколико дана до неколико недеља. После конзумирања и фазе варења зараженог меса, долази до ослобађања ларви у желуцу и њихове миграције у танка црева. Ту продиру у мукозу и за 4 до 5 дана сазревају у одрасле облике. Продирање у мукозу танких црева има за последицу промене у ћелијском епителу. Зрела женка ствара новорођене ларве у трајању од три до четири недеља. Код особа са развијеним знацима грознице, боловима у мишићима и израженом еозинофилијом, након 3 до 4 недеља од инфекције, у дуоденуму је утврђено присуство женки трихинела са ембрионима (Basset et al., 1996). Женке затим

угину или бивају избачене појачаном контракцијом глатких мишића (као последица имунског одговора). Као реткост, у тој фази забележена је продужена дијареја у популацији Ескима који живе у Арктичком делу Канаде, што указује на перзистентно присуство одраслих облика паразита у цревима људи који су учестало изложени инфекцији и потврђује чињеницу да механизми имунског одговора код људи имају пресудну улогу у заштити домаћина (Mac Lean et al., 1989). Као раритет бележи се потпуни изостанак симптома код ловаца у Папуа Новој Гвинеји, код којих је присутна висока серопреваленција (Owen et al., 2005).

Ларве ослобођене у цревној мукози одлазе даље крвотоком и лимфотокком у друге делове тела. Миграција ларви трихинела кроз различите органе доводи у исто време до реакције организма, што има за последицу имунски, патолошки и метаболички поремећај са различитим клиничким симптомима (Murrell and Bruschi, 1994; Caro and Despommier, 1996; Косиеска, 2000). Имунска реакција се заснива на активацији инфламаторних ћелија (мастоцити, еозинофили, моноцити, Т и Б лимфоцити), продукцији цитокина и антитела, који су важан део ћелијског и хуморалног одговора на инфекцију. Улазак и стално присуство ларви у ћелијама попречно пругастих мишића изазива три основне ћелијске модификације: стварање новог фенотипа ћелија - ћелије неговатељице, што је праћено губитком саркомере, миофибрила, инкапсулирањем ларви (код инкапсулираних врста *Trichinella*) и формирањем капиларне мреже око инфициране ћелије (Caro et al., 1998). Инкапсулација представља развој колагене капсуле око ларве, што се дешава 18-20 дана од момента инфекције (Polvere et al., 1997) и одвија се код свих врста и генотипова, са изузетком *T. pseudospiralis*, *T. papuae* and *T. zimbabwensis* („неинкапсулиране“ врсте). Као последица ове три основне модификације, саркоплазма постаје базофилна и једро се помера у центар ћелије.

Парентерална фаза је праћена запаљенском и алергијском реакцијом организма. Новорођена ларва на путу по организму пре поновног повратка у циркулацију изазива разна оштећења или бива „заробљена“ и уништена грануломатозном реакцијом ткива. Мада, се новорођене ларве трихинела не инкапсулирају у срчаном мишићу, њихово кретање може довести до морфолошких промена у виду фокалних ћелијских инфилтрата, еозинофила и моноклеарних ћелија. Присуство ларви у централном нервном систему изазива

васкулитис и периваскулитис са дифузним фокалним оштећењима. Нервне ћелије могу бити оштећене дејством токсина који настаје приликом дегранулације еозинофила (Durack et al., 1979). Оштећења настала на срцу и мозгу су последица симултаног деловања продуженог протромбинског времена, активности еозинофила и оштећења крвних судова, као последица миграције ларве (Fourestie et al., 1993). Према експерименталним резултатима добијеним на пацовима (Paolucci et al., 1998) миокардитис у почетку изазива инвазија мигрирајуће ларве, затим имунопатолошки процеси, као што је инфилтрација еозинофила и дегранулација мастоцита. На предилекционом месту тј месту опстанка – инвазија ларви изазива директно оштећење мишићних ћелија и стимулише временски ограничену инфламацију мишића са повећаним бројем еозинофила. Код пацијената са трихинелозом је запажена корелација између нивоа еозинофила и лактат дехидрогеназе (LDH) и креатин фосфокиназе (СРК). Овакав налаз указује да ниво оштећења мишићних ћелија може бити индиректно праћен преко нивоа утврђених активираних гранулоцита (Ferraccioli et al., 1988). Дужина опстанка комплекса ћелије домаћина и ларве зависи од многих фактора, везано и за домаћина и за самог паразита. Најчешће опстаје 1-2 године, мада су забележени и случајеви од 30 година (Froscher et al., 1988).

Мада није забележена инфекција људи са свим генотиповима, претпоставља се да су све врсте рода *Trichinella* патогене за људе. Постоје разлике у клиничким симптомима који су директна последица развојног циклуса паразита у организму домаћина. Клиничка дијагноза трихинелозе људи се тешко поставља јер не постоје патогномонични знаци болести, тако да су епидемиолошки подаци од велике важности у постављању дијагнозе. Болест обично почиње изненада, праћена је осећајем опште слабости и главобољом, повишеном телесном температуром, дрхтавицом, претераним знојењем. Повишена телесна температура је један од најранијих и најчешћих знакова болести. Она изненада расте и затим се задржава на 39°C до 40°C у трајању од 8 до 10 дана, у тежим случајевима и до три недеље. У акутној фази могу се запазити знаци као што су: оток очних капака, оток лица (карактеристични периорбитални оток) и болови у мишићима, а као ређе компликације се јављају миокардитис, тромбоемболија, енцефалитис. Едеми су врло карактеристичан симптом трихинелозе људи. Њихов интензитет зависи од

реакције организма на инфекцију. У тешким случајевима, едеми захватају и горње и доње екстремитете. Описани су случајеви када је 6-8% од инфицираних људи имало едеме на екстремитетима (Ancelle et al., 1988; Ancelle et al., 1998). Едеми су симетрични и обично брзо нестају после третмана, нарочито уз примену глукостероида. Болони се могу јавити у различитим групама мишића. Најчешће се јављају у мишићима врата, горњим и доњим екстремитетима, ређе у жвакаћим мишићима. Болони се обично јављају при напору, мада су у тежим облицима запажени и током мировања. Неки пацијенти са тежим обликом болести постају инвалиди са веома израженом слабашћу мишића која је резултат оштећења крвних судова и неуро-мишићног поремећаја. Долази до ограничење покрета горњих и доњих екстремитета због израженог бола, потиљачне псеудоригидности и повремено тризмуса. Тешке мијалгије најчешће трају две до три недеље.

Најчешћи клинички знак присуства паразита у дигестивном тракту је пролив, болови у стомаку, 10-15 столица на дан, са примесама слузи, али не и крви и абдоминални бол. Ови симптоми се обично јављају 3 до 5 дана пре грознице и мијалгије и нестају за мање од недељу дана. Запажено је да краћи период између инфекције и појаве пролива и грознице, условљава дужи период трајања грознице и едема лица (Duroou-Camet et al., 1985). Могу се јавити и пролазна вртоглавица са мучнином. Ређа је појава конјунктивитиса и крварења испод ноктију, као последица васкулитиса, водећег патолошког процеса трихинелозе. Лабораторијске анализе крвног серума пацијента, најчешће показују високу еозинофилију и повећане вредности креатин фосфокиназе у току друге до петнаесте недеље од инфекције (Caro and Desprommier, 1996). Еозинофилија се практично јавља код сваког пацијента, са изузетком неколико случајева пре било каквих клиничких знакова болести. Број еозинофила расте између друге и петнаесте недеље од почетка инфекције. Број еозинофила је повезан са степеном мијалгије (Ferraccioli et al., 1988) и значајно је виши код особа са неуролошким компликацијама (Fourestie et al., 1993). Појава специфичних IgE је у директној вези са појавом алергијске манифестације у виду кожног свраба и едема, као типичним симптомима трихинелозе (Watanabe et al., 2005).

Паразитолошки преглед узорка добијеног биопсијом мишића и утврђивање специфичних антитела потврђују дијагнозу. Тежина болести зависи од многобројних чинилаца који су често међусобно повезани. Тако, инфективна доза (број унетих ларви) зависи од учесталости конзумирања зараженог меса, начина обраде меса (да ли је било сирово, слабо печено, димљено, усољено), количине унешеног алкохола у току конзумирања меса - алкохол може повећати отпорност на инфекцију (Pawlowski, 1983) врста трихинела (број ларви које женка положи је различит код различитих врста), индивидуалне осетљивости која зависи од етничких фактора, пола, узраста имунолошког статуса домаћина.

Не постоје прецизни подаци који дефинишу минималну инфективну дозу која је неопходна за изазивање клиничке слике (Murrell and Bruschi 1994), наводе да је укупна количина од 70 живих ларви довољна да изазове клиничку манифестацију болести. Током истраживања закључено је да је неопходно да конзумирано месо садржи најмање једну ларву како би се испољила клиничка слика код људи (Zimmermann, 1983), што одговара инфективној дози од приближно 150 ларви (претпоставка је да једна особа конзумира 150г меса). С друге стране, инфекција је клинички очигледна када је број ларви у граму (LPG) у узорку биоптата мишића пацијента, око десет ларви по граму. Тешком инфекцијом се сматра налаз од преко 100 LPG узорка добијеног биопсијом (Pawlowski, 1983). На основу ових података, ако се узме у обзир теоретски број новорођених ларви око 1000/женки, минимална инфективна доза може бити од 100 до 300 ларви. Конзумирање 1000 до 3000 ларви може довести до веома тешких облика болести.

Запажена је разлика у клиничкој слици оболелих људи заражених са различитим врстама рода *Trichinella* (Bruschi and Murrell, 2002). Тако је утврђено да болест код инфекције изазване са *T. spiralis* може бити доста тежа него код *T. britovi*, пре свега због чињенице да је женка *T. britovi* мања плодна (Pozio E. et al., 1993). *Trichinella murelli* изазива кожне реакције много пре него едем лица (Dupouy-Samet et al., 2001). *Trichinella pseudospiralis*, која је неинкапулирана доводи до симптома и знакова обољења који дуже трају (Jongwutiwess et al., 1998; Ranque et al., 2000).

Према досадашним подацима забележена су само три случаја трихинелозе код имунокомпромитованих људи. Код једног бубрежног болесника, инфекција је прошла асимптоматски, чак и са утврђеним бројем 1400 LPG у делтоидном мишићу (Doby et al., 1984). Код ХИВ позитивног пацијента клинички знаци болести нису били тешки (Louthrenoo et al., 1993), док је веома тежак облик забележен код особе са хроничном мијелоидном леукемијом (Jacobson and Jacobson, 1977).

Инкубациони период може бити различит. Запажено је да је код тежих облика инкубација краћа и траје око седам дана, код средње тешких 14 дана и 3 до 4 недеље код бенигне форме.

Разликује се пет форми болести (Durocu-Samet and Bruschi, 2007). Код тешке форме сви симптоми су веома изражени, постоји поремећај метаболизма, циркулације и/или неуролошке компликације. Грозница може трајати дуже од 2 недеље и велики број ларви се може утврдити биопсијом мишића (обично више од 100 LPG). Средње тешка форма такође има све клинички изражене симптоме, али су компликације ретке, ако их и има, оне су бенигне и пролазне. Бенигна форма болести даје благе симптоме и нема компликација. Због тога се код ове форме ретко поставља сумња на обољење, осим ако особа није укључена у већи круг оболелих. Код абортивне форме клинички знаци и симптоми се појављују индивидуално и не чине синдром, а трају само неколико дана. Асимптоматска форма се може дијагностиковати само применом серолошких тестова и биопсијом мишићног ткива која се често спроводи из других разлога.

2.18.2. Дијагностика трихинелозе код људи

Три су основна циља у имунодијагностици трихинелозе људи:

- а) препознати акутну фазу како би се успешно реализовао третман антихелминтицима;
- б) ретроспективна дијагноза;
- в) епидемиолошка анамнеза (Ljungstrom, 1983)

ELISA тест је препоручена метода за откривање специфичних антитела и најуспешнија је у комбинацији са Western-blot техником, како би се избегли

лажно позитивни резултати. Заједничка употреба ова два теста такође омогућава постављање ране дијагнозе (Costantino et al., 2001).

Користе се четири различита антигена за серолошку дијагностику:

а) исечак зараженог мишићног ткива или изолована ларва (мишић-ларва антиген кутикуле), који се користи за индиректну имуофлуоресценцију;

б) нативан антиген припремљен од мишићне ларве;

в) екскреторно/секреторни антиген произведен *in vitro* после 18 сати култивације мишићне ларве;

г) високо специфични, имунодоминантни антигени *Trichinella* 3,6-dideoxyhexosa (шећер тивелоза).

Антигенска грађа је прилично слична код различитих врста и генотипова *Trichinella*, тако да се може применити за дијагностику инфекција изазваних различитим врстама рода *Trichinella*.

Хуморални имунски одговор се заснива на стварању анти-*Trichinella* антитела. Она се не могу открити на почетку болести. Прво настају IgE антитела и типична су за акутну фазу болести. Ипак, због кратког полуживота и недостатка комерцијалних тестова за откривање специфичних IgE антитела у крвном серуму, ретко се откривају. Ниво антитела расте у наредних две до три недеље, нарочито код тешког облика инфекције. IgG антитела могу бити присутна годинама после инфекције, чак иако се болест у почетку развијала у бенигној форми или асимптоматски (Harms et al., 1993). У већини случајева серолошки тестови су негативни у току првих неколико дана фебрилне фазе, када се препоручује понављање серолошког прегледа за две недеље. Позитиван серолошки резултат може бити од помоћи у постављању дијагнозе, али ниво антитела нема значаја у давању прогнозе за даљи ток болести код људи (Murrel and Bruschi, 1994). Сероконверзија се обично дешава друге и пете недеље од инфекције (што се поклапа са интестиналном и мишићном фазом инфекције), а присуство специфичних антитела се без обзира на примењену дијагностичку методу може детектовати на нивоу од 100% и то 3 месеца након инфекције. Након инфекције са *T. spiralis* пацијент може остати серопозитиван најмање годину дана, а забележени су случајеви присуства специфичних антитела после 19 па и 30 година након завршетка акутне фазе болести (Pozio et al., 1993, Froscher et al.,

1988). При инфекцији људи са *T. britovi*, сероконверзија је утврђена до другог месеца од инфекције. Код 50% пацијената заражених са *T. britovi* није могуће утврдити присуство специфичних антитела у узорцима крвних серума. У периоду од шест месеци до три године све оболеле особе су серонегативне (Pozio et al., 1993). У дијагностици трихинелозе људи, употребом серолошких тестова у периоду треће до четврте недеље од момента инфекције позитиван налаз је добијен у 45-87% случајева код инфекције са *T. nativa*. Слични резултати су добијени и у периоду десете и једанаесте недеље после инфекције. Сероконверзија од акутне фазе до фазе опоравка пацијената инфицираних са *T. nativa* је била 55% (Schellenberg et al., 2003).

Код заражених пацијената, који су примили закаснелу или недовољну терапију, специфична антитела могу бити присутна годинама (Pozio E., 2001a), док код оних који су добили ефикасну терапију антитела могу нестати у веома кратком временском року, што потврђује чињеницу да је за стимулисање имунског одговора и синтезу антитела неопходно присуство живих ларви.

2.18.3. Лечење

Медицински третман обухвата антипаразитике (мебендазол и албендазол) и глукокортикостероиде. Мебендазол се обично даје у дози од 5мг/кг, али се у појединим случајевима могу применити и више дозе 20-25мг/кг/дневно. Албендазол се примењује у дози од 800мг/дневно (15мг/кг/дневно) подељено у две дневне дозе. Употреба ових лекова је контраиндикована код пацијената млађих од 2 године и код трудница. Најчешће коришћен кортикостероид је преднизолон, који се даје у дози од 30 до 60мг/дневно у трајању од 10 до 15 дана.

2.19. Лабораторијска дијагностика трихинелозе

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

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

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

Препорука ICT (Међународне комисије за трихинелозу) је да се све домаће и дивље животиње које могу бити носиоци паразита рода *Trichinella*, а чије ће се месо користити за исхрану, обавезно испитају једном од прихваћених и одобрених метода. У том смислу, инспекцијски преглед приликом клања је метод који ће онемогућити појаву клиничке трихинелозе људи, а не у потпуности спречити инфекцију (Gamble et al., 2000). Примењивање директних дијагностичких метода на узорцима пореклом од индикатора у популацији дивљих животиња омогућава утврђивање преваленције трихинелозе у проучаваној животној средини током епизоотиолошких истраживања (Nockler et al., 2000). Препорука за количину узорка за рутинске прегледе трихинелоскопијом после клања јесте преглед 0,5г узорка дијафрагме, а у ендемским подручјима 5г узорка за преглед вештачком дигестијом како би се повећала поузданост дијагностичке методе (Gamble et al., 2000). У сврху епизоотиолошког истраживања присутности трихинела у популацији дивљих животиња узорак за преглед треба да буде најмање 5г мишићног ткива или више, с обзиром на чињеницу да је средња вредност утврђеног броја ларви у мишићима дивљих месоједа мања од 5 LPG (Kapel et al., 2005). Без обзира што је вештачка дигестија дијагностичка метода која захтева више опреме и познавање технике извођења у односу на трихинелоскопију, захваљујући поузданости добијених резултата постала је рутинска метода у већини земаља (Webster et al., 2006).

Идентификација ларви рода *Trichinella* је дијагностичка метода ограничена на *post mortem* испитивања. Ово је уједно и метода која је законски обавезна у многим земљама света, за месо намењено за конзумирање, са циљем превенције трихинелозе људи (Gamble et al., 2000). Веома се често примењује и у епизоотиолошким истраживањима код дивљих животиња, као могућих извора заразе за домаће свиње. Откривање такозваних индикатор животиња омогућава

вршење процене ризика за могућу преваленцију врста рода *Trichinella* у природи (Nockler et al., 2000).

2.20. Избор методе за дијагностику

За добијање поузданих резултата и одређивање свих врста и генотипова рода *Trichinella* неопходно је изабрати одговарајућу дијагностичку методу. Све врсте рода *Trichinella* изазивају формирање ћелије неговатељице у попречно пругастим мишићима домаћина, али *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. nelsoni* и *T. murrelli*, *Trichinella T12*, *Trichinella T6*, *Trichinella T8* и *Trichinella T9* изазивају формирање капсуле око ћелије неговатељице, док је карактеристика неинкапсулираних врста као што су *T. pseudospiralis*, *T. papuae*, и *T. zimbabwensis* недостатак капсуле око мишићне ларве (Murrell et al., 2000; Pozio and Zarlenga, 2005; Pozio and Murell, 2006; Pozio and Zarlenga, 2013). Ларве неинкапсулираних врста је тешко открити методом трихинелоскопије. Управо због ове ограничавајуће околности, као и мање осетљивости трихинелоскопије и сличних компресионих метода у односу на вештачку дигестију, оне нису препоручене методе за преглед меса намењеног за људску употребу (ОИЕ, 2008). Крајем прошлог века, од 1970. године различите методе вештачке дигестије су развијене за преглед узорака мишићног ткива у збирним узорцима (до 100 збирних узорака). Иако захтевају озбиљнију опремљеност и обученост, својом ефикасношћу, поузданошћу и економском исплативошћу у односу на могући резултат, увелико превазилазе трихинелоскопију као дијагностички метод. Тако је вештачка дигестија уведена као једина дијагностичка метода на кланицама у ЕУ и у већини индустријализованих земаља света (Webster et al., 2006). Међутим, у многим деловима Централне и Источне Европе, укључујући и Србију, трихинелоскопија се и даље примењује.

Дијагностика трихинелозе код животиња у складу са Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (ОИЕ, 2008), се може сврстати у две групе: директне и индиректне.

2.20.1. Директне дијагностичке методе

Директне методе су паразитолошке методе - идентификација и откривање ларви у мишићном ткиву путем трихинелоскопије (компресија) и вештачке дигестије. Најстарији метод прегледа је метод компресије и он више није препоручена дијагностичка метода (ОИЕ 2008). У Србији се ова дијагностичка метода још увек често користи.

Напредак у дијагностици директним методом постигнут је развојем методе вештачке дигестије. Узорци за преглед потичу са различитих предилекционих места као што су дијафрагма, жвакаћи мишићи, језик и др. Ларве ослобођене капсуле под дејством ензима, се пречисте серијом корака у поступку седиментације и испирања, а затим се посматрају и броје под микроскопом. Захтеви за извођење вештачке дигестије јасно су дефинисани Директивом ЕУ (SANCO 2075/2005), у САД U.S.Code of Federal Regulations (9CFR 318.10) и ОИЕ Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines (ОИЕ 2008).

Осетљивост директних дијагностичких метода за откривање присуства ларви трихинела у мишићном ткиву уско је повезана са врстом и величином узорка који се прегледа (Nöckler et al., 2000).

За паразитолошко испитивање избор мишића који ће бити узоркован и прегледан захтева познавање предилекционих места у одређеној врсти животиња. Дијафрагма, жвакаћи мишићи и језик су на врху листе предилекционих места за утврђивања присуства ларви овог паразита. Поред врсте узорка неопходно је обезбедити адекватну количину како би се постигао задовољавајући ниво осетљивости дијагностичке методе. Неопходно је остварити осетљивост методе који ће омогућити откривање најмањег могућег броја ларви које доводе до развијања клиничких симптома код људи (Dupouy-Camet and Bruschi, 2007; Nöckler and Kapel, 2007). Резултати добијени валидацијом теста испитивања свињског меса су показали да 1 g испитујућег узорка омогућава откривање >3 ларве по граму у мишићном ткиву (LPG), док 3 до 5 g омогућавају детектовање >1,5 LPG (Gamble, 1998; Forbes and Gajadhar, 1999).

Метода вештачке дигестије се користи и у епизоотиолошким истраживањима код животиња резервоара (дивље животиње), када није неопходно добијање резултата за појединачне узорке животињских трупова.

Сврха овог испитивања је утврђивање статуса подручја на којем су испитиване животиње (процена висине преваленције у испитиваној популацији). План узорковања у оваквој врсти истраживања обухвата и неке друге факторе у односу на испитивање меса намењеног за исхрану људи. На пример, забележено је да је степен инфекције (LPG) у популацији лисица низак, тако да је неопходно повећати количину узорка како би се постигла задовољавајућа осетљивост (Malakauskas et al., 2007). Слично прилагођавање теста је потребно применити код испитивања мање сварљивих узорака мишићног ткива пореклом од дивљачи у односу на дијафрагму пореклом од домаћих свиња (Kapel et al., 2005).

2.20.1.1. Врста узорка

Избор мишићног ткива зависи од врсте животиње. Многобројна експериментална испитивања на различитим врстама животиња дефинисала су предилекциона места за узорковање са циљем утврђивања присуства/одсуства ларви трихинела. Тако је код домаћих свиња за *T. spiralis* предилекционо место корен дијафрагме, језик и жвакаћи мишићи (Gamble, 1996; Forbes and Gajadhar, 1999). Иста предилекциона места су утврђена и код инфекција са *T. britovi* и *T. pseudospiralis* у експериментима на домаћим свињама (Nöckler et al., 2005). Мишићи врата такође спадају у групу предилекционих места, одмах иза дијафрагме, језика и жвакаћих мишића код експерименталних инфекција са *T. spiralis* и *T. britovi* (Kapel et al., 1998). Код експериментално заражених коња са *T. spiralis* и *T. britovi* језик и жвакаћи мишићи су типична предилекциона места (Soule et al, 1989, 1993; Gamble et al., 1996), док су код инфекције са *T. pseudospiralis* то дијафрагма, жвакаћи мишићи и језик (Kapel, 2005). Код природно заражених коња највећи број ларви *T. spiralis* је нађен у мишићима регије главе. Највећи број ларви *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *Trichinella* Т6 и *T. nelsoni* код експериментално заражених дивљих свиња (*Sus scrofa*) утврђено је у узорцима дијафрагме и језика (Kapel, 2001). У експерименталним условима инфекције сребрне лисице (*Vulpes vulpes fulva*) са *T. spiralis* корен дијафрагме и мишићи предњих ногу (подлактице) су потврђени као предилекциона места најповољнија за испитивање (Nockler and Voigt, 1997). Резултати експерименталних испитивања са поларним лисицама (*Alopex lagopus*)

инфицираним са *T. nativa* (Kapel et al., 1995) и природно заражених црвених лисица (*Vulpes vulpes*) са ларвама *Trichinella* (Cristea, 1996; Malczewska et al., 1997), као и ракуна (*Nyctereutes procyonoides*) са *T. spiralis* (Thiess, 2001) указују да су дијафрагма и мишићи предњих ногу предилекциона места. Интеркостални мишићи, језик, мишићи предњих ногу и репа представљају предилекциона места код крокодила у природним резеватима (Pozio et al, 2005).

2.20.1.2. Величина узорка

Количина узорка намењеног за преглед мора задовољити услове који обезбеђују одговарајући ниво осетљивости методе и прихватљиви однос трошкова и добити. За рутински преглед меса неопходно је обезбедити осетљивост од приближно 1 до 3 ларве у граму, што се сматра инфективном дозом за људе. У индустријским кланицама у ЕУ и Србији прегледа се збирни узорак од 100 g пореклом од 100 животиња закланих на линији клања. За рутинско испитивање збирних узорака трупова закланих свиња, методом вештачке дигестије неопходно је прегледати минимум 1 g са предилекционог места (корен дијафрагме). Максимална количина збирног узорка не сме прећи тежину од 115 g за 2 l дигестивне течности. Статистички, 1 g узорка би био довољан за утврђивање најмање 1 ларве по граму, ако би дистрибуција ларви у испитујућем материјалу била хомогена. У пракси то је применљиво само код масовних инфекција, али у случају слабих инфекција ларве нису распоређене хомогено у мишићном ткиву. Код експериментално инфицираних свиња и коња са *T. spiralis* приликом прегледа збирних узорака (појединачни узорци од 1 g) методом вештачке дигестије осетљивост теста је била на нивоу могућег откривања 3 до 5 ларви по граму. Повећање појединачних узорака на 5 g, подигло је осетљивост методе на могућност откривања 1 ларве по граму (Gamble, 1996, 1998; Gamble et al., 1996; Forbes and Gajadhar, 1999). У подручјима где се трихинелоза ендемски јавља, препоручена тежина узорка је 5 g, са циљем повећања осетљивости теста и могућности детекције инфекције. Не постоји значајна разлика између 3 g и 5 g узорка за утврђивање инфекције од 1,0 до 1,9 LPG у свињском месу, те се као минимални узорак сматра количина од 3 g. (Forbes and Gajadhar, 1999). Приликом прегледа коњског меса минимум је 5 g

појединачног узорка у збирном узорку. У Француској је та количина повећана на 10 g за коњско месо које потиче из земаља са ендемски присутном трихинелозом (Voigneau et al., 2000). Уколико не постоји могућност прегледа предилекционих места, неопходно је повећати количину узорка (до 100 g по узорку) како би се постигла задовољавајућа осетљивост дијагностичке методе. У току епизоотиолошких испитивања присуства врста трихинела код дивљих животиња величину узорка би требало прилагодити тако да се постигне могућност откривања најмање 1 ларве по гаму, узорак за преглед би требало да износи најмање 5 g (Gamble et al., 2000). Узорци мишићног ткива у недовољној количини, дехидрирано (исушено) месо или месо непознатог порекла се одбацују јер не испуњавају минимум захтева квалитета за стандардну дијагностичку методу.

2.20.1.3. Метода компресије – трихинелоскопија

У Србији је метода компресије и даље једна од законом дозвољених метода (Правилник Сл.СРЈ 20/95).

Још у XIX веку, од 1860. године у почетку употребом микроскопа, а затим трихинелоскопа започео је систематски преглед закланих свиња на кланицама (Nockler et al., 2000). Касније долази до развоја трихинелоскопа са посебним увеличањем које је омогућавало бољу видљивост ларви. Када је извођење методе адекватно, искуство прегледача велико, поузданост методе осигурава откривање инфекција од 3 ларве по граму, што се сматра инфективном дозом за клинички манифестно обољење код људи. Ограничена је само на преглед појединачних узорака. Узорковање се врши након клања свиње, када се са корена дијафрагме узоркује материјал величине ораха. Затим се прави 28 исечака величине 2мм x 10мм (зрно овса), укупне тежине око 0,5 g. Исечци мишићног ткива се притисну између два стакла, све док не постану прозирни. Сваки се прегледа визуелно, употребом трихинелоскопа или стерео микроскопа са увеличањем 15 до 40 x. Трихинелоскопија као дијагностичка метода је мање осетљива од вештачке дигестије и није погодна за преглед неинкапсулираних врста рода *Trichinella*. Зато ова метода више није званично дозвољена за стандардну употребу. У случају коришћења трихинелоскопије неопходно је обезбедити јасно означавање меса на

тржишту. Месо закланих животиња не сме напустити кланицу пре добијања коначног негативног налаза.

2.20.1.4. Метода вештачке дигестије

Метода вештачке дигестије је дијагностичка метода која се примењује код испитивања узорака мишићног ткива пореклом од домаћих и дивљих животиња које су пријемчиве за инфекцију нематодама рода *Trichinella*. Користи се за *post-mortem* преглед трупова закланих или изловљених животиња (свиње, коњи, крокодили, дивље свиње, медведи, моржеви) или у сврху мониторинга присуства врста трихинела у популацији животиња идентификованих као резервоари овог паразита у природи (лисице, шакали, ракуни) (Nöckler et al. 2007; Larter et al., 2011). То је дијагностичка метода која омогућава утврђивање присуства ларви рода *Trichinella* у фази налажења у мишићном ткиву.

Постоје разне објављене процедуре за преглед збирних узорака са циљем откривања присуства ларви трихинела у месу (Gamble, 1996; Gamble et al., 2000). Метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом се сматрала златним стандардом, јер је то дијагностичка метода посебно дизајнирана за преглед збирних узорака и била је предмет бројних валидација (Kapel et al., 2005). Раније су се примењивале четири методе вештачке дигестије:

- метод са магнетном мешалицом
- седиментациони метод са стомахером
- седиментациони метод са филтрацијом
- Трихоматик 35 аутоматски метод дигестије

У складу са садашњим европским регулативама вештачка дигестија са магнетном мешалицом је међународно призната дијагностичка метода (European Community, 2005; Webster et al., 2006; OIE, 2008).

Заснива се на ензимској разградњи мишићних влакана у дигестивној течности која се састоји од раствореног пепсина и хлороводоничне киселине. Детаљан опис методе дат је EU Регулативи (EC) No 2075/2005.

Како метода вештачке дигестије за утврђивање присуства ларви трихинела у узорцима мишићног ткива не укључује интерну контролу за праћење ефективности дијагностичке методе, неопходно је применити друге елементе

контроле квалитета. Квалитет (тачност) и прецизност овог дијагностичког теста је директно зависна од: правилног извођења методе, адекватног избора узорка мишићног ткива у односу на испитивану врсту, услова рада у лабораторији, апарата и опреме, потврђивања налаза (верификације) и одговарајуће документације о резултатима (Gamble et al., 2000; Nöckler and Kapel, 2007). Минимум неопходних елемената квалитета стандарда обухвата:

1. Узорковање мишићног ткива и припрема за испитивање.
2. Минимални захтеви за опрему и апарате који се користе.
3. Извођење вештачке дигестије.
4. Верификација налаза.
5. Документација.

2.20.1.5. Кључни елементи

Узорци – У циљу постизања тражене осетљивости теста неопходно је узорковати мишићно ткиво са предилекционих места у односу на животињску врсту која се прегледа. Тако су за извођење методе вештачке дигестије код домаћих свиња предилекциони мишићи дијафрагма и жвакаћи мишићи, за коње жвакаћи мишићи, дијафрагма и језик, за дивље свиње и лисице дијафрагма, мишићи предњих ногу и језик, за псе и медведе дијафрагма, жвакаћи мишићи и језик, за моржеве језик, за фоке дијафрагма, међуребарни мишићи и језик, за крокодиле међуребарни и жвакаћи мишићи (Gamble et al., 2000; Leclair et al., 2003; Kapel et al., 2005, Nöckler and Kapel, 2007; Larter et al., 2011). Узорак би требало да се састоји само од попречно пругастих мишића, избегавати везивно и масно ткиво која нису погодна за ову дијагностичку методу. Тежина узетог узорка би требало да буде два пута већа од испитујућег, како би било могуће одвајање несварљивог ткива. Тежина испитујућег узорка је 100 g. До извођења теста, узорци се чувају на температури 2°C до 8°C. Уколико се узорци замрзавају постоји могућност оштећења ларви врста *Trichinella* које су неотпорне на ниске температуре, те је потребно повећати количину испитујућег узорка како би се постигла потребна осетљивост теста.

Уситњавање узорка – Појединачни или збирни узорци се уситњавају у електричној сецкалицы у трајању од 5 до 10 секунди (не дуже како би се избегло

оштећење ларви), са циљем повећавања површине на коју ће деловати ензими. Сама процедура уситњавања се прилагођава са циљем постизања максималне сварљивости испитујућег узорка и ослобађања ларви (Gajadhar et al., 2009). Интезитет уситњавања зависи од брзине, времена, конструкције самог апарата. Уситњавање обично траје све док постоје видљиви комадићи меса (обично 5-10 секунди на максималној брзини). Недовољно уситњавање може довести до некомплетне дигестије, док превише уситњавања може довести до оштећења мишићних ларви које се налазе у испитујућем узорку (Gamble et al. 2000). После уситњавања, мања количина дигестивне течности (максимално 100 ml на 100 g меса) се додаје са циљем постизања боље хомогенизације узорка и спирања са зидова сецкалице (ОЕ, 2008). После уситњавања тако припремљен узорак се пребацује у чашу са дигестивном течношћу. Сецкалица се на крају испере са мањом количином дигестивне течности како би се избегао могући губитак заосталих ларви. Апарат који се користи за уситњавање би требало да је од стакла или нерђајућег челика који онемогућава слепљивање ларви за зидове сецкалице.

Припрема дигестивне течности – Један од најкритичнијих корака у методи вештачке дигестије је припрема дигестивне течности. Пепсин је комерцијално доступан у облику праха, гранула или течности, са сертификатом о активности. Редослед поступака је следећи: у 2 литра претходно загрејане воде на 47°C додаје се 16 ml 25% хлороводоничне киселине. Коначна концентрација је 0,2% (pH=1-2), максимална активност пепсина се постиже при pH=1,5-1,6. После постављања на претходно темперирану магнетну плочу, додатка магнета за постизање вртлога, додаје се 10 g пепсина, за постизање коначне концентрације од 0,5%. На тај начин се избегава могућност деактивације пепсина у могућем директном контакту са концентрованом киселином. Неопходно је одржавати задату температуру јер више температуре могу довести до деградације ларви и смањене активности пепсина.

Дигестија – Покретљиве ларве трихинела су резистентне на дејство пепсина и хлороводоничне киселине, тако да се могу издвојити из мишићног ткива, али мртве ларве могу бити разложене дејством дигестивне течности. Ефикасна дигестија се постиже на температури од 45°C ± 2°C током целог процеса у трајању од 30 минута и односом од 1:20 за мишићно ткиво и дигестивну

течност. У случају испитивања теже сварљивих узорака мишићног ткива, као што су мишићи пореклом од дивљих животиња, могуће је продужити време до 60 минута (Kapel et al., 2005). Продужавање времена дигестије, као и виша температура од препоручене (50°C) може довести до деградације ларви или деактивације пепсина.

Филтрација дигестивне течности – Након извршене дигестије, добијена течност се филтрира кроз сито пречника 10 cm или више (месинг или нерђајући челик) са окцима промера од 177 μm (180 μm) до 355 μm , тако да је омогућен пролаз ларви трихинела и истовремено задржавање несвареног ткива. Сита не морају бити калибрисана јер се не употребљавају за мерење, али морају бити комплетно очишћена после претходног коришћења како би се избегла контаминација испитујућег узорка и омогућио пролаз присутних ларви. После изливања дигестивне течности, сито је потребно испрати са минимум 100 ml воде, како би се испрале све евентуално задржане ларве. На сити се не сме задржати више од 5% испитујућег узорка, јер би то био знак да дигестија није правилно изведена. Пре употребе сито је потребно поквасити како би се омогућио брз пролаз дигестивне течности.

Седиментација – изводи се у левку по Сквибу (примарна седиментација) у трајању од 30 минута. У стаклену кивету се испушта око 40 ml (секундарна седиментација), након 10 минута одлива се горњих 30 ml. Поступак се понавља неколико пута до добијања бистре течности.

Микроскопски преглед – коначно добијен седимент се преноси у петри плочу и посматра под микроскопом. Микроскопским прегледом секундарног седимента утврђује се присуство ларви трихинела и њихово разликовање од осталих врста нематода, организама и примеса. Неке од основних карактеристика ларви *Trichinella* које омогућавају њихово разликовање јесу: величина (0,7 до 1,1mm дужина и 0,03mm ширина), облик, боја. Најзначајнија одлика ларви трихинела се не може уочити прегледом ларви под стереомикроскопом, због немогућности уочавања стихосома која се састоји од серије дискоидних ћелија постављених уз ивицу езофагуса, које заузимају предњу половину тела. Ларве могу бити умотане, покретне тј. живе или “отворене“ у облику слова С, када су

мртве. Код позитивног налаза, ларве трихинела се издвајају и преносе у миротубе са додатком 90% етил алкохола ради идентификације врсте применом PCR-а.

2.20.1.6. Валидација директних дијагностичких метода

Међународна комисија за трихинелозу (ICT) препоручује да све методе које се користе на кланицама за преглед меса пореклом од свиња и осталих животињских врста, као и меса дивљачи на присуство ларви трихинела, обавезно прођу кроз стандардну процедуру валидације. Такође, сваки новоразвијени лабораторијски метод, захтева процену од стране најмање три референтне лабораторије (Gamble et al., 2000). Успех валидације директно зависи од сталности у раду и униформности узорака који се користе у тестовима компетентности (Forbes et al., 2005). Панел за тестове компетентности се састоји од минимално 3 до 10 узорака, укључујући најмање 1 негативни узорак, најмање 2 узорка са 3 до 5 LPG, а могу се укључити и позитивни узорци са већим бројем ларви (10 до 20 LPG и 20 до 50 LPG). Прихватљиви резултати су откривање најмање 1 ларве, са 95% сигурности у узорцима са 3 до 5 LPG. За узорке са 10 до 20 LPG и 20 до 50 LPG, неопходан је налаз најмање 75% од укупног броја ларви у испитујућем узорку. Током валидације методе вештачке дигестије са магнетном мешалицом, утврђено је да је за степен инфекције од 3 ларве по граму, узорак од 1 грама за индивидуалне прегледе прихватљив. Међутим, код узорака са 1 до 1,9 ларви по граму, неопходно је повећати узорак на 3 до 5 грама (Forbes and Gajadhar, 1999). Метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом је показала 3,2 пута већу осетљивост него метода компресије код узорака са малим степеном инфекције (мање од 2 ларве по граму), без обзира на повећање нивоа просветљења мишићних исечака на трихинелоскопији (Forbes et al., 2005). Упоредна испитивања су потврдила да је и осетљивост и поновљивост методе са стомахером значајно нижа од методе вештачке дигестије са магнетном мешалицом (Webster et al, 2006). Ларве трихинела су биле изгубљене у низу корака процедуре методе са стомахером.

2.20.1.7. Контрола квалитета директних метода

Према препоруци међународне комисије за трихинелозу (ICT) све лабораторије укључене у ланац дијагностичког прегледа на присуство ларви трихинела у узорцима меса, требало би да имају уведен и одржаван систем квалитета, који обезбеђује документовану оспособљеност особља који изводе методу у контролисаним условима, што за последицу има поузданост и сталност резултата (Gamble et al., 2000). Захтеви потрошача за производњу безбедне хране, међународна трговина, увоз и извоз меса и месних производа довели су до развоја постојане дијагностичке методе која испуњава захтеве стандарда (Forbes et al., 1999, Gajadhar and Forbes, 2002). Акредитоване лабораторије (Gamble et al., 2000; Forbes et al., 2005) у пословнику квалитета обезбеђују информације о обучености испитивача, потребама за обукама, начинима надзора, опреми и њеном одржавању, начину чувања података и пријаве позитивних случајева, спровођењу корективних мера у случају неусаглашених испитивања, интерним и екстерним контролама од стране сертификационих тела, међулабораторијским испитивањима. Свака лабораторија мора имати свој стандардизовани протокол како би се обезбедила тачност и поновљивост резултата од стране друге лабораторије. Протокол за валидацију мора бити јасан и садржати све потребне информације везано за опрему, реагенсе, поступке. Извођење мора бити у складу са написаним протоколом, који садржи критичне контролне тачке (везано за процедуру, опрему и реагенсе што може довести до значајог утицаја на методу). Веома је важна повезаност и следљивост у идентификацији узорка и трупа заклане свиње од које потиче позитиван или сумњив узорак (Gamble et al., 2000).

2.20.2. Индиректне дијагностичке методе

Индиректне методе дијагностике подразумевају откривање присуства специфичних антитела против трихинела (OIE, 2008) у серуму, крви или ткивној течности.

ELISA тест има широку примену, како пре тако и после клања животиња чије је месо намењено за људску исхрану. Заснивају се на коришћењу екскреторно-секреторних антигена који је добијен у краткотрајној култивацији *T. spiralis in vitro*. Тест се показао као високо осетљив и специфичан. Нису

препоручене методе за индивидуална испитивања (Gamble et al., 2000). Серолошка испитивања су погодна за епизоотиолошка проучавања и вршење програма надзора у популацији животиња где је преваленција трихинелозе висока (Gamble et al., 2004, Smith R.D. 1991). До сада су у нашој земљи серолошка испитивања већег обима ретко вршена. Тако је крајем осамдестих година на једном од ендемских подручја Србије у региону Кладова испитано 1116 свиња од којих је 4,6% било позитивно (Ћуперловић et al., 1989a,b). Такође је вршено и испитивање које је обухватило шест општина Браничевског округа. Од укупно прегледаних 916 јединки, проценат серолошки позитивних свиња био је 1,6%, што је знатно више од процента утврђених инфекција свиња путем редовних трихинелоскопских прегледа (0,255% - 0,838%) зависно од године (Zivojinovic et al., 2009).

ELISA тест је најчешће коришћени тест за детекцију антитела против трихинела, јер је поуздан, стандардизован, и економски је исплатив (OIE, 2008). Резултати многобројних експерименталних и/или теренских испитивања указују на успешност индиректног ELISA теста у откривању специфичних антитела против трихинела у узорцима крвних серума и месног сока. (Murrell et al., 1986; Smith, 1987; Smith and Snowdon, 1989; Jakob et al., 1994; Nockler et al., 1995; Gamble, 1996, Gamble and Patrascu, 1996; Nockler et al., 2004).

Од индиректних тестова могу се користити и тестови као што је: тест индиректне имунофлуоресценције, а нарочито Western blot тест (који се сматра изузетно корисним потврђивим тестом), док се тестови као што је реакција везивања комплемента и хем-аглутинациони тест више практично не налазе у употреби (Nockler et al., 2000).

2.20.2.1. ELISA тест

Крајем прошлог века, тачније од 1980. године, многобројна истраживања су допринела развоју и усавршавању индиректног ELISA теста за утврђивање специфичних антитела у серуму, пуној крви и месном соку (Gamble and Patrascu, 1996) зараженог домаћина. У тесту се користе микротитрационе плоче на које је нанешен антиген *Trichinella*. Антитела присутна у крвном серуму или месном соку који се испитује, после инкубације на 37°C ће се везати за антиген. Остатак

серумских елемената се процесом испирања одстрањује. Комплекс антиген-антитело бива изложен дејству секундарног реагенса антитела (коњугата) који препознаје IgG класу антитела у серуму одређене врсте животиња и за који је везан ензим (обично пероксидаза из рена). После додавања субстрата (хромоген) заједно са водоник пероксидом, ензим коњугован за везано антиглобулинско антитело ће довести до производње слободних радикала кисеоника, што изазива бојење супстрата. Интезитет развијене боје се мери као оптичка густина на спектрофотометру и директно је пропорционална нивоу антитела. Осетљивост и специфичност теста зависе од компоненти самог ELISA кита.

Ово је метода која је препоручена од стране ЕУ према Директиви број 2075/2005 (Gamble et al., 2004 World Organization for Animal Health, 2008) за надзор могућег присуства инфекције *Trichinella* spp. на фармама свиња

2.20.2.2. Антиген

Првобитно је у ELISA тесту за серолошки преглед свиња, коришћен соматски антиген који је припреман од целе мишићне ларве (Ruitenbergh et al., 1974). Овако припремљен сирови екстракт прве фазе развоја ларве показивао је слабу специфичност и давао многобројне унакрсне реакције (Ruitenbergh et al., 1976; Ruitenbergh and Van Knapen, 1977; Clinard, 1978; Taylor et al., 1980). Применом секреторно екскреторних антигена добијених гајењем мишићних ларви трихинела *in vitro*, током осамдесетих година прошлог века, значајно је побољшана специфичност. Овако произведен антиген се састоји од групе структурно блиских гликопротеина (Gamble et al., 1983; Gamble and Graham, 1984).

Најзаступљенији антигенски епитоп који препознаје организам домаћина је такозвана TSL-1 група, која се налази у ћелијама стихоцита и на површини паразитске кутикуле. Њих активно производе ларве прве фазе развоја у мишићима (Appleton et al., 1991; Ortega-Pierres et al., 1996). TSL-1 антигенски епитоп препознаје антитела свих животиња и људи заражених врстама трихинела (Appleton et al., 1991). Тако, специфичност антигена у односу на врсту трихинела за серологију нема значаја, јер ће секреторно/екскреторни антиген који синтетишу мишићне ларве *T. spiralis*, детектовати специфична антитела на *T. spiralis* али и сваке друге врсте трихинела (Kapel and Gamble, 2000; Gamble et al., 2004; Nockler

et al., 2005). Врло је важно обезбедити оптималне услове за производњу TSL-1 антигена. Један од критичних фактора је време инкубације од 18 сати. Прекорачење тог времена омогућиће ослобађање неспецифичних антигена из ларве трихинела и контаминацију екскреторно/секреторне комбинације антигена (Gamble et al., 1988). У таквим случајевима присутни су и антигени којих има и код осталих хелмината, што доводи до смањења специфичности и унакрсних реакција у ELISA тесту (Gamble and Graham, 1984). На TSL-1 антигенима постоји необична, за врсте трихинела карактеристична угљенохидратна структура - тивелоза која је имунодоминантни део гликопротеина. Синтетски антиген тивелозе произведен је за употребу у ELISA тесту, а показује високу стабилност и могућност стандардизације (Wisnewski et al., 1993; Reason et al., 1994). Неколико истраживања су показала да се може користити за дијагностику код људи, свиња и других врста животиња (Gamble et al., 1997; Bruschi et al., 2001; Owen et al., 2001; Müller et al., 2005). Употребом оваквог антигена добија се већа специфичност, мањи број лажно позитивних резултата (Dea-Ayuela et al., 2001), али је смањена осетљивост (Gamble et al., 2004), те зато овај антиген није ушао у ширу примену.

2.20.2.3. Узорак за испитивање у индиректним дијагностичким методама

За серолошке дијагностичке тестове са циљем откривања специфичних антитела против трихинела најчешћи узорак је крвни серум. Након узорковања крви и издвајања серума, у најкраћем могућем року аликвотирани узорци серума се замрзавају на -20°C . Одмрзавање и поновно замрзавање би требало избегавати, јер на тај начин долази до смањења титра антитела. Узорци који се користе чешће у лабораторијским испитивањима се аликвотирају и замрзавају на -80°C или се лиофилизују. У случајевима кад замрзавање није могуће, серумима се додаје 1% мертиолат или неки други презерватив у разређењу 1:10.000 (Gamble et al., 2004). Узорци серума слабог квалитета услед настале хемолize или микробиолошке контаминације, поготово пореклом од дивљачи, могу значајно умањити специфичност теста (OIE, 2008). Остали могући узорци за испитивање су крвна плазма, пуна крв и ткивни сокови (месни сок) (Gamble and Patrascu, 1996). Резултати експерименталних испитивања указују на могућност коришћења ткивних течности

као што је месни сок пореклом од закланих свиња, одстрелене или угинуле дивљачи (дивље свиње и лисице) за серолошка испитивања применом ELISA теста (Gamble and Patrascu, 1996; Kapel et al., 1998). Титар антитела у узорцима месног сока је обично нижи него у узорцима серума. Зато се препоручује испитивање мањих разређења месног сока у односу на крвни серум. Месни сок се може добити тако што се узорак од 10 g дијафрагме исецка у комадиће и замрзне на -20°C у пластичним кесама, после одмрзавања на собној температури микропипетом прикупи се и пренесе у микроепрувете (Nockler et al., 2005). Тако добијени узорци месног сока од експериментално инфицираних свиња са 200, 1.000 и 20.000 ларви *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis* и *T. nativa* су у упоредном испитивању ELISA тестом са узорцима крвних серума, показали добру корелацију титра антитела. Узорци месног сока су испитивани у разређењу 1:10, а серум у разређењу од 1:100 (Nockler et al., 2005). Овакви резултати су потврђени и у упоредним испитивањима месног сока и крвног серума код домаћих свиња, дивљих свиња и лисица коришћењем и секреторно/екскреторног антигена и тивелоза антигена.

2.20.2.4. Коњугат и супстрат

Коњугат који се користи у ELISA тесту се састоји од анти-антитела (поликлонских антитела насталих имунизацијом овце или козе пречишћеним имуноглобулином изолованим из врсте животиња код које се испитује хуморални имунски одговор на пример овца анти свињски IgG) и ензима (пероксидаза или алкална фосфатаза). Улога коњугата је у препознавању антитела у испитиваном узорку која су се везала за антиген. Комерцијално произведен коњугат постоји само за одређене врсте животиња. Због међусобне сличности неких врста могуће је некада једну врсту коњугата користити за анализу антитела код сродне врсте животиња на пример анти IgG псећи коњугат могуће је користити код испитивања узорака пореклом од лисица (Gamble et al., 2004). Протеин G који се неспецифично везује за IgG многих врста животиња, може се користити за откривање специфичних антитела и код свиња и код паса. Визуализацију реакције у ELISA тесту омогућава супстрат. Неколико врста комерцијално произведених супстрата је доступно на тржишту. С обзиром да одређени супстрати показује потенцијално мутагена и канцерогена својства, неопходан је посебан опрез током

рада у лабораторији. Субстрати као што су ABTS (2,2'-азино ди 3-етилбензиазолин-6-сулфидна киселина) и тетраметилбензидин-ТМБ су безбедни за употребу и најчешће се налазе као готови раствори у комерцијалним ELISA тестовима.

2.20.2.5. Валидација ELISA теста

Валидација ELISA теста, пре свега се односи на ниво могућности (способности) добијања позитивних или негативних серолошких резултата у процени статуса испитиване популације животиња. Ова могућност не зависи само од прецизности самог теста, његове специфичности и осетљивости, већ и од нивоа стварне преваленције испитиване популације или вероватноће (претпоставке) да је појединачна јединка заражена (OIE, 2008). У овом смислу, очекивана позитивна предвиђена вредност преваленције за инфекције са врстама трихинела је веома ниска. Зато се код ELISA теста увек поставља панел сигурно (претходно потврђених) позитивних и негативних узорака серума. Негативни узорци би требало да буду пореклом из локалне популације животиња, док позитивни имају различит титар од слабо до високо позитивних и у вези су са различитом јачином и фазом инфекције. Приручник OIE из 2008. препоручује минимум 300 познатих позитивних узорака и 1000 негативних за утврђивање осетљивости и специфичности теста. Граничне вредности су одређене на основу серолошких резултата неинфицираних и инфицираних контролних животиња (Jacobson, 1999). Осетљивост ELISA теста код свиња са екскреторно/секреторним антигеном, креће се од 93,1% до 99,2%, док је специфичност од 90,6% до 99,4% (Murrell et al., 1986; Oliver et al., 1989; Van der Leek et al., 1992). Истраживања спроведена на 1.627 узорака месног сока свиња пореклом из Немачке и Хрватске, указала су да су осетљивост и специфичност ELISA теста достигала вредност од 81,8% и 99,3% у поређењу са резултатима вештачке дигестије која је коришћена као златни стандард. У истом истраживању на узорцима серума, ELISA тест је показао осетљивост од 72,7% и специфичност од 99,6%. Међутим, добијени су и лажно негативни резултати са узорцима пореклом од животиња код којих је интестинет инфекције био низак (0,17 до 0,38 LPG материјала) (Nockler et al., 2004). У другом испитивању популације свиња на присуство *Trichinella* инфекције (Forbes et al.,

2004) коришћена су два ELISA теста са екскреторно/есекреторним антигеном и гликанским антигеном у испитивању популације свиња на присуство *Trichinella* инфекције. Осетљивост је одређена на основу испитивања 113 узорак прикупљених између 3. и 21. недеље, након експериментално изведене инфекције 15 свиња. Специфичност је утврђена коришћењем 397 узорак пореклом од свиња сигурно слободних од трихинела. Тако је 49. дана после инфекције, осетљивост и специфичност гликан-ELISA теста (са тивелозом) била 94,3% и 96,7% у поређењу са ELISA тестом који користи екскреторно-есекреторне антигене. У том случају, осетљивост је износила 84,9% а специфичност 96,0%. Ово истраживање је указало на боље особине гликан-ELISA теста у односу на ELISA који има секреторно-екскреторне антигене у дијагностици трихинелозе свиња (Forbes et al., 2004). Упоредивањем са резултатима Western blot теста, закључено је да не постоје унакрсне реакције *Trichinella* антигена и серумских антитела на различите нематоде које су присутне код свиња (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Strongyloides ransomi*, *Hyostrogylus rubidus*, *Oesophagostomum dentatum*) (Nockler et al., 1995). Током серолошких испитивања популације дивљих животиња у природним условима, добијени су лажно позитивни резултати, који су указивали на високу преваленцију у регионима где инфекција трихинелама није никада утврђена или је било и до сто пута мање позитивних резултата вештачке дигестије у односу на резултате серолошких испитивања. (Nockler and Boigt, 1998; Wacker et al, 1999). Овакви подаци указују на потребу дизајнирања ELISA тестова са већом осетљивошћу за испитивање дивљих животиња, код којих степен инфекције може бити значајно низак. На основу тога препорука ICT је обавезна валидација серолошког теста (осетљивост и специфичност) у односу на испитиване врсте животиња (Gamble et al, 2004) коришћењем Western blot теста. Крајњи циљ је искључивање унакрсних реакција које су могуће код паразитоза.

2.20.2.6. Western blot тест

Ова дијагностичка метода је врло значајна за откривање јединки заражених са *Trichinella* spp. и њихово разликовање од оних заражених неким другим хелминтима. Овај тест се може користити као основни или потврдни тест. У дијагностичке сврхе, често се користи као потврдни тест за ELISA-позитивне

серуме пореклом од људи или свиња, због тога што ELISA може некад дати лажно позитивне резултате (Maria Angeles Gomez-Morales et al. 2012). Када се користи екскреторно секреторни антиген, имуоблот је веома поуздан, специфичан и користан у истраживањима (Andrews et al., 1995). У току развоја болести са Western blot тестом се могу открити специфична антитела пре ELISA теста (Yera et al., 2003). Укратко, полиакриламид-гел електрофорезом врши се раздвајање ЕС антигена на поједине гликопротеине различитих молекулских тежина. Њиховим пребацавањем на мембрану од нитроцелулозе и инкубирањем са серумом испитиване, потенцијално инфициране јединке, омогућава се да поједине од раздвојених компоненти ЕС антигена реагују са специфичним антителима. Уколико се након додавања коњугата и субстрата појаве обојене траке које одговарају предходно дефинисаним молекулским тежинама гликопротеина из састава ЕС антигена резултат се сматра позитивним (присуство специфичних антитела а самим тим и инфекција са *Trichinella* spp. је потврђена). Тако се присуство антитела која препознају антигене из фамилије ТСЛ-1 антигена (тј налаз обојених трака у зони гликопротеина чије су молекулске тежина између 40kDa-70kDa) сматра високо специфичним. Мада поједине компоненте из састава ЕС антигена *Trichinella* могу бити заједничке са другим хелминтима и тако довести до појаве унакрсне реакције(на прим. постоје подаци о унакрсној реакцији са *Anisakidae* (Yera et al., 2003), присуство трака које не одговарају траженим молекулским тежинама неће бити тумачено као позитиван резултат за присуство *Trichinella* spp инфекције. За одређивање IgG подкласе (IgG4) може се употребити пречишћени 45 kDa гликопротеин (Pinelli et al., 2001).

2.20.3. Контрола квалитета индиректних метода

Систем квалитета мора бити постојан како за дијагностику методом вештачке дигестије, тако и за серолошке тестове (OIE, 2008). Лабораторија мора имати уведен и документовано одржаван стандард ISO/IEC 17025, што подразумева постојање протокола за извођење методе, оспособљено и компетентно особље, програм међулабораторијског испитивања, записе, адекватне и одржаване опреме. Коришћени комерцијални ELISA китови морају имати одговарајућу евалуацију од стране међународне референтне лабораторије

(Gamble et al., 2004). Све компоненте које се користе током извођења теста, морају се адекватно чувати и употребљавати у складу са системом квалитета (Gajadhar and Forbes, 2002). Обавезан је панел сигурно позитивних, негативних и сумњивих узорака за проверу сваке новоупотребљене плоче.

2.20.4. Остали индиректни тестови

Имуноелектрофореза или латекс аглутинација се препоручују само у ситуацијама када је неопходна брза дијагноза (резултат потребан за мање од 1 сата). Њихово коришћење није уобичајно, јер им је осетљивост и специфичност мања у поређењу са ELISA тестом. Реакција везивања комплемента је поуздана дијагностичка метода, али се изузетно ретко користи у дијагностиковању трихинелозе (Ivanovska et al., 1989.) На тржишту су кратко време били присутни и веома корисни брзи тестови на мембрани који су се лако користили на терену наношењем капи крви из уха свиње (TS Card Pork, Lateral Flow test, Patrascu et al., 2001). У случају присуства специфичних антитела против *Trichinella* на малој мембрани су се после неколико минута појављивале 2 обојене траке, а у случају негативне реакције постојала је само једна тзв контролна трака.

2.20.5. Идентификација врсте рода *Trichinella* применом Multiplex PCR методе

Са биолошког и епизоотиолошког становишта данас је изузетно значајно идентификовати врсту унутар рода *Trichinella* и пратити њено кружење у природи. Применом савремених молекуларних тестова могуће је утврђивање присуства, као и идентификација врста и генотипова *Trichinella*.

Ова метода је врло значајна јер се њеном применом може на релативно брз, једноставан и поуздан начин установити врста ларви *Trichinella* нађених у узорку мяса применом метода вештачке дигестије, што има како научни тако и стручни и практични значај.

За идентификацију врсте или генотипа користе се појединачне ларве трихинела -које су конзервиране у етанолу, а пореклом су од мишићног ткива људи или/и животиња.

Величина ITS1, ITS2 и ESB фрагмента карактеристичних за поједине врсте трихинела а добијених амплификацијом са нуклеотидним паровима, приказана је у Табели 4.

Табела 4 – Димензије очекиваних амплификационих продуката (у базним паровима) за сваки таксон

	<i>T. spiralis</i>	<i>T. nativa</i>	<i>T. britovi</i>	<i>T. pseudospiralis</i>	<i>T. murrelli</i>	<i>Trichinella T6</i>	<i>T. nelsoni</i>	<i>T. papuae</i>	<i>T. zimbabwensis</i>
ESB	173	127	127	310-350	127	127	155	240	264
ITS1			253			210			
ITS2					316		404		

Коришћењем multiplex PCR технике са 5 олигонуклеотидних парова, могуће је идентификовати појединачну ларву коришћењем само једног амплификационог теста на нивоу врсте и генотипа.

2.20.5.1. Принцип PCR методе

PCR је метода молекуларне биологије која се користи за препознавање специфичних фрагмената нуклеинске киселине, при чему је почетна и крајња секвенца нуклеотида позната (олигонуклеотидни пар). Ако врста (или генотип) има своју сопствену карактеристичну ДНК (састав и/или димензија) могуће је изабрати тај олигонуклеотидни пар за израду. Метода показује високу осетљивост и специфичност. Модификација “стандардне PCR методе” је multiplex PCR, када се користе два или више олигонуклеотидна пара. Тада је могуће испитати већи број секвенци истовремено.

Данас су као припадници рода *Trichinella* идентификовани 9 сродних врста *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. 12*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* и 3 генотипа *Trichinella*-Т6, *Trichinella*-Т8 и *Trichinella*-Т9. Све врсте се међусобно разликују на основу састава и/или димензија нуклеотидне секвенце различитог локуса. Компаративном анализом три нуклеотидне секвенце утврђено је да припадају ITS1, ITS2 и ESB, што омогућава једнозначну идентификацију већине епизоотиолошки значајних врста: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* и *Trichinella*-Т6.

Табела 5 - Олигонуклеотидне секвенце са ознакама комплета за умножавање секвенци Референтне паразитолошке лабораторије ЕУ

Олигонуклеотидне секвенце	ознака	Умножена секвенца
5'-GTT.CCA.TGT.GAA.CAG.CAG.T-3' 5'-CGA.AAA.CAT.ACG.ACA.ACT.GC-3'	cp-I.F cp-I.R	ESB
5'-GCT.ACA.TCC.TTT.TGA.TCT.GTT-3' 5'-AGA.CAC.AAT.ATC.AAC.CAC.AGT.ACA-3'	cp-II.F cp-II.R	ITS1
5'-GCG.GAA.GGA.TCA.TTA.TCG.TGT.A-3' 5'-TGG.ATT.ACA.AAG.AAA.ACC.ATC.ACT-3'	cp-III.F cp-III.R	ITS1
5'-GTG.AGC.GTA.ATA.AAG.GTG.CAG-3' 5'-TTC.ATC.ACA.CAT.CTT.CCA.CTA-3'	cp-IV.F cp-IV.R	ITS2
5'-CAA.TTG.AAA.ACC.GCT.TAG.CGT.GTT.T-3' 5'-TGA.TCT.GAG.GTC.GAC.ATT.TCC-3'	cp-V.F cp-V.R	ITS2

2.21. Инспекцијски преглед меса у складу са Европским прописима

Трихинелоза већ дуго има велики социјално-економски значај, као и значај у хуманој и ветеринарској медицини (Webster et al., 2006). Трошкови инспекцијског прегледа свињског меса у ЕУ, крајем прошлог века процењени су на 570 милиона евра годишње (Pozio, 1998). Почетком овог века, истраживања спроведена на територији Европе показала су да је утврђено више од 1.100 случајева трихинелозе, од чега је 984 случајева регистровано у Србији, Хрватској, Бугарској и Румунији. Према извештају Светске здравствене организације у 2010. години потврђено је 223 случајева обољења људи. Већина пријављених случајева била је из неколико земаља, односно из Румуније и Литваније. У највећем броју потврђених случајева утврђен је извор заражавања људи.

Од пресудне важности је коришћење одговарајуће дијагностичке методе (Duroou-Samet, 2006). Према препоруци ИСТ сви потенцијални домаћини за врсте трихинела, чије је месо намењено за исхрану људи морају бити прегледани са већ прихваћеном и одобреном методом. У том смислу, преглед на кланицама је дизајниран тако да спречи клинички манифестну трихинелозу људи, а не могућу инфекцију у потпуности (Gamble et al., 2000). Тако је постало могуће утврдити вероватне изворе инфекције и развити адекватне дијагностичке методе. Рудолф Вирхов је на основу ових сазнања креирао метод за преглед домаћих свиња на присуство ларви трихинела у Немачкој. Кроз многобројна истраживања, Вирхов је закључио да је заражавање свиња индивидуално, док се конзумирањем меса само једне заражене свиње може инфицирати велики број људи. Зато је сасвим

оправдано захтевао инспекцијски преглед сваке заклане свиње на присуство/одсуство ларви трихинела чије је месо намењено за исхрану људи (Virchow, 1864). До 2005.године у ЕУ инспекцијски преглед меса на присуство ларви трихинела био је регулисан директивом 64/433/ЕЕС посебно за преглед свињског, коњског и меса дивљачи. Директива 77/96/ЕЕС је регулисала преглед приликом увоза свињског меса из трећих земаља, док се директива 92/45/ЕЕС односила на изловљену дивљач и услове продаје меса дивљачи. Од 01. јануара 2006. године законска регулатива која се односи на контролу трихинела у месу намењеном за исхрану људи је дефинисана у виду пакета (ЕЦ) No 2075/2005 који садржи тачно одређена правила за званичну контролу. Овај законски пакет се заснива на: Регуллативи (ЕЦ) No 853/2004 којом се прописују специфични услови за одржавање хигијене за храну животињског порекла, Регуллативи (ЕЦ) No 854/2004 која описује организацију званичне контроле производа животињског порекла намењених за људску исхрану, као и на Регуллативи (ЕЦ) No 882/2004 којом се цели поступак усклађује са осталим законским прописима који се односе на храну, здравствену заштиту и добробит животиња.

2.22. Инспекцијски преглед закланих свиња, коња и дивљачи на кланицама у земљама ЕУ

У складу са Европском Регуллативом (ЕЦ) No 2075/2005 трупови закланих домаћих свиња, коња, дивљих свиња и осталих фармски гајених или дивљих животиња чије месо намењено за исхрану људи а могући су домаћини трихинела мора бити прегледано у току процеса прегледа на кланици. Узорци мишићног ткива морају се узети са одговарајућих места у односу на животињску врсту (Табела 6).

Уколико не постоји могућност узорковања са предилекционог места, мора се повећати тежина узорка (Табела 7).

Преглед се мора вршити у лабораторији која је призната од стране званичних институција те земље. На територији земаља ЕУ у сврху здравствено безбедног меса и производа од меса, вештачка дигестија као директна метода за откривање ларви трихинела у месу је једина поуздана метода (Gamble et al., 2000; OIE, 2008). Узорак може бити појединачни или збирни, а метода се заснива на

ензимској разградњи мишићних влакана коришћењем пепсина у киселој средини, након чега се врши изолација и идентификација утврђених ларви (Nöckler and Kapel, 2007).

Табела 6 – Предилекциона места за ларве трихинела код различитих врста животиња (Gamble et al, 2000; Kapel, 2000; Pozio et al, 2007; Kapel et al, 2005)

Врста животиње	Предилекционо место за узорковање	Циљ испитивања
Домаћа свиња	Дијафрагма, језик, жвакаћи мишићи	Инспекцијски преглед меса домаћих животиња
Коњ	Језик, жвакаћи мишићи	
Дивља свиња	Мишићи надлактице, дијафрагма	Инспекцијски преглед меса дивљачи
Медвед	Дијафрагма, жвакаћи мишићи, језик	
Морж	Језик	
Фока	Језик, дијафрагма, пераја, жвакаћи мишићи	
Лисица	Дијафрагма, мишићи надлактице	
Ракун	Дијафрагма, мишићи надлактице	Епизоотиолошка истраживања на животињама резервоарима
Крокодил	Међуребарни мишићи, језик, мишићи надлактице, реп	

Табела 7 – Тежина узорка у односу на врсту животиња изражена у грамама

Врста животиње	Локација узорка	Тежина узорка	Тежина алтернативног узорка	Тежина за преглед
Свиња	Дијафрагма	1 (товна свиња) 2 (нераст и крмача)	2 (товна свиња) 4 (нераст и крмача) 5 осталих мишића	Цео узорак
Коњ	Језик или жвакаћи мишићи	10	Већи део дијафрагме	5
Дивља свиња	Мишићи надколенице, језик или дијафрагма	10	-	5
Медвед	Дијафрагма, жвакаћи мишићи или језик	10	-	10

Постоји неколико варијанти методе вештачке дигестије, али је само метод са магнетном мешалицом међународно препознат и признат (European Community, 2005; Webster et al., 2006; OIE, 2008). Користи се велики број различитих варијанти ове методе се користи, али је само мали број адекватно стандардизован (Forbes and Gajadhar, 1999).

Референтном методом, златним стандардом у дијагностици се сматра метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом. У току једног испитивања може се прегледати већи број узорака захваљујући могућности прегледа збирних узорака. Највећа могућа тежина збирног узорка за прве три методе је 100 g, док је са методом Трихоматик 35 тежина 35 g. Тежина појединачних узорака може износити 1, 2, 4, 5 и 10 g).

2.23. Сертификована производња свиња

Познавање начина ширења паразита рода *Trichinella* омогућава узгајивачима свиња да сачине одговарајуће планове о начину и условима узгоја свиња, који у значајној мери могу смањити ризик од уношења инфекције на фарму, односно газдинство. Примена одговарајућих поступака, вођење документације о примени истих уз редовну званичну контролу којом се потврђују сви ти поступци, у неким земљама света је довољан како би произвело безбедно свињско месо (без инспекцијске контроле после клања). ICT је прописала водич за фарме слободне од *Trichinella* spp: “Препоручене методе за контролу инфекције трихинелом код домаћих и дивљих животиња чије је месо намењено за исхрану људи“ ('Recommendations on Methods for the Control of *Trichinella* in Domestic and Wild Animals Intended for Human Consumption') (Gamble et al., 2000; <http://www.med.unipi.it/ict/Ресомм.htm>). Основни елементи ове препоруке су део Европске регулативе (ЕС) No 2075/2005, према којој трупови закланих свиња које потичу из запата који су званично препознати и сертификовани као *Trichinella* слободни запати, не подлежу инспекцијској контроли након клања. Сличан програм постоји и у САД: “Трихинела сертификациони програм за запате свиња“ USA Trichinae Herd Certification Program Standards (www.aphis.usda.gov/vs/trichinae).

Препорука ICT-а описује минимум услова које мора испунити запат који ће бити декласиран као запат са минималним ризиком за могућност инфекције са врстама трихинела. Описани су: грађевинске карактеристике објекта које онемогућавају улазак глодара (обезбеђивање отвора као што је вентилација или цеви за воду са жичаном мрежом, најмање 100 метара око објеката у коме су смештене свиње, неопходно је одржавати чист простор, без отпадака и ђубришта који представљају идеална станишта за глодаре, 2 метра у круг око објеката треба

нанети шљунак и не дозволити присуство растиња вишег од 10цм) као и начин исхране свиња и чувања хране (храна мора бити смештена у затворене силосе како би приступ глодарима био онемогућен, храна која се користи мора бити познатог порекла од сертификованог произвођача, отпаци од хране се обавезно термички обрађују). Посебна пажња је посвећена контроли глодара која се мора изводити систематски од стране сертификоване организације (присуство глодара контролише се откривањем јазбина, трагова кретања, измета и по потреби се врши дератизација, уз документовано праћење свих предузиманих поступака). Свака угинула животиња се мора уклонити у року од 24 сата уз предузимање свих санитарних мера, док у кругу од 2км око фарме не сме бити никаквих депонија, јама, ђубришта. Новонабављене животиње морају потицати само са сертификованих *Trichinella* слободних фарми и морају бити у карантину најмање три недеље, када се и серолошки прегледају на присуство специфичних *Trichinella* антитела. Целокупну процедуру неопходно је да прати документација као писани доказ о свим предузетим мерама, која укључује и званично издат сертификат, повремене контроле примењиваног система, серолошке тестове, све у циљу потврде одсуства *Trichinella* инфекције.

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ ИСТРАЖИВАЊА

Циљеви истраживања ове докторске дисертације су:

- утврђивање и идентификација генотипова и врста рода *Trichinella* присутних на ендемском подручју Браничева и Подунавља;
- дефинисање биоиндикатора трихинелозе и боље разумевање биогеографије трихинелозе у домаћем и сивлатичном циклусу на ендемском подручју Браничева и Подунавља;
- сагледавање комплексне епизоотиологије трихинелозе и примена адекватних метода дијагностике, што би омогућило обнављање постојећих и постављање нових превентивних и контролних програма за ову паразитску зоонозу.

Задаци истраживања ове докторске дисертације су:

- а) Прикупљање узорака мишићног ткива пореклом од животиња са територије Браничевског и Подунавског округа;
- б) Прикупљање узорака крвних серума пореклом од животиња потенцијалних биоиндикатора са територије која се проучава (Браничевски и Подунавски округ);
- в) Испитивање крвних серума пореклом од животиња потенцијалних биоиндикатора на присуство специфичних антитела (*ELISA*, *Imunoblot*);
- г) Генотипизација унутар рода *Trichinella* (*PCR*);
- д) Статистичка обрада добијених података;
- ђ) Епизоотиолошка обрада података, мапирање и дефинисање биоиндикатора за установљене врсте/генотипове из рода *Trichinella*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Материјал

4.1.1. Узорци мишићног ткива пореклом од животиња са територије Браничевског и Подунавског округа

За потребе овог истраживања врста и количина узорка је одређивана у складу са препоруком Референтне лабораторије за паразите ЕУ (EURLP), датом у водичу о начину узорковања и идентификацији, мониторингу присутних врста рода *Trichinella* у пријемчивим врстама животиња на одређеном географском подручју. EURLP је за територију Европе на основу досадашњих резултата истраживања о присуству врста трихинела у популацији и домаћих и дивљих животиња, дефинисала земље са ризиком и занемарљивим ризиком за могућу инфекцију врстама рода *Trichinella*. Како је Србија земља у којој је трихинелоза присутна и у популацији домаћих и дивљих животиња, подручје које је обухваћено овим истраживањем се може сврстати у прву ризичну групу, са високим ризиком за појаву трихинелозе (подручја са високом преваленцијом инфекције трихинелом у популацији дивљих животиња и домаћих свиња чије је месо намењено за исхрану људи).

У овом раду извршено је испитивање мишићног ткива пореклом од 579 различитих врста животиња, прикупљених током 2010. године.

Испитивани узорак се састојао само од поречно пругастих мишића. Одстрањивана су везивна и масна ткива која нису погодна за ову дијагностичку методу. Узорци мишићног ткива су чувани на температури фрижидера +4°C и непосредно пре прегледа темперирани на собној температури.

Домаће свиње

За потребе овог истраживања издвојени су узорци пореклом од домаћих свиња са територије Браничевског и Подунавског округа из периода 2010. године.

У овом раду испитано је 211 узорака мишићног ткива методом вештачке дигестије. Циљана популација су биле домаће свиње, товљеници старости до 1

године који су потицали са 61 индивидуалних газдинстава у којима је већ утврђен позитиван налаз у току 2010. године, док је 150 узорак мишићног ткива потицало од свиња, товљеника са индустријских фарми. Узорци мишићног ткива узимани су од корена дијафрагме, али и од следећих мишића: жвакаћи, мишића базе језика, међуребарни мишићи. Прављен је збирни узорак од свих врста мишића и тежина појединачног прегледаног узорка била је 100 g пореклом од једне животиње.

Пси

Укупно је прегледано 30 узорак мишићног ткива пореклом од паса са територије Браничевског и Подунавског округа који су угинули и чији је обдукциони преглед у циљу утврђивања узрока угинућа (саобраћајне несреће, тровања, различите врсте патолошких стања малих месоједа) вршен у Ветеринарском специјалистичком институту Пожаревац. Узорци су потицали од корена дијафрагме, жвакаћих мишића и језика.

Укупно је прегледано 30 узорак мишићног ткива пореклом од паса са територије Браничевског и Подунавског округа који су угинули и чији је обдукциони преглед у циљу утврђивања узрока угинућа (саобраћајне несреће, тровања, различите врсте патолошких стања малих месоједа) вршен у Ветеринарском специјалистичком институту Пожаревац. У ову групу узорак спада и 7 узорак паса који су угинули у азилу за псе након венепункције извршене ради серолошке дијагностике инфекције са трихинелом. Сви узорци за преглед потицали су од корена дијафрагме, жвакаћих мишића и језика. Прављен је збирни узорак од узоркованих мишића, тако да је тежина појединачног прегледаног узорка била 50 g.

Дивље животиње

Анализирано је 338 узорак пореклом од дивљих животиња (174 дивљих свиња, 118 лисица, 42 шакала и 4 вука). Узорци мишићног ткива били су код свих врста пореклом од дијафрагме и мишића предњих ногу. Од узоркованих мишића прављен је збирни узорак од 50 g који је затим прегледан.

4.1.2. Узорци крвних серума свиња, паса и месног сока дивљих свиња

Узорци крвних серума домаћих свиња били су пореклом 195 животиња са територије Браничевског и Подунавског округа Републике Србије.

Узорци крвних серума паса потицали су од 11 животиња смештених у прихватилишту за псе и мачке, а који су били ухваћени у непосредној близини градске депоније на територији општине Пожаревац.

Сви наведени серуми су одвајани после спонтане коагулације крви центрифуговањем на 3000 ×g 10 минута. Овако добијени серуми су аликвотирани у микроепрувете и чувани до испитивања на -20°C.

Узорци месног сока изоловани су од 17 дивљих свиња са територије Браничевског и Подунавског округа. Сок је добијен из наведеног мишићног ткива (дијафрагма, мишићи предњих ногу) које је након стајања на собној температури, под притиском отпустило месни сок.

4.1.3. Узорци ларви рода *Trichinella*

У циљу идентификације врста рода *Trichinella* присутних на епизоотиолошком подручју Браничевског и Подунавског округа извршено је PCR испитивање ларви пореком од 59 животиња код којих је утврђено присуство ларви у узорцима мишићног ткива методом вештачке дигестије.

Узорци су потицали од 6 врста животиња и то: 25 домаћих свиња, 7 дивљих свиња, 8 лисица, 8 шакала, 4 вука и 7 паса.

Након микроскопског прегледа седимента, код позитивног налаза, ларве трихинела су издвајане и пренете у микротубе са додатком 90% етил алкохола. У сваку микротубу издвајано је најмање по 10 ларви или ако је број утврђених ларви био мањи од 10, све утврђене ларве. Тако припремљене ларве, чуване су на температури +4°C до извођења PCR методе са циљем идентификације врсте рода *Trichinella*.

4.2. Методе рада

4.2.1. Директна метода - Метода вештачке дигестије са магнетном мешалицом

Метод вештачке дигестије је директна дијагностичка метода за утврђивање присуства ларви трихинела у мишићном ткиву помоћу ензимске дигестије са

циљем ослобађања ларви из мишићног ткива, седиментације и филтрације, а затим микроскопским прегледом идентификације добијених ларви.

Заснива се на ослобађању ларви из мишићног ткива након дигестије, односно деловања раствора пепсина и хлороводоничне киселине у одређеном временском периоду и под одређеним температурним режимом.

У циљу постизања тражене осетљивости теста, мишићно ткиво које је испитивано је потицало са предилекционих места у односу на животињску врсту која се прегледа. Сва опрема која је коришћена је претходно детаљно опрана и очишћена како би се избегла могућност унакрсне контаминације.

Уситњавање узорка је вршено у електричној сецкалици у трајању од 5 до 10 секунди (не дуже како би се избегло оштећење ларви). Мања количина дигестивне течности (50-100 ml) је додавана са циљем постизања боље хомогенизације узорка и спирања са зидова сецкалице.

За припрему дигестивне течности коришћен је комерцијални пепсин у облику праха (10.000 И.Ј., произвођач Галеника А.Д.). За испитујући узорак мишићног ткива тежине 100 g у 2 литра претходно загрејане воде на 47°C додавано је 16 ml 25% хлороводоничне киселине (коначно разређење је 0,2% како би рН износио 1-2). После постављања на претходно темперирану магнетну плочу на 45°C и додатка магнета за постизање вртлога, додато је 10 g пепсина (крајња концентрација 0,5%). На тај начин се избегла могућност деактивације пепсина у могућем директном контакту са концентрованом киселином.

Сам процес дигестије одвијао се на 45°C \pm 2°C током целог процеса у трајању од 30 минута. У случајевима узорака пореклом од дивљих животиња време је продужавано на 45 \pm 5 минута. Након извршене дигестије, добијена течност је филтрирана кроз сито, које је претходно поквашено, пречника 10 cm, са окцима промера 180 μ m, тако да је омогућен пролаз ларви трихинела и истовремено задржавање несвареног ткива. Даља испитивања су вршена код узорака код којих на сити није - задржано више од 5% испитујућег узорка. Седиментација је вршена у левку по Сквību (примарна седиментација) у трајању од 30 минута. У стаклену кивету је испуштано око 40 ml (секундарна седиментација), након 10 минута се вршило одливање горњих 30 ml. Коначно добијен седимент се преносио у Петри плочу (издељену на квадранте од 1cm²) и

затим је вршен микроскопски преглед коришћењем стерео микроскопа са циљем утврђивања присуства/одсуства ларви трихинела и њиховог разликовања од осталих врста нематода, организама и примеса. Код позитивног налаза, ларве трихинела су бројане три пута (ради израчунавања интензитета инфекције и резултат је изражаван као број ларви по граму). За потребе одређивања врсте ларве су издвајане у у миротубе са додатком 90% етил алкохола и чуване на +4°C до извођења PCR .

4.2.2. Индиректне методе

4.2.2.1. Имуноензимски тест (ELISA тест)

Комерцијални PrioCHECK *Trichinella* Ab ELISA (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Switzerland) тест за *in vitro* утврђивање антитела против *Trichinella* spp. коришћен је за серолошка испитивања 195 узорака крвних серума домаћих свиња, 11 узорака паса лугалица и 17 узорака месног сока пореклом од дивљих свиња. Тест је извођен према упутству произвођача.

Као позитивне и негативне контроле коришћени су референтни материјали који чине саставни део комерцијалног теста.

Карактеристике теста: Микротитрационе плоче су пресвучене екскреторно/секреторним антигеном *Trichinella*, као главним протеинским комплексом, на који се наносе испитујући узорци серума и месног сока са циљем утврђивања присуства/одсуства специфичних антитела за *Trichinella* spp. Анти свињска антитела коњугована пероксидазом, коришћена су за детекцију антитела која су се везала за екскреторно/секреторне антигене. Боја која се развија захваљујући примени ТМБ супстрата (хромогена) омогућава да се мерењем OD вредности на таласној дужини од 450nm утврди присуство/одсуство специфичних антитела за *Trichinella* spp. Сам протокол рада обухвата пет корака: припрема узорака, инкубација нанетих узорака, инкубација коњугата и читавање на ELISA читачу, Labsystems - Multiskan, MCC/340.

$(OD\ 450nm\ узорка / OD\ 450nm\ позитивне\ контроле) \times 100 = X\%$ позитивности

Као cut-off постављена је вредност 15PP, сви узорци са нижим вредностима проглашавани су као негативни. Добијене вредности за контроле су биле следеће:

- Од позитивне контроле = 1.712 (1.882, 1.542)
- Од слабо позитивне контроле = 1.393 (1.477, 1.309)
- Од негативне контроле = 0.052 (0.054, 0.051)

4.2.2.2. Имуноблот (Western blot)

Имуноблот је коришћен као потврдни серолошки тест, који ближе показује које компоненте антигена *Trichinella* реагују са специфичним моноклонским антителима, односно даје могућност препознавања које протеинске компоненте испитиваних антигена садрже специфичне епитопе.

Укупно је WB тестом прегледано 36 узорака крвних серума домаћих свиња. Од тога 32 узорака крвних серума одговарало је свињама у чијим је узорцима мишићног ткива након клања утврђено присуство ларви трихинела, а 4 серума била су пореклом од животиња у чијим узорцима мишићног ткива након клања није утврђено присуство ларви *Trichinella*.

Као позитивна контрола у тестовима је коришћен одговарајући анти-*Trichinella* серо-позитиван контролни серум (стандард ICT) и/или 7C2C5 моноклонска антитела произведена на мишу и специфична за епитоп присутан на 3 гликопротеина (45, 49 и 53 кДа) из групе TSL-1 антигена (епитоп је карактеристичан за мишићне ларве читавог рода *Trichinella* (Gamble and Graham, 1984, Gamble et al., 1983). Као негативна контрола коришћени су серуми добијени од животиња код којих је прегледом вештачке дигестије одговарајућих узорака мишићног ткива добијен негативан резултат.

Western-blot метода је извођена на следећи начин.

Екскреторно-секреторни (E/S) продукти L1 ларви трихинела су раздвојени на своје протеинске компоненте путем SDS-PAGE електрофорезе на градијент гелу (5-20%).

SDS-PAGE електрофореза: коришћени су различити пуфери за прављење горњег-несепаративног дела гела (1,5М ТРИС и 0,4% полиакриламид гел SDS, pH=8,8), доњег-сепаративног гела (0,5М TRIS и 0,4% полиакриламид гел SDS, pH=6,8) и пуфера за пуњење комора апарата за електрофорезу (0,025 М TRIS, 0,1% полиакриламид гел SDS и 0,192М глицин, pH=6,8).

Прављени су гелови дебљине 1,5mm. Доњи-сепаративни део гела је прављен као градијент од 5-20% уз коришћење 117 Miliphore II Gradient Maker-a (LKB, Sweden). У једну комору затвореног система спојених судова сипан је 5% гел (3,75 ml пуфера за доњи гел, 8,67 ml H₂O, 2,513 ml 30% акриламида, 20 µl TEMED за полимеризацију и 40 µl 10% амонијум-персулфата као иницијатора). У другу комору, из које започиње испуштање гела, нанет је 20% гел (3,75 ml пуфера за доњи гел, 1,23 ml H₂O, 10 ml 30% акриламида, 20 µl TEMED и 40 µl 10% амонијум-персулфата). Када се завршило уливање гела између плоча LKB система за вертикалну електрофорезу, гел је био покривен танким слојем воде и остављен 1 сат да полимеризује. После завршене полимеризације, одливена је вода и постављен је тефлонски чешаљ, преко кога је наносен горњи гел (2,5 ml пуфера за горњи гел, 5,92 ml H₂O и 1,58 ml 30% акриламида, 20 µl TEMED и 40 µl 10% амонијум-персулфата). Процес полимеризација одвијао се у трајању од 1 сата. Након уклањања тефлонског чешља остали су канали у које су наносени стандарди и испитивани узорци антигена. Нанешено је 50 µl узорка по каналу гела. Испитивање је рађено у редукујућим условима, тако што су узорци помешани у односу 1:1 са пуфером за узорке (0,151 g TRIS, 2 ml глицерола, 0,4 g SDS, 0,5 ml 2-меркаптоетанола допуњено до 10 ml H₂O) и прокувани 90 секунди непосредно пре самог наношења. Када су узорци нанети у канале на гелу, сваки од канала је допуњен истим пуфером којим се пуне коморе апарата. Електроде су повезане са апаратом који регулише јачину електричног поља (LKB Macrodrive 1 – Power Supply) и тако су обезбеђени услови за рад: 10 V и 35 mA до уласка узорка у доњи гел, затим 150 V и 50 mA у трајању 5-6 сати.

Бојење гела СВВ-ом (Commassie brilliant blue): након завршене електрофорезе гел је потопљен у СВВ раствор (0,25 g СВВ R, 45 ml H₂O и 10 ml сирћетне киселине) у трајању од 3 до 4 сата на собној температури. Затим је вршено два пута испирање у раствору за испирање (350 ml метанола, 100 ml сирћетне киселине допуњено до 1000 ml H₂O). На крају је гел остављен у дестилованој води преко ноћи.

Бојење гела сребром: после завршене електрофорезе гел је потопљен у фиксатив (30% етанол, 10% сирћетна киселина) у трајању од три сата. Процедура се одвија уз благо мешање. Затим је вршено испирање 2 пута по 10 минута у 10%

етанолу и 3 пута по 10 минута у дестилованој води. Бојење је вршено са 0,1% AgNO_3 (45 минута за гел дебљине 1,5mm). Након бојења гел је испиран 10 до 20 секунди текућом водом. Гел је потопљен у развијач (2,5 % Na_2CO_3 , 0,02% формалдехид). Раствор је мењан три пута, тако да је трећи пут гел држан у раствору до жељеног интензитета боје. Прекид реакције је вршен држањем гела у 1 % сирћетној киселини 5 минута.

Електротрансфер: део гела је био обојен ради визуализације протеина раздвојених електроферозом. Са већег дела гела који није бојен, а на коме се налазе раздвојене компоненте антигена вршен је електротрансфер раздвојених протеина на нитроцелулозну мембрану (0,45 μm). Гелови, нитро целулозна мембрана и филтер папири су уравнотежени у пуферу за електротрансфер (blotting buffer TRIS – 0,025M HCl, 0,192 M глицин, 20 % метанол, pH=8,3) у току 30 минута на собној температури. Припремљен је “сендвич“ за електротрансфер, који се одвијао при јачини струје од 0,8mA/cm² гела-током 2 сата, коришћен је апарат LKM Multiphor II. Након завршеног трансфера, мембрана са стандардима (протеини познатих молекулских маса) је бојена у боји Ронсеау S, са циљем визуелизовања бендова. Исечене траке нитроцелулозне мембране, које су одговарале линијама на гелу, инкубиране су у TBS пуферу (50mM ТРИС, 0,15M NaCl, pH 7,6) са 3 % BSA (Bovine serum albumin) у циљу “препокривања“ слободних места. Траке су затим испиране у TBS пуферу три пута. Мембране су потом инкубиране са моноклонским антителима 7C2C5 из асцита (у разблажењу 1:500 у пуферу за испирање) или са испитиваним узоцима серума (разблажење 1:40) у трајању од 72 сата на 4°C. Мембране су три пута испиране, а затим је вршена инкубација коњугатом (овца анти миш IgG-HRPO за откривање реакције са 7C2C5 или протеина-HRPO за откривање IgG из серума свиња и серума паса) у трајању од 2 сата на собној температури. Коњугат је коришћен у разблажењу 1:1000. Везивање моноклонских или специфичних антитела за екскреторно-секреторни антиген *Trichinella* детектовано је таложном реакцијом са 3,3 диаминобензидином (DAB) и водоник пероксидом (0,025г DAB-а је растворено у у 50 ml 0,2M ТРИС-а, pH 7,6, уз мешање 30 минута на собној температури). Непосредно пред употребу раствор DAB-а је филтриран преко филтер папира и додавано је 0,5 1% водоник пероксида. Мембране су потапане у овај раствор,

најчешће у трајању од 10 минута. Након добијања жељеног интезитета трака, мембране су испиране у дестилованој води и осушене.

4.2.3. Идентификација врсте ларви *Trichinella* – применом multiplex PCR методе

Multiplex PCR метода извођена је према модификованом протоколу Европске Референтне Лабораторије у Риму (EURLP) у циљу молекуларне идентификације врсте паразита из рода *Trichinella* присутних на эпизоотиолошком подручју Браничевског и Подунавског округа. Овом методом обрађене су ларве пореклом од 59 животиња код којих је утврђено њихово присуство у узорцима мишићног ткива анализирано методом вештачке дигестије. Као што је то већ горе наведено узорци су потицали од 6 животињских врста и то: 25 домаћих свиња, 7 дивљих свиња, 8 лисица, 8 шакала, 4 вука и 7 паса.

За одређивање врсте рода *Trichinella* коришћена је укупна геномска DNK изолована из ларви трихинела помоћу комерцијано доступног кита - QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Коришћењем специфичних прајмера и PCR Master Mix кита (QIAGEN) умножени су специфични фрагменти добијене DNK у PCR машини, где је DNK подвргнута прецизним, цикличним променама температуре. Реакција се одвијала у 35 поновљених PCR циклуса. Након електрофорезе, умножене специфичне секвенце визуелно су дефинисане на гелу као траке дефинисане дужине.

4.2.3.1 Дефиниције и појмови

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Позитивна контрола за амплификацију – референтна DNK, добијена од Референтне лабораторије, ова контрола се користи за верификацију ефикасности PCR система

Позитивна контрола за DNK екстракцију – референтна ларва која се анализира у току рада на тестираном узорку, како би се верификовала ефикасност DNK екстракције

Референтна ларва – ларва добијена од стране Референтне лабораторије, познате врсте или генотипа *Trichinella*

Референтна DNK – пречишћена DNK добијена од стране Референтне лабораторије, познате врсте или генотипа *Trichinella*

EURLP - Reference Laboratory for Trichinellosis of the World Organization for Animal Health (OIE) - Референтна лабораторија за трихинелозу Светске организације за здравствену заштиту животиња

Узорци за тестирање – једна или више мишићних ларви које потичу из једног домаћина, чуване у етанолу до идентификације.

4.2.3.2. Реагенси и опрема

Реагенси

- QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)
- PCR Master Mix Kit (QIAGEN)
- Маркер: O'RangeRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Боја: 6x loading dye (Fermentas)
- Боја: SYBR Safe DNA gel stain (Promega)
- SetB који садржи пет различитих сета прајмера (Metabion)
- Етанол (95-99%)
- Позитивна контрола - *Trichinella* MSL чуване у етанолу (95-99%), добијене од Референтне лабораторије за паразитологију, где су добијене изолацијом из мишићног ткива мишева поступком вештачке дигестије (Manuel OIE 2008). У замрзнутом стању могу се чувати до 5 година
- Негативна контрола(QIAGEN)
- Референтна DNK – Геном ДНК пречишћен из референтних ларви, добија се из Референтне лабораторије за паразитологију (1ng/μl), где се производи из збирних узорака референтних ларви. У замрзнутом стању може се чувати до 5 година
- Узорак за испитивање (ларва добијена методом вештачке дигестије)
- 1x TBE пуфер
- SERVA Агароза за DNK електрофорезу

Опрема:

- Епрувете од 2 ml

- PCR тубице од 0,2 ml
- Аутоматске пипете од 1-20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Наставци за аутоматске пипете од 1-20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l
- Рукавице за једнократну употребу
- Термоблок са вибрацијом
- Вортекс
- Центрифуга
- PCR апарат
- Апаратура за електрофорезу
- Транслуминатор

4.2.3.3. Процедура за припрему узорка

Узорци су пре испитивања проверавани како би се утврдила очуваност ларви (MSL - muscle stage larvae). Раствор етанола у коме се налазе ларве је изливан у петри плоче и посматран под стерео микроскопом. Максимални број ларви био је 5. По једна ларва је распоређивана у епендорфе запремине 2 ml са конусним дном. Вишак етанола је одстрањиван, тако да остане само минимална количина. Центрифугирање је вршено у трајању од неколико секунди, на максималној брзини, након чега је материјал замрзаван до следећег корака.

4.2.3.4. Изолација геномске DNK из ларви трихинела

Поступак је извођен на собној температури. За сваку нову серију испитивања, референтна ларва је подвргнута процедури изолације геномске DNK и идентификована као „позитивна контрола за екстракцију“.

Пре почетка рада узорци су темперирани на собној температури. Термомиксер је подешен на 56°C/20минута са ротацијом 700 rpm. У припремљену епрувету са ларвом додато је 180 μ l ATL пуфера и 20 μ l протеиназе К. Затим је извршено мешање на вортексу и краткотрајно центрифугирање (неколико секунди на максималној брзини). Инкубација је вршена на 56°C/20 минута у термомиксеру при ротацији од 700 rpm. Након инкубације понављено је краткотрајно центрифугирање. Инкубација је настављена на 70°C/10минута са ротацијом 300 rpm. Након тога је уследило краткотрајно центрифугирање и додавање 200 μ l

етанола (96-100%), мешање на вортексу у трајању од 15 секунди и нови циклус краткотрајног центрифугирања. 500 μ l садржаја из епендорфа је пажљиво (водећи рачуна да се не покваси обод) пребачено у *QIAamp Spin Column* (која се налази већ у епрувети од 2ml). Центрифугирање је извршено на 8000 rpm/1минут. Након тога пребачен је *Spin Column* у нову тубицу (из кита) и одбачен је филтрат. Додато је 500 μ l AW1 пуфера у *Spin Column* (водећи рачуна да се не покваси обод). Поновљено је центрифугирање које је извршено на 8000 rpm/1минут. Пребачен је *Spin Column* у нову тубицу (из кита) и одбачен је филтрат. Додато је 500 μ l AW1 пуфера у *Spin Column* (водећи рачуна да се не покваси обод). Центрифугирање је извршено на 13000 rpm/5минута. Садржај *Spin Column* је пребачен у нову тубицу (коришћена је тубица којој је исечен поклопац) и одбачен је филтрат. Понавља се центрифугирање на 13000 rpm/3минута. Пребачен је *Spin Column* у нову тубицу и одбачен је филтрат. Затим је додато 50 μ l H₂O и вршена инкубација на собној температури 5 минута. Након тога је извршено центрифугирање на 8000 rpm/1минут и још једном је додато 50 μ l H₂O и инкубирано на собној температури 5 минута. Центрифугирање је извршено на 8000 rpm/1минут. Одбачена је колоница са филтером. Епендорф са изолованом геномском DNK је обележен и стављен у замрзивач на -20°C.

4.2.3.5. Multiplex PCR у молекуларној идентификацији врсте паразита из рода *Trichinella*

У овом испитивању коришћена је реакциона смеша (60 μ l) која је садржала:

- 15 μ l 2x PCR MasterMix
- 14 μ l изоловане DNK
- 1 μ l SetB

4.2.3.6. Гел електрофореза

Калуп за наливање гела је састављен и постављен чешаљ на одговарајуће место. У ерленмајер је пренето 50 ml 1xTBE пуфера. Затим је додат 1 g агарозе и мућкањем омогућена дисперзија агарозе у пуферу. Загревање раствора агарозе је вршено у микроталасној рерни, док се у раствору нису појавили мехурићи. Након завршеног загревања садржај у ерленмајер боци је лагано промућкан. Раствор је

остављен да се охлади неколико минута и затим је додато 5 μ l боје (SYBR Safe). Тако припремљен раствор је сипан у калуп и остављен на собној температури 30 минута.

Гел је затим заједно са пластичним носачем, стављен у кадицу за електрофорезу, доливен је 1xTBE тако да је прекривен гел 3-5 mm и пажљиво извађен чешаљ из гела. Претходно помешано 20 μ l DNK са бојом (6x loading dye) је наливено на припремљене узорке у канал гела. Електроде система су затим спојене са трансформатором и процес електрофорезаје вршен при напону од 110V у трајању од 45 минута. Визуелизација раздвојених DNK фрагмената вршена је посматрањем на транслуминатору.

4.2.3.7. Тумачење резултата

Тестирано је пет ларви за сваки узорак. Идентификација изолата се сматрала валидном ако је најмање једна ларва идентификована. У случајевима невалидних резултата, тестирано је нових 5 ларви. Уколико није било доступних ларви узорак је елиминисан. У случајевима инфекције домаћина са мање од 5 ларви, ако се тест класификује као валидан а узорци покажу непознате линије, идентификација се дефинисала као „немогућа“.

Величина амплификационих бендова (дужина PCR фрагмента) визуелизованих у електрофорези је оцењиван на основу поређења са референтном молекуларном тежином од L50. Ова визуелна процена се сматра довољном и одговарајућом, пошто је разлика у врстама на макроскопском нивоу (Табела 4).

Тест је сматран успешним уколико је:

а) амплификација позитивне контроле показивала амплификационе продукте из табеле 4;

б) амплификација негативне контроле није показивала било какве амплификационе продукте или евентуално, само бендове везано за неискоришћене олигонуклеотиде и/или прајмере;

ц) позитивна контрола екстракционог продукта показивала амплификацију продукта из табеле 4.

Врсте трихинела су идентификоване на основу дужине PCR фрагмента на гелу и то:

- ако је дужина PCR фрагмента 173 bp, идентификована ларва припада врсти *T. spiralis*;
- ако је дужина PCR фрагмента 127 bp, идентификована ларва припада врсти *T. nativa*;
- ако је дужина PCR фрагмента 127 bp и 253 bp, идентификована ларва припада врсти *T. britovi*;
- ако је дужина PCR фрагмента 310 и 350 bp, идентификована ларва припада врсти *T. pseudospiralis* ;
- ако је дужина PCR фрагмента 127 bp и 316 bp, идентификована ларва припада врсти *T. murrelli*;
- ако је дужина PCR фрагмента 127 bp и 210 bp, идентификована ларва припада врсти *Trichinella* T6;
- ако је дужина PCR фрагмента 155 bp и 404 bp, идентификована ларва припада врсти *T. nelsoni*;
- ако је дужина PCR фрагмента 240 bp, идентификована ларва припада врсти *T. parvae*;
- ако је дужина PCR фрагмента 264 bp, идентификована ларва припада врсти *T. zimbabwensis*.

4.2.4. Географско позиционирање

За географско позиционирање утврђених случајева трихинелозе код домаћих и дивљих животиња на територији епизоотиолошког подручја Браничевског и Подунавског округа, као и присутних врста трихинела коришћен је Softwer GARMIN MapSource (Garmin, Taiwan).

Дефинисани су подаци о географским координатама (дужина/ширина) локација на којима је утврђено присуство врста трихинела, тачке од интереса као што су: индустријске фарме, ловишта, кланице, депоније, као потенцијални извори инфекције за пријемчиве врсте животиња.

Прикупљање података је вршено на основу препоруке Референтне лабораторије за паразитологију ЕУ (EURLP) (Pozio and Rossi, 2008). Дефинисани су следећи подаци за добијене резултате:

- а) назив домаћина (уобичајен и научни);

- б) старост домаћина и пол;
- в) место порекла (насеље, општина, округ);
- г) географске координате (географска дужина и ширина);
- д) датум узимања узорка;
- ђ) врста испитиваног мишићног ткива.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Налаз ларви *Trichinella* spp. методом вештачке дигестије

5.1.1. Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од домаћих свиња

На основу прикупљених података на месечном нивоу, из кланица, ветеринарских станица и ветеринарских амбуланти на територији Браничевског и Подунавског округа у току 2010. године извршен је преглед на присуство ларви трихинела код укупно 192.707 узорака меса закланих домаћих свиња. Присуство ларви трихинела утврђено је у 136 узорака (0,07%). Од тога је на кланицама од 116.966 закланих свиња присуство ларви утврђено код 13 узорака (0,01%), док је на газдинствима код 75.741 домаћих свиња после клања утврђен позитиван налаз код 123 (0,16%).

Табела 8 – Резултати прегледа узорака мишићног ткива домаћих свиња закланих у кланицама и газдинствима

Место прегледа	Укупно прегледано	Позитивно	%
Кланице	116.966	13	0,01
Газдинства	75.741	123	0,16
Укупно	192.707	136	0,07

Статистичком анализом установљена t вредност ($t=-10,118$) представља статистички врло значајну разлику ($p<0,01$) у проценту појављивања позитивних свиња на кланицама и код свиња закланих на газдинствима.

Код укупно испитаних 211 узорака мишићног ткива методом вештачке дигестије пореклом од домаћих свиња које су потицале са 61 индивидуалних газдинстава у којима је већ утврђен позитиван налаз у току 2010. године и 150 узорака мишићног ткива пореклом од товљеника са индустријских фарми утврђен је следећи резултат:

У 25 (11,85%) узорака је утврђено присуство ларви трихинела, док код 186 (88,15%) испитаних узорака није утврђено присуство ларви трихинела, односно од укупног броја узорака који су потицали са индивидуалних домаћинстава у 40,98% је утврђено присуство ларви трихинела, док је на фармама тај проценат био 0%.

Ниво инфекције код заражених јединки је дефинисан на основу броја утврђених ларви по граму (LPG), који је добијен после три поновљена бројања ларви у испитиваном узорку. Вредност LPG се кретала од 0,03 до 20 (Табела 8).

Табела 9 - LPG (број ларви по граму испитиваних узорака) код домаћих свиња (*Sus scrofa domestica*) са индивидуалних газдинстава на територији Браничевског и Подунавског округа

Редни број узорка	Насеље/Општина	Количина испитиваног узорка (грами)	Утврђена врста <i>Trichinella</i>	LPG
1.	Пожаревац/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	0,25
2.	Пожаревац/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	0,56
3.	Пожаревац/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	0,92
4.	Пољана/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	0,12
5.	Касидол/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	3
6.	Кличевац/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	0,31
7.	Берање/Пожаревац	100	<i>T. spiralis</i>	20
8.	Раброво/Кучево	100	<i>T. spiralis</i>	0,15
9.	Мустапић/Кучево	100	<i>T. spiralis</i>	0,15
10.	В. Бресница/Кучево	100	<i>T. spiralis</i>	1,19
11.	Кусиће/М.Црниће	100	<i>T. spiralis</i>	0,31
12.	Царевац/В.Градиште	100	<i>T. spiralis</i>	0,06
13.	Пожежено/В.Градиште	100	<i>T. spiralis</i>	0,26
14.	Сираково/В.Градиште	100	<i>T. spiralis</i>	1,19
15.	Средњево/В.Градиште	100	<i>T. spiralis</i>	7,2
16.	Рам/В.Градиште	100	<i>T. spiralis</i>	0,31
17.	Крављи До/М.Црниће	100	<i>T. spiralis</i>	0,24
18.	Барич/Голубац	100	<i>T. spiralis</i>	0,12
19.	Сладинац/Голубац	100	<i>T. spiralis</i>	0,03
20.	Смољинац/М.Црниће	100	<i>T. spiralis</i>	0,04
21.	Александровац/Жабари	100	<i>T. spiralis</i>	0,08
22.	Ореовица/Жабари	100	<i>T. spiralis</i>	1,19
23.	Петријево/Смедерево	100	<i>T. spiralis</i>	0,23
24.	Д. Ливадица/В.Плана	100	<i>T. spiralis</i>	0,09
25.	С. Паланка/ С. Паланка	100	<i>T. spiralis</i>	0,06

Број утврђених ларви по граму (LPG) био је најнижи код испитиваног узорка мишићног ткива пореклом од домаће свиње из насеља Сладинац, општина Голубац, Браничевски округ и износио је 0,03. Највећи број ларви LPG = 20, утврђен је у узорку пореклом од домаће свиње из насеља Берање, општина Пожаревац, Браничевски округ (Табела 9).

5.1.2 Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од дивљих животиње

У популацији дивљих животиња методом вештачке дигестије присуство ларви трихинела утврђено је у 27 (7,99%) од 338 испитаних узорака (Табела 10).

Присуство ларви трихинела у популацији дивљих свиња, утврђено је у 7 (4,02%) узорака од 174 испитаних. Од 118 узорака пореклом од лисица у 8 (6,78%) је утврђено присуство ларви трихинела. У популацији шакала испитано је 42 узорака и у 8 (19,05%) је утврђено присуство ларви трихинела. У сва четири (100%) испитана узорка из популације вукова утврђено је присуство ларви трихинела.

Табела 10 - Резултати прегледа узорака мишићног ткива пореклом од дивљих животиња методом вештачке дигестије

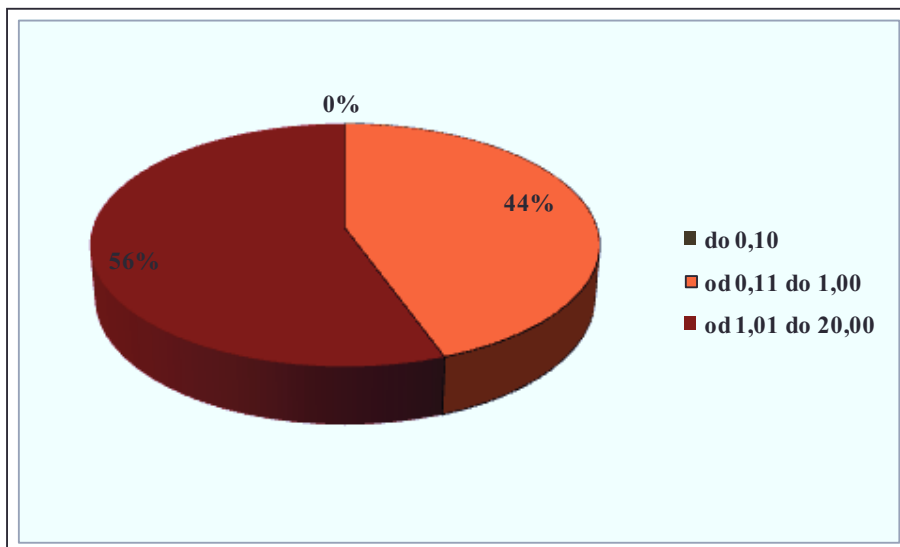
Врста животиња	Број прегледаних узорака	Утврђено присуство ларви <i>Trichinella</i> (%)
Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	174	7 (5,93%)
Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	118	8 (6,78%)
Шакал (<i>Canis aureus</i>)	42	8 (19,05%)
Вук (<i>Canis lupus</i>)	4	4 (100%)
Укупно:	338	27 (7,99%)

Применом PCR методе идентификоване су врсте *Trichinella* присутне код испитиване дивљачи у Браничевском округу. Добијени резултати су приказани у Табели 11.

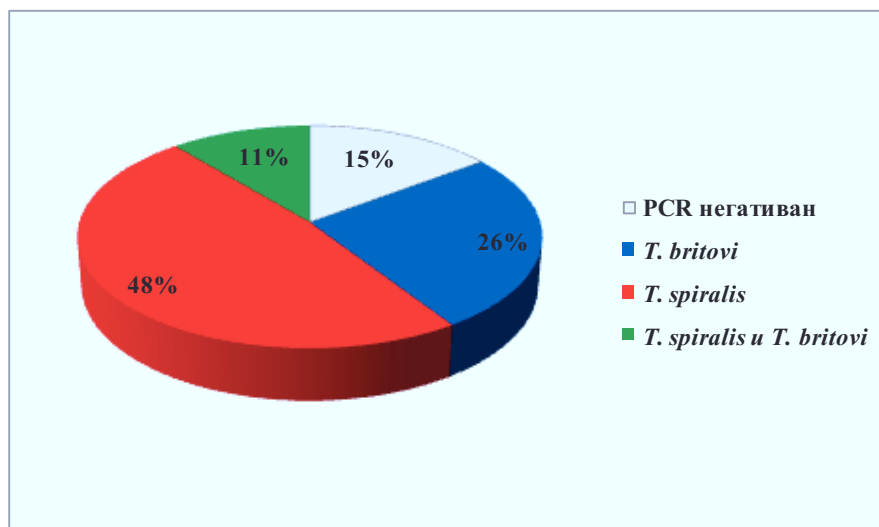
Табела 11 - Број ларви по граму испитиваних узорака (LPG) и врсте трихинела код испитиваних дивљих животиња са територији Браничевског и Подунавског округа

Ред бр.	Насеље	Врста животиње	Утврђена врста трихинела	Количина узорка (грами)	LPG
1.	Храстовача, Пожаревац	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. britovi</i>	50	0,11
2.	Средњево, В. Градиште	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,36
3.	Средњево, В. Градиште	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,38
4.	Храстовача, Пожаревац	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,12
5.	Браничево, Голубац	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	50	3,2
6.	Речица, Пожаревац	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	50	0,4
7.	Табановац, Петровац	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	50	0,68
8.	Браничево, Голубац	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	8,12
9.	Браничево, Голубац	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	2,2
10.	Средњево, В. Градиште	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	7,2
11.	Велико Градиште	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,2
12.	Средњево, В. Градиште	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,36
13.	Северни Кучај, Кучево	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. britovi</i>	50	2,4
14.	Пескови, В. Градиште	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	50	3
15.	Крављи До, Мало Црниће	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	50	7,2
16.	Браничево, Голубац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,67
17.	Бистрица, Петровац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	3,23
18.	Дубочка, Петровац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	5,08
19.	Затоње, В. Градиште	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	0,6
20.	Браничево, Голубац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	50	3,2
21.	Пругово, Пожаревац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. britovi</i>	50	19,45
22.	Кнежица, Петровац	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	50	0,97
23.	Царевац, В. Градиште	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	PCR негат.	50	3,1
24.	Церемошња, Кучево	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	50	4,2
25.	Жагубица	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	50	14,2
26.	Жагубица	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	50	0,52
27.	Жагубица	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	50	2,8

Број утврђених ларви по граму (LPG) кретао се за *T. spiralis* од 0,12 до 8,12, док се за *T. britovi* кретао од 0,11 до 19,45. У случајевима мешовите инфекције истог домаћина са *T. spiralis* и *T. britovi* број ларви по граму износио је 0,97 до 7,2.



Слика 3 – Број утврђених ларви по граму у испитаним узорцима (LPG) мишићног ткива



Слика 4 – Резултати PCR теста утврђених врста ларви рода *Trichinella*

5.1.3. Вештачка дигестија узорака мишићног ткива пореклом од паса

Укупно је 7 (23,33%) паса било позитивно од 30 прегледаних паса са територије Браничевског и Подунавског округа. Сви пси у чијем је мишићном ткиву утврђено присуство ларви трихинела су били невластички пси са територије општине Пожаревац. У популацији паса луталица утврђено је присуство врсте *T. spiralis*. Број утврђених ларви по граму (LPG) кретао се од 0,04 до 3,2.

Табела 12 - Број ларви по граму испитиваних узорака (LPG) и врсте трихинела код испитиваних паса

Редни бр.	Насеље	Врста <i>Trichinella</i>	Количина узорка (грами)	LPG
1.	Забела, Пожаревац	<i>T. spiralis</i>	50	3,2
2.	Пожаревац	<i>T. spiralis</i>	50	0,16
3.	Забела Пожаревац	<i>T. spiralis</i>	50	4
4.	Пожаревац	<i>T. spiralis</i>	50	0,04
5.	Пожаревац	<i>T. spiralis</i>	50	0,12
6.	Забела, Пожаревац	PCR негат.	50	0,12
7.	Пожаревац	PCR негат.	50	0,48

У односу на све испитиване узорке и добијене резултате, може се закључити да је најнижи ниво инфекције утврђен у популацији домаћих свиња (0,03). Највећи број ларви по граму прегледаног узорка утврђен је у узорку мишићног ткива домаће свиње, које је било намењено за сушење и употребу као производ од меса (сушено месо) са територије општине Пожаревац (LPG=20). Код домаћих свиња установљено је присуство само *T. spiralis*.

У популацији дивљих животиња степен инфекције се кретао од 0,11 код дивље свиње са територије општине Пожаревац и утврђеном врсто *T. spiralis* до највећег LPG=19,45 код шакала са идентификованом *T. britovi*. Код паса луталица са територије општине Пожаревац утврђена је инфекција са врстом *T. spiralis* и степен инфекције се кретао од 0,04 до 4.

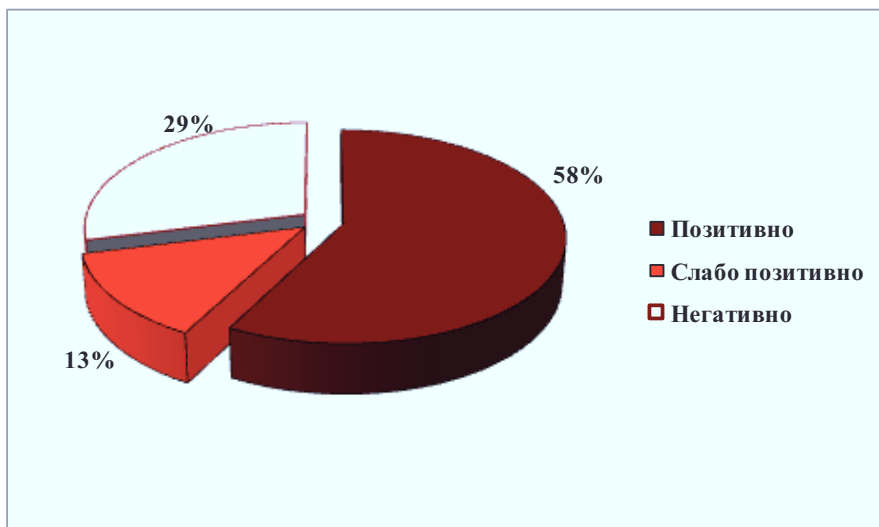
5.2. Имуноензимски тест (ELISA тест)

5.2.1. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима крвних серума домаћих свиња

У свим узорцима крвних серума пореклом од свиња са фарми (150) није утврђено присуство специфичних антитела против врста трихинела. Серолошки негативан тест је потврђен након клања свиња на кланици и прегледа узорака мишићног ткива вештачком дигестијом.

Укупно је 26 (12,68%) узорака крвних серума свиња пореклом са индивидуалних домаћинстава реаговало позитивно, 6 (2,93%) слабо позитивно и 13 (6,34%) негативно. Након клања животиња и прегледа узорака меса методом вештачке дигестије позитиван серолошки налаз потврђен је код свих животиња. Од укупно 13 негативних узорака, код 9 је потврђен негативан налаз, док је код 4 серолошки негативних свиња утврђено присуство ларви трихинела, што значи да је 1,95% узорака показало лажно негативан резултат. Разлог појаве лажно негативних резултата је највероватније последица момента инфекције и тренутка прегледа, односно стварања специфичних антитела и њихова појава у циркулацији заражене животиње.

Овакав налаз иде у прилог чињеници да је ELISA тест метода која се препоручује као тријажни тест, а не као крајња, потврдна дијагностичка метода.



Слика 5 – Резултати ELISA теста узорака крвних серума домаћих свиња

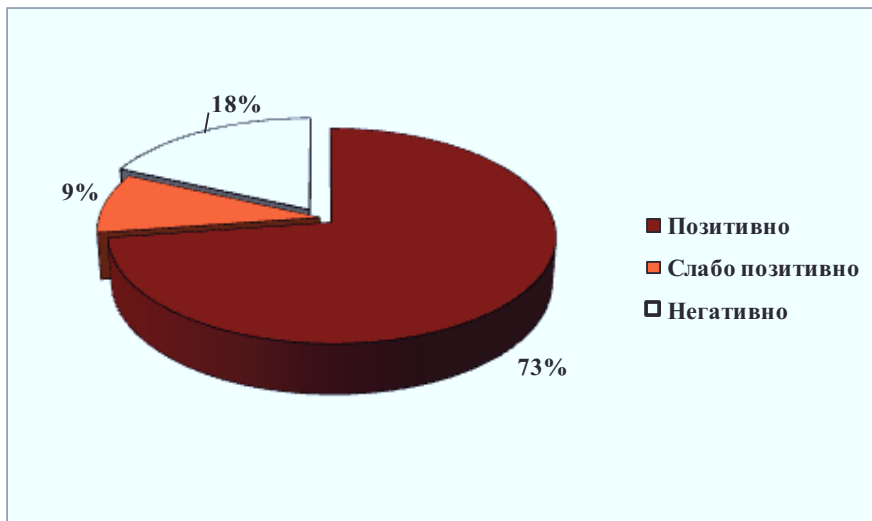
Табела 13 - Резултати испитивања крвних серума домаћих свиња ELISA тестом

Редни број	OD вредности ELISA теста	Резултат ELISA теста	LPG	Редни број	OD вредности ELISA теста	Резултат ELISA теста	LPG
1.	0,865	Позитиван	0,31	24.	1,185	Позитиван	0,01
2.	0,842	Позитиван	3	25.	0,927	Позитиван	0,09
3.	0,688	Позитиван	4,2	26.	0,667	Позитиван	1
4.	0,895	Позитиван	0,09	27.	0,387	Сл. позит.	0,04
5.	0883	Позитиван	2	28.	0,372	Сл. позит.	0,01
6.	1,119	Позитиван	5,2	29.	0,414	Сл. позит.	0,01
7.	0,525	Позитиван	0,1	30.	0,372	Сл. позит.	0,01
8.	0,557	Позитиван	0,01	31.	0,404	Сл. позит.	0,02
9.	0,67	Позитиван	0,06	32.	0,35	Сл. позит.	0,03
10.	1,647	Позитиван	0,12	33.	0,042	Негативан	0
11.	0,929	Позитиван	0,04	34.	0,034	Негативан	0
12.	0,969	Позитиван	0,07	35.	0,037	Негативан	0
13.	1,015	Позитиван	0,63	36.	0,081	Негативан	0
14.	0,710	Позитиван	5,2	37.	0,044	Негативан	0
15.	0,509	Позитиван	0,3	38.	0,085	Негативан	0
16.	0,728	Позитиван	0,04	39.	0,039	Негативан	0
17.	0,964	Позитиван	0,06	40.	0,037	Негативан	0
18.	0,908	Позитиван	6	41.	0,087	Негативан	0
19.	0,78	Позитиван	0,02	42.	0,037	Негативан	0,09
20.	0,993	Позитиван	7	43.	0,081	Негативан	0,06
21.	1,399	Позитиван	0,94	44.	0,085	Негативан	0,04
22.	0,833	Позитиван	0,06	45.	0,039	Негативан	0,06
23.	1,095	Позитиван	5,4				

5.2.2. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима крвних серума паса

Од укупно 11 прегледаних узорака крви паса луталица који су потицали са територије општине Пожаревац, у непосредној близини градске депоније 8 је реаговало позитивно, 1 узорак слабо позитивно и 2 узорка су реаговала негативно. Узорци крвних серума паса потицали су од животиња смештених у прихватилишту за псе и мачке, а који су ухваћени у непосредној близини градских депонија. Код 7 паса је било могуће извршити и испитивање мишићног ткива методом вештачке дигестије јер су угинули и налаз специфичних антитела

је потврђен методом вештачке дигестије тј. утврђено је присуство ларви трихинела у узорцима мишићног ткива *post mortem* (Табела 14).



Слика 6 – Резултати ELISA теста испитаних узорака крвних серума паса

Табела 14 - Резултати испитивања крвних серума паса ELISA тестом

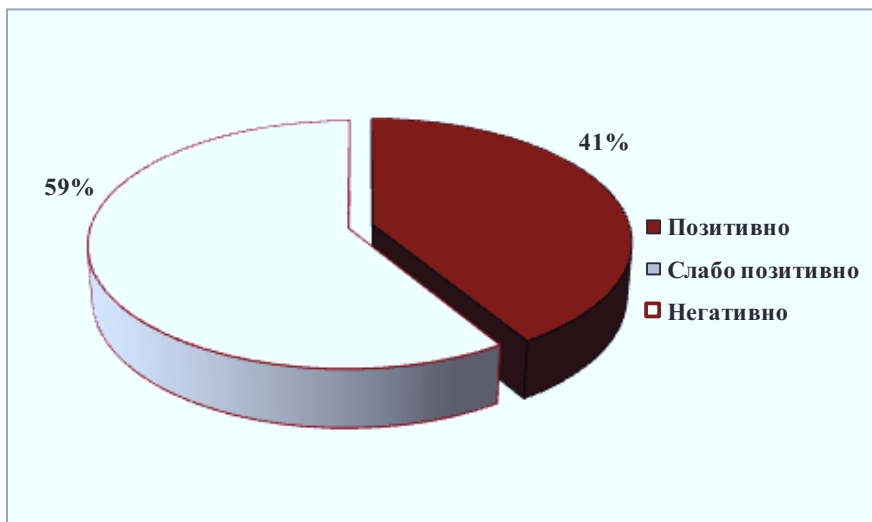
Редни број	Резултат ELISA теста	Могућа потврда методом вештачке дигестије на узорцима мишићног ткива након угинућа
1.	Негативан	-
2.	Негативан	-
3.	Сл. позитиван	-
4.	Позитиван	-
5.	Позитиван	<i>T. spiralis</i>
6.	Позитиван	PCR негат.
7.	Позитиван	<i>T. spiralis</i>
8.	Позитиван	<i>T. spiralis</i>
9.	Позитиван	PCR негат.
10.	Позитиван	<i>T. spiralis</i>
11.	Позитиван	<i>T. spiralis</i>

5.2.3. Имуноензимски тест (ELISA тест) на узорцима месног сока дивљих животиња

У популацији дивљачи ELISA тест је примењен код 17 узорака.

Добијени резултати су следећи: у 7 узорака месног сока утврђено је присуство специфичних антитела против *Trichinella*, док у 10 узорака није утврђено присуство специфичних антитела против *Trichinella*. Резултати серолошких испитивања су били

подударни са резултатима вештачке дигестије, тј. дигестија је потврдила присуство инфекције код 7 животиња позитивних ELISA тестом (Табела 15).



Слика 7 – Резултати ELISA теста испитаних узорака месног сока дивљих животиња

Табела 15 - Резултати испитивања дивљих свиња ELISA тестом

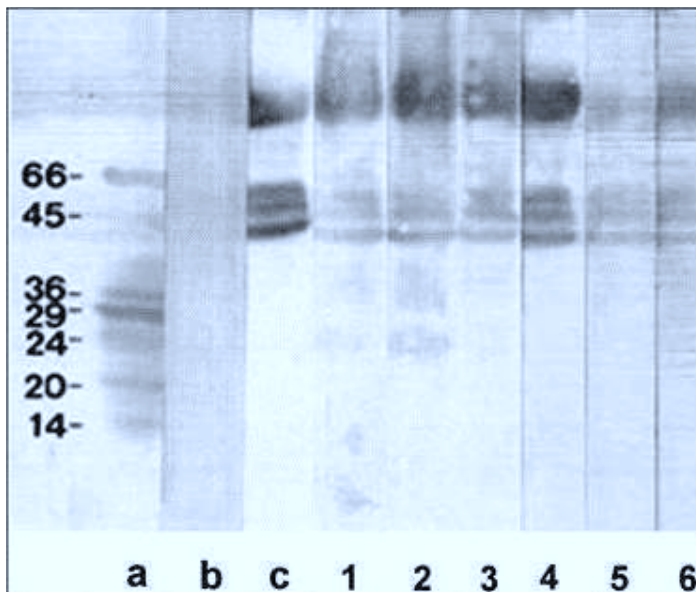
Редни бр.	ОД вредности ELISA теста	Резултат ELISA теста	LPG
1.	1,567	Позитиван	0,11
2.	0,875	Позитиван	0,36
3.	0,609	Позитиван	0,38
4.	1,668	Позитиван	0,12
5.	0,788	Позитиван	3,2
6.	1,014	Позитиван	0,4
7.	1,025	Позитиван	0,68
8.	0,081	Негативан	0
9.	0,037	Негативан	0
10.	0,031	Негативан	0
11.	0,044	Негативан	0
12.	0,046	Негативан	0
13.	0,075	Негативан	0
14.	0,041	Негативан	0
15.	0,083	Негативан	0
16.	0,031	Негативан	0
17.	0,046	Негативан	0

5.3. Имуноблот (*Western blot*)

Имуноблот методом је испитано 36 узорака крвних серума домаћих свиња. Сви узорци који су показали позитиван и слабо позитиван резултат у ELISA тесту били су позитивни на Western blot тесту. Четири узорка (у којима није утврђено присуство специфичних антитела у ELISA тесту) показала су негативан резултат и у Western blot тесту (Табела 16). Добијени резултати Western blot тестом били су подударни и са резултатима испитивања вештачке дигестије узорака мишићног ткива пореклом од истих животиња. Добијени резултати потврђују литературне податке о Western blot тесту, као потврдном серолошком тесту.

Табела 16 - Резултати испитивања крвних серума домаћих свиња Western blot тестом

Ред. бр.	OD вредн. ELISA теста	Резултат ELISA теста	LPG	Резултати Western blot теста	Ред. бр.	OD вредн. ELISA теста	Резултат ELISA теста	LPG	Резултати Western blot теста
1.	0,865	Позит.	0,31	Позит.	19.	0,78	Позит.	0,02	Позит.
2.	0,842	Позит.	3	Позит.	20.	0,993	Позит.	7	Позит.
3.	0,688	Позит.	4,2	Позит.	21.	1,399	Позит.	0,94	Позит.
4.	0,895	Позит.	0,09	Позит.	22.	0,833	Позит.	0,06	Позит.
5.	0,883	Позит.	2	Позит.	23.	1,095	Позит.	5,4	Позит.
6.	1,119	Позит.	5,2	Позит.	24.	1,185	Позит.	0,01	Позит.
7.	0,525	Позит.	0,1	Позит.	25.	0,927	Позит.	0,09	Позит.
8.	0,557	Позит.	0,01	Позит.	26.	0,667	Позит.	1	Позит.
9.	0,67	Позит.	0,06	Позит.	27.	0,387	Сл. позит.	0,04	Позит.
10.	1,647	Позит.	0,12	Позит.	28.	0,372	Сл. позит.	0,01	Позит.
11.	0,929	Позит.	0,04	Позит.	29.	0,414	Сл. позит.	0,01	Позит.
12.	0,969	Позит.	0,07	Позит.	30.	0,372	Сл. позит.	0,01	Позит.
13.	1,015	Позит.	0,63	Позит.	31.	0,404	Сл. позит.	0,02	Позит.
14.	0,710	Позит.	5,2	Позит.	32.	0,35	Сл. позит.	0,03	Позит.
15.	0,509	Позит.	0,3	Позит.	33.	0,042	Негат.	0	Негат.
16.	0,728	Позит.	0,04	Позит.	34.	0,034	Негат.	0	Негат.
17.	0,964	Позит.	0,06	Позит.	35.	0,037	Негат.	0	Негат.
18.	0,908	Позит.	6	Позит.	36.	0,081	Негат.	0	Негат.



Слика 8 – Резултати Western blot теста са карактеристичним тракама (45, 49 и 53 kDa)

Узорци су сложени са лево на десно.

Трака а - стандарди молекулских тежина, трака б – негативне контролне серума пореклом од свиња, трака с - 7C2C5 mAb (молекулских маса 45, 49 и 53 kDa).

Траке од 1 до 6 – узорци пореклом од позитивних свиња.

5.4. Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR)

У циљу идентификације врста трихинела присутних на епизоотиолошком подручју Браничевског и Подунавског округа извршено је PCR испитивање ларви пореклом од 59 животиња код којих је утврђено присуство ларви у узорцима мишићног ткива методом вештачке дигестије. У популацији домаћих свиња издвојени су узорци за које су постојали тачни подаци о пореклу (старост животиње, пол, насељено место, географске координате).

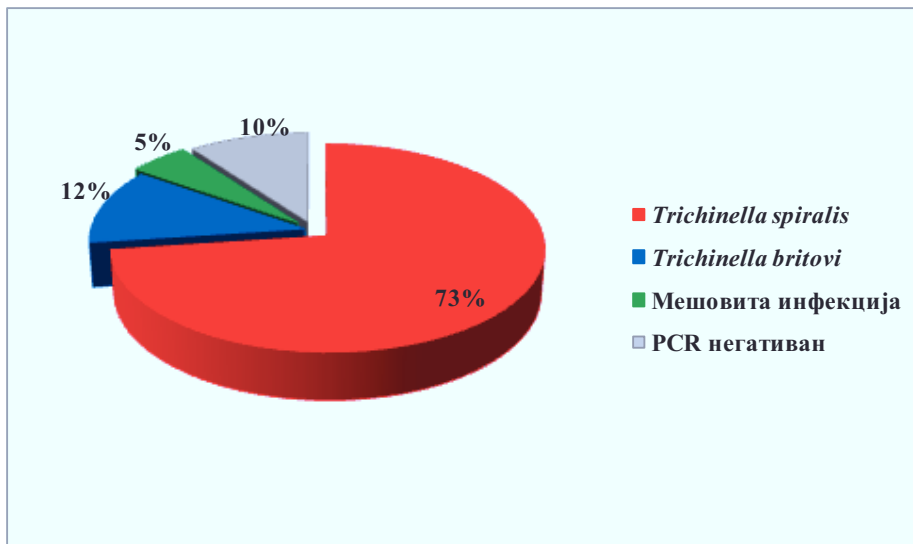
Узорци су потицали од 6 животињских врста и то: 25 домаћих свиња, 7 дивљих свиња, 8 лисица, 8 шакала, 4 вука и 7 паса.

Резултати су добијени за 53 узорка, док код укупно 6 узорка идентификација није успела (10,2%) и тест PCR је проглашаван негативан (резултати су приказани на Табели број 8 и 10).

Trichinella spiralis је идентификована у 43 узорка (72,9%).

Trichinella britovi је идентификована у 7 узорака (11,8%).

Присуство обе врсте *T. spiralis* и *T. britovi* утврђено код 3 узорка (5,1%).



Слика 9 - Утврђене врсте рода *Trichinella* на територији Браничевског и Подунавског округа

Trichinella spiralis је утврђена код 25 домаћих свиња, 5 паса, 5 лисица, 5 шакала и 3 дивље свиње.

Trichinella britovi је утврђена само код дивљих животиња и то 1 дивље свиње, 1 шакала, 1 лисице и 4 вука.

Присуство мешовите инфекције (*T. spiralis* и *T. britovi*) у узорку пореклом од једног домаћина утврђено је код 2 лисице и 1 шакала (Табела 11).

У популацији дивљих свиња, лисица и шакала извршена је идентификација свих врста *Trichinella* на територији Браничевског и Подунавског округа (Табела 11).

У популацији домаћих свиња утврђено је присуство само *T. spiralis*, као и код свих испитиваних паса луталица (Табела 9 и Табела 12).

Табела 17 - Идентификоване врсте рода *Trichinella* у популацији шест врста животиња са територије Браничевског и Подунавског округа

Врста <i>Trichinella</i>	Врста животиња (број идентификованих врста рода <i>Trichinella</i>)					
	домаћа свиња (<i>Sus scrofa domestica</i>)	дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	шакал (<i>Canis aureus</i>)	вук (<i>Canis lupus</i>)	Пас (<i>Canis lupus familiaris</i>)
<i>Trichinella spiralis</i>	25	3	5	5	0	5
<i>Trichinella britovi</i>	0	1	1	1	4	0
Мешовита инфекција (<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>)	0	0	2	1	0	0

5.5. Географска распрострањеност

На територији Браничевског и Подунавског округа постоји 11 општина, односно 256 насеља.

Популација домаћих свиња се налази на индивидуалним газдинствима и организованој фармској производњи. Одређене су географске координате за тачке од интереса. Укупно је 5 великих фарми свиња, смештених у пет општина: Пожаревац, Петровац, Кучево, Велико Градиште и Велика Плана са високим нивоом биосигурносних мера (Табела 18 и Слика 10).

Табела 18 - Фарме свиња на територији Браничевског и Подунавског округа



Ред. бр.	Географске координате	Фарме свиња
1.	N44 24.298 E21 06.753	Ф.С. Трновче, Велика Плана
2.	N44 45.671 E21 31.855	Ф.С. Рамски Рит, Велико Градиште
3.	N44 33.426 E21 33.807	Ф.С. Мустапић, Кучево
4.	N44 23.412 E21 24.470	Ф.С. Петровац, Петровац
5.	N44 38.077 E21 10.073	Ф.С. Забела, Пожаревац



Слика 10 - Географска локација фарми свиња на територији Браничевског и Подунавског округа 🏠

Присуство инфекције трихинелом утврђено је током овог истраживања у свим општинама на територији Браничевског и Подунавског округа.

У односу на географску распрострањеност:

- на територији Подунавског округа утврђено је присуство *T. spiralis*;
- док је на територији Браничевског округа утврђено присуство *T. spiralis* и *T. britovi*.

У популацији домаћих свиња утврђена врста трихинела је идентификована као *T. spiralis* на територији 9 општина (Пожаревац, Кучево, Велико Градиште, Мало Црниће, Голубац, Жабари, Смедерево, Велика Плана и Смедеревска Паланка) што представља 81,82% територијалне површине истраживане територије. Присуство инфекције у популацији домаћих свиња није утврђено на територији општина Петровац и Жагубица (Табела 19 и Слика 11).

Табела 19 - Присуство *T. spiralis* у популацији домаћих свиња

Ред. бр.	Општина	Насеље	LPG	Географске координате
1.	Пожаревац	Пожаревац	025	N 44 11.660 E 021 46.671
2.		Пожаревац	0,56	N 44 11.660 E 021 46.671
3.		Пожаревац	0,92	N 44 11.660 E 021 46.671
4.		Пољана	0,12	N44 32.267 E21 09.798
5.		Касидол	3	N 44 38.158 E 21 19.623
6.		Кличевац	0,31	N44 45.892 E21 17.715
7.		Берање	20	N44 39.282 E21 20.265
8.	Кучево	Раброво	0,15	N44 34.662 E21 31.211
9.		Мустапић	0,15	N44 32.372 E21 32.968
10.		Велика Бресница	1,19	N44 34.555 E21 29.928
11.	Велико Градиште	Кусиће	0,31	N44 43.663E21 31.507
12.		Царевац	0,06	N44 40.680 E21 29.628
13.		Пожежено	0,26	N44 45.604 E21 33.646
14.		Сираково	1,19	N44 40.645E21 20.683
15.		Средњево	7,2	N44 39.351 E21 29.571
16.		Рам	0,31	N44 48.726 E21 19.914
17.	Мало Црниће	Крављи До	0,24	N 44 33.190 E 21 14.167
18.		Смољинац	0,04	N44 36.717 E21 20.333
19.	Голубац	Барич	0,12	N44 39.044 E21 33.284
20.		Сладинац	0,03	N44 38.732 E21 35.751
21.	Жабари	Александровац	0,08	N44 26.675 E21 12.838
22.		Ореовица	1,19	N44 25.095 E21 12.195
23.	Смедерево	Петријево	0,23	N44 37.668 E20 52.413
24.	Велика Плана	Доња Ливадица	0,09	N44 21.024 E21 08.259
25.	Смедервска Паланка	Смедервска Паланка	0,06	N44 22.632 E20 57.812



Слика 11 - Географска распрострањеност врста трихинела у популацији домаћих свиња 🐷

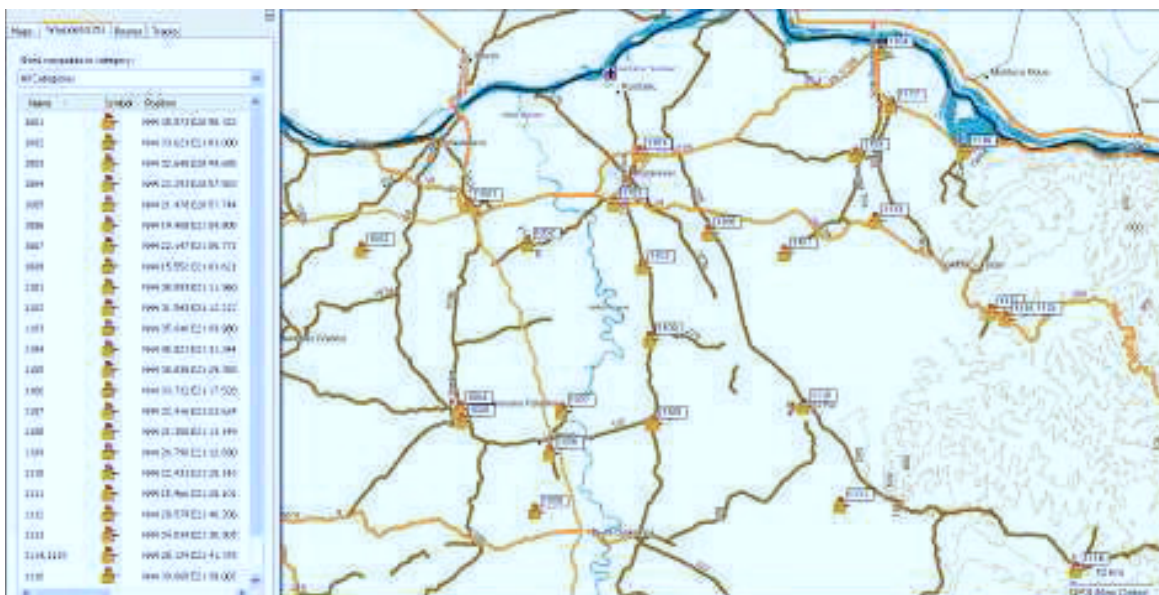
У посматраном периоду популација дивљих животиња на територији свих 11 општина Браничевског и Подунавског округа налази се у 26 ловишта (Табела 20 и слика 12), званично регистрованих у Министарству пољопривреде, шумарства и водопривреде Р. Србије. Присутне врсте су: дивље свиње, лисице, шакали и вукови. Према годишњим плановима и извештајима о раду ловишта запажа се да су природна станишта за дивље свиње на територији Браничевског округа, док лисице и шакали циркулишу на територији оба округа. Вукови се налазе на територији општина Кучево и Жагубица у подножју Хомољских планина (Слика 16).

У популацији дивљих животиња утврђено је присуство две врсте трихинела: *T. spiralis* и *T. britovi*. Инфекција је утврђена на територији општине Пожаревац, Велико Градиште, Кучево, Мало Црниће, Голубац, Петровац, Жагубица у популацији дивљих свиња, лисица шакала и вукова.

Табела 20 – Регистрована ловишта на територији Браничевског и Подунавског округа



Редни број	Географске координате	Идентификациони број ловишта	Назив ловишта
1.	N44 38.893 E21 11.960	1101	Л.У. ВОЈВОДА МИЛЕНКО-ПОЖАРЕВАЦ
2.	N44 31.543 E21 12.212	1102	Л.У. РЕСАВА-ПОЉАНА, ПОЖАРЕВАЦ
3.	N44 35.646 E21 09.980	1103	Ј.П. СРБИЈАШУМЕ ПОЖАРЕВАЦ
4.	N44 45.521 E21 31.344	1104	Л.У.ГОЛУБ-В. ГРАДИШТЕ
5.	N44 38.838 E21 29.358	1105	Л.У. ФАЗАН СРЕДЊЕВО, В. ГРАДИШТЕ
6.	N44 33.732 E21 17.528	1106	Л.У.МЛАВА-МАЛО ЦРНИЋЕ
7.	N44 32.416 E21 23.624	1107	Л.У. СТИГ-БОЖЕВАЦ, М. ЦРНИЦЕ
8.	N44 21.350 E21 13.149	1108	Л.У. МОРАВА-ЖАБАРИ
9.	N44 26.790 E21 12.830	1109	Л.У. МИРКО-АЛЕКСАНДРОВАЦ, ЖАБАРИ
10.	N44 22.431 E21 25.143	1110	Л.У. ТРЕСТ-ПЕТРОВАЦ
11.	N44 15.966 E21 28.101	1111	Л.У. КРИЛАШ-ШЕТОЊЕ, ЋОВДИН, ПЕТРОВАЦ
12.	N44 28.579 E21 40.206	1112	Л.У. ЈЕЛЕН-КУЧЕВО
13.	N44 34.539 E21 30.907	1113	Л.У. ПЕК-РАБРОВО, КУЧЕВО
14.	N44 28.129 E21 41.378	1114	Ј.П. СРБИЈАШУМЕ КУЧЕВО
15.	N44 28.129 E21 41.378	1115	Ј.П. СРБИЈАШУМЕ КУЧЕВО
16.	N44 39.068 E21 38.007	1116	Л.У. СРЊДАЋ-ГОЛУБАЦ
17.	N44 42.061 E21 32.219	1117	Л.У. ПЕК БРАНИЧЕВО, ГОЛУБАЦ
18.	N44 11.761 E21 46.999	1118	Л.У.Ј. ШЕРБАНОВИЋ-ЖАГУБИЦА
19.	N44 35.573 E20 58.322	1001	Л.У. СМЕДЕРЕВО, РАЉА, СМЕДЕРЕВО
20.	N44 33.023 E21 03.000	1002	Л.У. ПОМОРАВЉЕ, ОСИПАОНИЦА
21.	N44 32.640 E20 49.685	1103	Л.У. СУМАДИЈА,ДРУГОВАЦ,СМЕДЕРЕВО
22.	N44 22.293 E20 57.583	1104	Л.У. ЈАСЕНИЦА, СМЕДЕРЕВСКА ПАЛАНКА
23.	N44 21.478 E20 57.744	1105	Л.У. ЈАСЕНИЦА ЈУГ,СМЕДЕРЕВСКА ПАЛАНКА
24.	N44 19.408 E21 04.805	1106	Л.У. ПОМОРАВЉЕ,ВЕЛИКА ПЛАНА
25.	N44 22.147 E21 05.771	1107	Л.У. ШУМАРИЦЕ,ВЕЛИКО ОРАШЈЕ,В.ПЛАНА
26.	N44 15.552 E21 03.621	1108	Л.У. ВОЖД,-РАКИНАЦ, ВЕЛИКА ПЛАНА




Слика 12 - Географска распрострањеност ловишта на територији Браничевског и Подунавског округа 

У популацији дивљих свиња присуство инфекције трихинелом утврђено је на територији три општине: Пожаревац, Велико Градиште и Голубац (Табела 21 и слика 13).

Табела 21 – Присутне врсте трихинела у популацији дивљих свиња (*Sus scrofa*) на територији Браничевског и Подунавског округа 

Ред. бр.	Општина	Насеље	Географске координате	Врста животиње	Врста трихинела	LPG
1.	Пожаревац	Храстовача	N 44 46.037 E 21 16.811	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. britovi</i>	0,11
2.		Храстовача	N44 46.431 E 21 16.851	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	0,12
3.		Речица	N 44 46.029 E 21 19.260	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	0,4
4.	Велико Градиште	Средњево	N44 39.702 E 21 29.141	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	0,36
5.		Средњево	N 44 40.768 E 20 29.537	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	<i>T. spiralis</i>	0,38
6.	Голубац	Браничево	N 44 42.302 E 21 33.454	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	3,2
7.	Табановац	Петровац	N 44 17.147 E 21 23.531	Дивља свиња (<i>Sus scrofa</i>)	PCR негат.	0,68



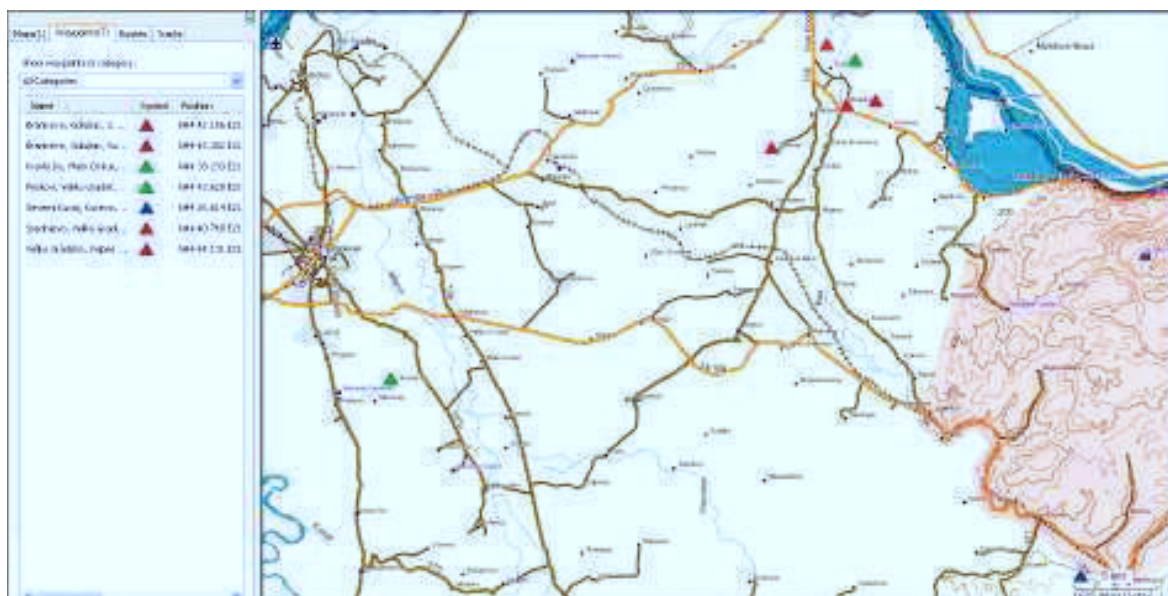
Слика 13 - Географска распрострањеност врста трихинела у популацији дивљих свиња (*Sus scrofa*) на територији Браничевског и Подунавског округа 

У популацији лисица присуство инфекције трихинелом утврђено је на територији четири општине: Велико Градиште, Голубац, Кучево и Мало Црниће (Табела 22 и слика 14).

Табела 22 – Присутне врсте трихинела у популацији лисица (*Vulpes vulpes*) на територији Браничевског и Подунавског округа

▲ *T. spiralis* ▲ *T. britovi* ▲ мешовита инфекција *T. spiralis* и *T. britovi*

Ред. бр.	Општина	Насеље	Географске координате	Врста животиње	Врста <i>Trichinella</i>	LPG
1.	Велико Градиште	В. Градиште	N 44 44.131 E 21 31.498	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	0.2
2.		Пескови	N 44 43.628 E 21 32.625	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	3
3.		Средњево	N 44 40.768 E 20 29.537	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	7.2
4.		Средњево	N44 39.702 E21 29.141	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	0.36
5.	Голубац	Браничево	N 44 42.156 E 21 32.289	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	8.12
6.		Браничево	N 44 42.302 E 21 33.454	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i>	2.2
7.	Кучево	Северни Кучај	N 44 26.814 E 21 41.653	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. britovi</i>	2.4
8.	Мало Црниће	Крављи До	N 44 33.233 E 21 14.045	Лисица (<i>Vulpes vulpes</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	7.2



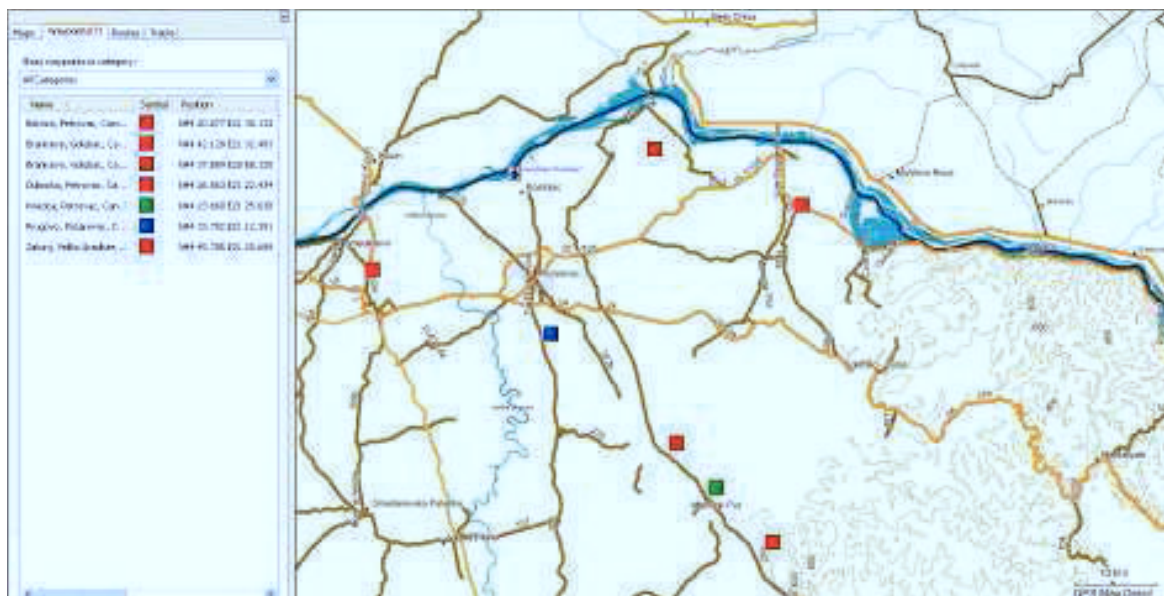
Слика 14 - Географска распрострањеност врста трихинела у популацији лисица (*Vulpes vulpes*) на територији Браничевског и Подунавског округа

У популацији шакала присуство инфекције трихинелом утврђено је на територији четири општине: Пожаревац, Велико Градиште, Голубац и Петровац (Табела 23 и слика 15).

Табела 23 – Присутне врсте трихинела у популацији шакала (*Canis aureus*) на територији Браничевског и Подунавског округа

■ *T. spiralis* ■ *T. britovi* ■ мешовита инфекција *T. spiralis* и *T. britovi*

Ред. бр.	Општина	Насеље	Географске координате	Врста животиње	Врста <i>Trichinella</i>	LPG
1.	Пожаревац	Пругово	N 44 33.702 E 21 12.391	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. britovi</i>	19,45
2.	Велико Градиште	Затоње	N 44 45.785 E 21 20.689	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	0,6
3.		Царевац	N 44 40.768 E 20 29.537	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	PCR негат.	3,1
4.	Голубац	Браничево	N 44 42.128 E 21 32.483	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	0,67
5.		Браничево	N 44 42.302 E 21 33.454	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	3,2
6.	Петровац	Бистрица	N 44 20.077 E 21 30.133	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	3,23
7.		Дубочка	N 44 26.563 E 21 22.434	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i>	5,08
8.		Кнежица	N 44 23.660 E 21 25.638	Шакал (<i>Canis aureus</i>)	<i>T. spiralis</i> и <i>T. britovi</i>	0,97

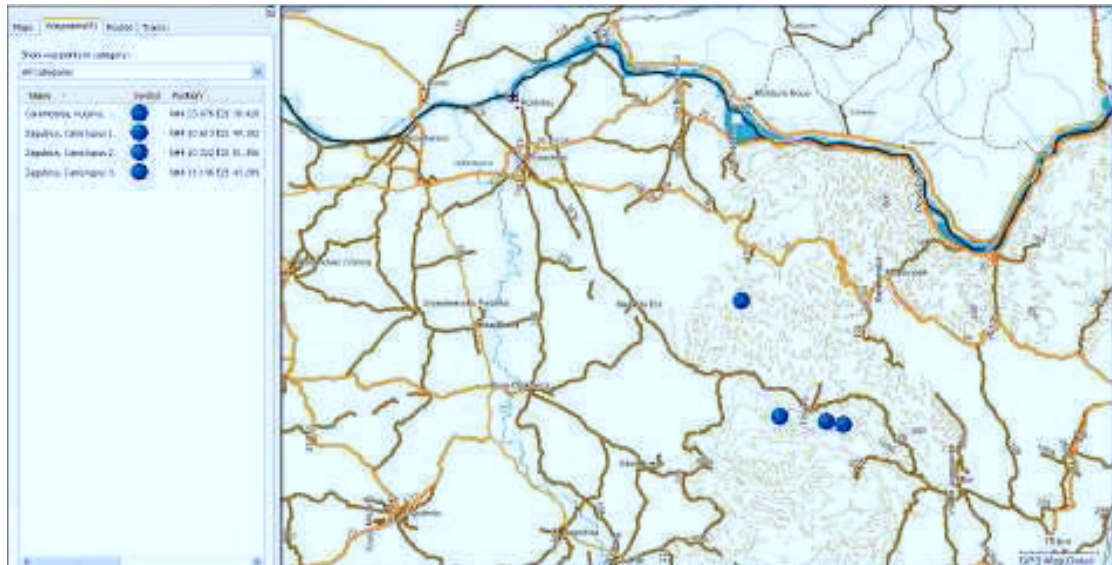


Слика 15 - Географска распрострањеност врста трихинела у популацији шакала (*Canis aureus*) на територији Браничевског и Подунавског округа

У популацији вукова присуство инфекције трихинелом утврђено је на територији две општине: Кучево и Жагубица (Табела 24 и слика 16).

Табела 24 – Присутне врсте трихинела у популацији вукова (*Canis lupus*) на територији Браничевског и Подунавског округа

Ред. бр.	Општина	Насеље	Географске координате	Врста животиње	Врста <i>Trichinella</i>	LPG
1.	Кучево	Церемошња	N 44 23.076 E 21 38.428	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	4,2
2.	Жагубица	Жагубица	N 44 10.613 E 21 49.182	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	14,2
3.		Жагубица	N44 10.322 E21 51.356	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	0,52
4.		Жагубица	N44 11.146 E21 43.289	Вук (<i>Canis lupus</i>)	<i>T. britovi</i>	2,8



Слика 16 - Географска распрострањеност врста трихинела у популацији вукова (*Canis lupus*) на територији Браничевског и Подунавског округа ●

6. ДИСКУСИЈА

Територија Браничевског и Подунавског округа простире се на 4.903km² између 44°04'50"- 44°49'20" северне ширине и 21°02'30"- 22°03'30" источне дужине. 65% је пољопривредно земљиште. Ово подручје је типичан представник комбинације равничарских и планинских предела у Србији. На територији Браничевског округа налази се пет већих река: Дунав, Морава, Млава, Могила и Пек и велики број мањих водотокова (потока, речица, рукаваца). Територија Подунавског округа је на северу оивичена Дунавом, на истоку реком Великом Моравом, која уједно представља природну границу између овог и Браничевског округа. На територији овог округа налазе се и река Јасеница, Кубуршница и Велики Луг, као и вештачка акумулација Кудрачко језеро 1 и 2. Клима је умерено континентална. Браничевски округ обухвата 1192 насеља, док се Подунавски округ састоји од 64 насеља.

Трихинелоза представља једну од најзначајнијих зооноза које су присутне на овом епизоотиолошком подручју (Zivojinovic et al., 2012). Број дијагностикованих случајева и локација оболелих животиња даје основу за оправдану сумњу о стационараности појединих зооноза, као што је трихинелоза, на неким општинама у одређеној календарској години или временском периоду.

На основу података из архиве ВСИ Пожаревац, у последњих 15 година (1997-2011), на територији Браничевског и Подунавског округа преваленција трихинелозе у популацији домаћих свиња је била променљива и кретала се од 0,07% током 2010. године до 0,56% у 2000. години, када је и број насеља у којима је утврђено присуство трихинелозе био највећи 124 (48,44%) (Табела 25).

На основу прикупљених података на месечном нивоу, из кланица, ветеринарских станица и ветеринарских амбуланти на територији Браничевског и Подунавског округа у току 2010. године извршен је преглед на присуство ларви трихинела код укупно 192.707 узорака мяса закланих домаћих свиња. Присуство ларви трихинела утврђено је у 136 узорака (0,07%). Од тога је на кланицама од 116.966 закланих свиња присуство ларви утврђено код 13 узорака (0,01%), док је

на газдинствима код 75.741 домаћих свиња после клања утврђен позитиван налаз код 123 (0,16%) (Табела 8). Свиње заклане на кланицама су углавном животиње пореклом са фарми на којима се примењују биосигурносне мере, што је у складу са утврђеном t вредношћу ($t=-10,118$) и статистички значајном разликом ($p<0,01$) у проценту позитивних налаза на кланицама и клања за сопствене потребе на газдинствима.

Резултати добијени у овом раду, а на узорцима прикупљеним током 2010 г. јасно показују да је инфекција са трихинелом практично одсутна са фарми које су наменски прављене за узгој свиња и на којима се примењују биосигурносне мере. Код домаћих свиња са малих, индивидуалних газдинстава, где владају нехигијенски услови за држање и исхрану животиња установили смо постојање искључиво *T. spiralis*. Наравно, пошто смо у складу са актуелним Правилником о мерама за сузбијање трихинелозе животиња (Сл. Лист СРЈ 20/95) применили серолошка и епизоотиолошка испитивања у домаћинствима где је раније било утврђено присуство трихинелозе, очекиван је већи проценат инфекције (41%) него што је то случај код насумичних испитивања (где је на нивоу оба округа права слика преваленције за 2010 г. износила 0,16% свиња гајених на малим газдинствима).

Запажа се велика разлика у епизоотиолошкој слици појаве трихинелозе на Браничевском и Подунавском округу. Подаци су прикупљани на месечном нивоу, са кланица на којима је вршен инспекцијски преглед меса након клања свиња, на (присуство ларви трихинела одређивано је методом вештачке дигестије), као и од ветеринарских станица и ветеринарских амбуланти у којима је вршен преглед меса свиња закланих у индивидуалним домаћинствима (методом трихинелоскопије и/или методом вештачке дигестије) (Табела 25). Разлике између два округа се могу објаснити већом територијом Браничевског округа самим тим већим бројем свиња које се гаје, као и навикама у гајењу свиња на овом округу (слободни испусти, исхрана свиња непрокуваним помијама, неадекватно уништавање трупова уинулих свиња), постојањем већег броја тачака од интереса као могућих фактора ризика преношења инфекције врстама трихинела (депоније, многобројни водотокови, већи број дивљих свиња на Браничевском округу, као и

навика ловаца да остављају трупове угинулих и изловљених дивљих свиња у близини насељених места где се напасају домаће свиње).

Табела 25 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији Браничевског и Подунавског округа у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано узорака	Кланице	Газдинства	Број позитивних налаза	Број насеља у којима је утврђена трихинелоза	Година
143043	74770	58273	548	67	1997.
191242	103951	87291	539	80	1998.
227573	98768	128805	968	106	1999.
219818	75941	143877	1,245	124	2000.
171857	36111	135746	927	108	2001.
208833	47330	161503	987	116	2002.
254555	54896	199659	1099	116	2003.
223102	50300	172802	1121	120	2004.
222500	75281	147219	600	101	2005.
218651	69623	149028	509	102	2006.
233909	70096	163813	438	96	2007.
185184	95530	89654	359	81	2008.
187561	106824	80737	241	73	2009.
192707	116966	75741	136	60	2010.
187003	120059	66944	285	53	2011.

Браничевски округ спада у регионе Србије са највећом преваленцијом трихинелозе домаћих свиња. У периоду од 1994 до 2003. године трихинелоза у популацији домаћих свиња је била присутна на једној трећини територије Србије (Superlovic et al., 2005). У периоду од 2001-2005. године преваленција у популацији домаћих свиња на територији Србије је износила 0,11%, а затим је пала на 0,05% 2006-2008., да би 2010. године износила 0,02% (Sofronic-Milosavljevic et al., 2013). На ендемском подручју које је било предмете нашег испитивања 2003.године шест општина је на територији Браничевског округа (Пожаревац, Кучево, Велико Градиште, Жабари, Голубац и Мало Црниће) званично, од стране Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде проглашено зараженим, када је просечна преваленција на овој територији била 0,56% (Zivojinovic et al., 2009). Мере које су

предузимане на зараженом подручју у складу са Решењем Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде дале су позитивне ефекте у смислу опадања преваленције трихинелозе у популацији домаћих свиња, а самим тим значајно смањење економских губитака (Testic et al., 2012).

Табела 26 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији Браничевског округа у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано узорака	Кланице	Газдинства	Број позитивних налаза	Број насеља у којима је утврђена трихинелоза	Година
128010	63081	54929	537	64	1997.
141253	59817	81436	515	77	1998.
166744	60798	105946	926	96	1999.
164810	55713	109097	2,058	114	2000.
135673	30128	105545	901	97	2001.
150510	27073	123437	931	103	2002.
179749	37303	142446	1032	102	2003.
158622	37031	121591	1050	102	2004.
148430	49165	99265	552	89	2005.
151323	52889	98434	471	92	2006.
157626	47587	110039	399	81	2007.
139853	75414	64439	324	70	2008.
140999	80454	60545	226	64	2009.
141972	86119	55853	128	55	2010.
126699	78113	48586	278	48	2011.

Преваленција трихинелозе у популацији домаћих свиња је била релативно константна у периоду од 1995 до 1998, затим значајно расте до 2004. године, да би од 2005. године била у паду (Zivojinovic et al., 2009). Територијална распрострањеност на посматраном епизоотиолошком подручју се кретала од 20,70% до 48,44%. Постоји значајна разлика у односу на поједине општине. Тако је, на територији општине **Пожаревац** са 27 насељених места, распрострањеност трихинелозе у популацији домаћих свиња била најнижа 1997. године (25,92% од укупног броја насеља) док је 2004. била присутна у 17 насеља, односно 62,96%. Град Пожаревац представља седиште Браничевског округа, а сама општина је сачињена од 90% пољопривредног земљишта, са плодном Стишком равницом. Од 2003. године спада у групу заражених

општина од трихинелозе (Zivojinovic et al., 2009), када је преваленција трихинелозе домаћих свиња износила 0,22%. Након примене предвиђених мера у програму за сузбијање, предузетих након доношења решења на зараженим општинама преваленција се одржавала на истом нивоу, да би се у наредном периоду повећавала, са максимумом 2007. и 2008. када је износила 0,29%. И поред свих предузетих мера у самим домаћинствима у којима се гаје свиње, остао је проблем јавних депонија на којима се неконтролисано одлажу лешеве уинулих домаћих и дивљих животиња, код којих је утврђено присуство инфекције (Табела 9 и 11), које су потенцијални извор за псе луталице код којих је и потврђена инфекција ларвама трихинела (Табела 12 и 14). Тако је у последњих две године посматраног периода (2010. и 2011. година) приметан пад броја свиња али и утврђених случајева инфекције код домаћих свиња на 0,20% до 0,18% (Табела 28).

Табела 27 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији Подунавског округа у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано узорака	Кланице	Газдинства	Број позитивних налаза	Број насеља у којима је утврђена трихинелоза	Година
15033	11689	3344	11	3	1997.
49989	44134	5855	24	3	1998.
60829	37970	22859	42	10	1999.
55008	20228	34780	87	10	2000.
36184	5983	30201	26	11	2001.
58323	20257	38066	56	13	2002.
74806	17593	57213	67	14	2003.
64480	13269	51211	70	18	2004.
74070	26116	47954	47	12	2005.
67328	16734	50594	38	10	2006.
76283	22509	53774	39	15	2007.
45331	20116	25215	35	11	2008.
46562	26370	20192	15	9	2009.
50735	30847	19888	8	5	2010.
60304	41946	18358	7	5	2011.

Табела 28 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Пожаревац у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
42636	30800	11836	130	7	1997.
40902	25224	15678	87	8	1998.
57134	31884	25250	134	13	1999.
49847	20076	29771	154	19	2000.
29774	6127	23647	83	14	2001.
31813	1435	30378	64	15	2002.
39835	0	39835	89	16	2003.
31832	136	31696	88	17	2004.
23255	0	23255	50	15	2005.
28399	0	28399	67	14	2006.
26881	0	26881	79	17	2007.
17198	3	17195	50	14	2008.
13683	0	13683	36	13	2009.
12288	0	12288	25	11	2010.
11061	0	11061	21	12	2011.

Општина **Мало Црниће** спада у једну од шест званично проглашених општина заражених од трихинелозе (Zivojinovic et al., 2009) и покрива територију од 19 насеља. Распрострањеност трихинелозе се кретала од 36,84% захваћене територије до 89,47% у току 2002.године, након чега се одржавала на већој територији општине и није падала испод 57,89% колико је забележено у току 2011.године. Преваленција је била највиша 2004.године, када је износила 1,99%, да би затим била у паду, са најнижом вредношћу у 2010.години од 0,31% (Табела 29). Присуство инфекције у популацији лисица са *T. spiralis* и *T. britovi* (Табела 11) на територији ове општине, представља стални ризик за домаће свиње које се слободно држе.

На обали Дунава се налази територија општине **Голубац** коју подједнако сачињава шумско и пољопривредно земљиште. Један део припада Националном парку Ђердап. Представља једну од шест, званично проглашених општина на Браничевском округу, заражених од трихинелозе (Zivojinovic et al., 2009). Трихинелоза је препозната као стационарирана зоопаразитоза на овој општини. Од укупно 24 насељених места број насеља у којима је утврђено присуство заражених домаћих свиња је растао све до 2004.године (91,66% захваћене

територије). Након овог периода, број насељених места опада, да би се 2011.године само у 3 насељена места утврдило присуство трихинелозе (12,50% територије). У односу на крај XX века када је преваленција достигала вредност од 3,43% (1999.година), прву декаду XXI века означио је пад броја заражених свиња на територији ове општине. Тако је 2011.године преваленција износила 0,09%. Пад броја заражених свиња, био је праћен и смањењем географске распрострањености трихинелозе на овом подручју (Табела 30). Међутим, постојање Националног парка Ђердап на територији ове општине, који је станиште многобројних дивљих свиња, шакала и лисица, код којих је потврђена инфекција са *T. spiralis* на овом подручју (Табела 11), представља стални изик на преношење инфекције из сиватичног у домаћи циклус.

Табела 29 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Мало Црниће у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
7410	0	7410	8	7	1997.
8430	0	8430	18	8	1998.
10814	0	10814	45	14	1999.
10202	0	10202	116	16	2000.
10341	0	10341	133	16	2001.
8482	0	8482	81	17	2002.
9614	0	9614	125	15	2003.
9557	0	9557	191	14	2004.
7444	0	7444	90	12	2005.
7648	0	7648	93	16	2006.
8614	0	8614	84	12	2007.
6656	0	6656	110	13	2008.
6020	0	6020	49	13	2009.
5816	0	5816	18	9	2010.
5612	0	5612	30	11	2011.

Табела 30 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Голубац у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
6353	627	5726	79	18	1997.
7295	871	6424	101	19	1998.
6784	571	6213	233	22	1999.
7367	1279	6088	195	22	2000.
6051	1569	4482	82	15	2001.
6507	2392	4115	55	17	2002.
5090	0	5090	48	16	2003.
9439	4137	5302	47	22	2004.
36699	31729	4970	36	18	2005.
39979	36732	3247	20	16	2006.
36201	33036	3165	34	13	2007.
3113	0	3113	17	11	2008.
2888	0	2888	15	7	2009.
3226	0	3226	7	4	2010.
3212	0	3212	3	3	2011.

Рељеф територије општине **Кучево** се састоји од 50% равничарског и 50% брдско-планинског дела, који захвата Звишке планине, Северни Кучај и северозападне обронке Хомољских планина. Од 2003.године је званично проглашена као територија од 28 насељених места која су заражена трихинелозом (Zivojinovic et al., 2009). Почетком XX века територијална захваћеност је била највећа и износила је 46,43%, да би од 2005.године била у опадању (28,57%) и у последњих четири године посматраног периода износила 17,86% са падом на 7,14% у 2011.години. И поред смањења броја заражених свиња, 2000.године преваленција је износила 0,83%, број заражених свиња је и даље значајан (2011.године преваленција је износила 0,31%) (Табела 31). Код популације лисица и вукова чије је природно станиште Хомољске планине, током нашег истраживања утврђено је присуство само *T. britovi*, што указује да на чињеницу да нема мешања између домаћег и дивљег циклуса.

Табела број 31 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Кучево у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
26716	12651	4065	87	7	1997.
31328	13361	17967	100	10	1998.
29354	7499	21855	175	8	1999.
25882	9293	16589	214	13	2000.
24078	7131	16947	144	13	2001.
21164	924	20240	114	11	2002.
37725	15520	22205	138	11	2003.
24754	6,529	18225	125	12	2004.
13240	0	13240	46	8	2005.
10847	0	10847	38	8	2006.
22192	4196	17996	13	5	2007.
61144	49526	11618	29	5	2008.
57234	48271	8963	9	5	2009.
60338	53676	6662	19	5	2010.
56784	49322	7462	175	2	2011.

У дужини од 20 километара река Дунав раздваја општину **Велико Градиште** од суседне Румуније и чини је пристаништем за све међународне бродове. Већи део територије (60%) је равничарског рељефа. Поред Дунава, многобројне су мочварне површине и река Пек. Некадашње богато шумско растиње, данас износи око 200 хектара површине. За ову општину карактеристична је географска распрострањеност трихинелозе домаћих свиња која обухвата целокупну територију, односно свих 26 насељених места. Најмањи број насеља у којима је утврђено присуство инфекције био је 2011.године, када је трихинелоза домаћих свиња утврђена у 13 насеља (50%). Преваленција се кретала од 0,57% до 2,41% у 2004.години када је била највиша. Од тог периода број заражених свиња опада, да би поново у 2011.години достигао ниво од 2,73% (Табела 32). Резултати наших истраживања су потврдили присуство *T. spiralis* и *T. britovi* у популацији дивљих свиња, лисица и шакала (Табела 11), чиме се потврђује могући пренос инфекције из домаћег у дивљи циклус и обрнуто.

Табела број 32 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Велико Градиште у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
20819	8674	12145	158	18	1997.
24264	11152	13112	138	24	1998.
28240	12599	15641	259	26	1999.
28328	12610	15718	388	26	2000.
18852	3833	15019	390	25	2001.
23153	3695	19458	541	25	2002.
24071	3158	20913	550	26	2003.
20850	3106	17744	503	25	2004.
16767	1755	15012	281	26	2005.
15684	2229	13455	212	25	2006.
14292	2088	12204	165	24	2007.
8851	3224	5627	102	20	2008.
6966	736	6230	89	21	2009.
5905	0	5905	51	21	2010.
1537	0	1537	42	13	2011.

Општина **Жабари** се налази у средишном делу доњег Поморавља и 80% површине је пољопривредно, док је преосталих 20% прекривено шумама. Једна је од мањих општина Браничевског округа, са укупно 17 насељених места. Преваленција трихинелозе домаћих свиња била је највиша крајем прошлог века, 1999. године, када је износила 0,63% и до 2004. године се одржавала до нивоа од 0,29%, да би од тог периода била у паду. Године 2003. када је и званично проглашена зараженом територијом (Zivojinovic et al., 2009) географска распрострањеност је била највећа, када је чак 70,59% територије било захваћено. Заједно са преваленцијом опада и географска распрострањеност, тако да је 2011. године трихинелоза свиња утврђена само у једном насељеном месту (5,88%), док је преваленција износила 0,04% (Табела 33).

Општина **Петровац и Жагубица** представљају територију на којој се у посматраном периоду од 1997. до 2011. године бележе само спорадични случајеви трихинелозе домаћих свиња. Ове општине никада до сада нису препознате као подручја са ендемском присутношћу трихинелозе и нису званично проглашаване зараженим територијама (Zivojinovic et al., 2009).

Табела број 33 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Жабари у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
13644	9341	4303	71	4	1997.
12049	8515	3534	62	4	1998.
11865	7523	4342	75	6	1999.
17709	12073	5636	79	7	2000.
17198	11192	6006	59	8	2001.
27404	18173	9231	66	10	2002.
27919	18352	9567	74	12	2003.
30323	22842	7481	90	9	2004.
22314	15583	6731	43	6	2005.
20750	13917	6833	34	10	2006.
16428	8265	8163	21	7	2007.
20924	16818	4106	11	3	2008.
26870	23484	3386	9	3	2009.
27542	24342	3200	7	4	2010.
22935	19733	3202	1	1	2011.

Пољопривредно земљиште чини три четвртине територије општине Петровац, док је преостала територија покривена шумом. У многобројне водотокове спадају реке Млава, Бусур, Витовница и Шетоњска река. Преваленција трихинелозе домаћих свиња на територији општине **Петовац**, која је највећа општина на посматраном епизоотиолошком подручју (укупно 34 насељених места) кретала се од 0,004% до 0,07%. Географска распрострањеност је била ограничена и захватала је од 2,94% до највише 26,47% територије (Табела 34). Код дивљих животиња (дивље свиње и шакали) током нашег истраживања утврђено је присуство *T. spiralis* и *T. britovi* (Табела 11), што указује на сталну угроженост популације домаћих животиња, пре свега домаћих свиња које се слободно гаје и могу доћи у додир са труповима заражене дивљачи.

Табела 34 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Петровац у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
10017	714	9303	4	3	1997.
15892	652	15240	7	3	1998.
19209	685	18524	2	4	1999.
22411	298	22113	9	9	2000.
26529	209	26320	8	4	2001.
27070	296	26774	9	7	2002.
31312	0	31312	5	4	2003.
27654	0	27654	6	3	2004.
24737	0	24737	7	4	2005.
24756	0	24756	6	2	2006.
29562	0	29562	3	3	2007.
19451	5,843	13608	5	4	2008.
25435	7,963	17472	18	1	2009.
24335	8,101	16234	1	1	2010.
23346	9,058	14288	5	5	2011.

Општина **Жагубица** се налази на југу посматраног епизоотиолошког подручја, захвата горњи део долине реке Млаве и на ободима је покривена Горњачким и Хомољским планинама, као и стрмијим деловима Бељанице и масивом Црни врх. У току шест година (1997, 2004, 2005, 2007, 2008 и 2010. година) посматраног периода од 1997. до 2011. године није утврђено присуство трихинелозе у популацији домаћих свиња, док се преваленција трихинелозе у преосталим годинама кретала од 0,02% до 0,18%. Од укупно 17 насеља трихинелоза је утврђена у највише 3 насеља (5,88% до 17,65%). Утврђени ретроспективни епизоотиолошки подаци указују да су зражене свиње на овим општинама биле пореклом са територије околних општина, где је трихинелоза домаћих свиња ендемски присутна (Табела 35). Код вукова изловљених и испитиваних током нашег истраживања пореклом са Хомољских планина утврђено је само присуство *T. britovi* (Табела 11), што иде у прилог чињеници да се ова врста аутохтоно одржава само код вукова.

Табела 35 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Жагубица у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
415	274	141	0	0	1997.
1093	42	1051	2	1	1998.
3344	37	3307	3	3	1999.
3064	84	2980	3	2	2000.
2850	67	2783	2	2	2001.
4917	158	4759	1	1	2002.
4183	273	3910	2	2	2003.
4213	281	3932	0	0	2004.
3974	98	3876	0	0	2005.
3260	11	3249	1	1	2006.
3456	2	3454	0	0	2007.
2516	0	2516	0	0	2008.
1903	0	1903	1	1	2009.
2522	0	2522	0	0	2010.
2212	0	2212	1	1	2011.

Са источне стране општина Велико Градиште и Голубац налази се Дунав као природна граница са Румунијом, где је преваленција у периоду 1997-2004. била око 0.08% (Blaga et al., 2009). Број нових случајева опада од 2006. до 2010.године. Овакав развој епизоотиолошке ситуације представља последицу примене мера предузетих након доношења решења о предузимању мера на зараженим општинама. Идентификација животиња, идентификација фарми и газдинстава на којима се гаје свиње, систематска дератизација, побољшање биосигурносних мера, дехелминтизација свиња, праћење и предузимање свих мера предвиђених законским прописима (Plavsic et al., 2009) на газдинствима на којима је утврђена трихинелоза свиња (Zivojinovic et al., 2010). Такође је велика пажња посвећена едукацији фармера, држаоца свиња и ловаца. Као један од резултата, поред смањеног броја нових газдинстава и оболелих свиња, престанак појаве трихинелозе у хуманој популацији до 2008. године. Крајем 2011. године на територији општине Пожаревац забележена је породична епидемије након конзумирања производа од меса које није претходно прегледано. Овај случај

указује на потребу наставка, као и проширивања напора у едукацији становништва о неопходном прегледу меса пре употребе за људску исхрану.

На територији Подунавског округа, кога чине три општине Смедерево, Велика Плана и Семедеревска Паланка, трихинелоза у популацији домаћих свиња је 1997. године забележена само у три насеља општина Смедерево и Велика Плана, док је на територији општине **Смедеревска Паланка** трихинелоза свиња први пут утврђена 2001. године. Ова општина се налази на северно источном делу Шумадије и представља територију са најнижом преваленцијом појаве трихинелозе на епизоотиолошком подручју Браничевског и Подунавског округа. За посматрани период преваленција се кретала од 0 до 0,08% 2008. године. Географска распрострањеност је била ограничена са највећом распрострањеношћу од 21,05% захваћене територије на овој општини која покрива укупно 19 насеља (Табела 36).

Табела 36 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Смедеревска Паланка у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
292	243	49	0	0	1997.
1229	1189	40	0	0	1998.
6146	6059	87	0	0	1999.
1660	1453	207	0	0	2000.
1549	1219	330	2	3	2001.
3675	675	3000	2	2	2002.
2240	422	1818	0	0	2003.
16623	10672	5951	9	4	2004.
29096	24017	5079	9	1	2005.
20688	14976	5712	0	0	2006.
26115	20906	5209	2	2	2007.
13921	12407	1514	13	2	2008.
26223	24950	1273	2	2	2009.
29501	28249	1252	2	2	2010.
36605	35392	1213	1	1	2011.

Смедерево је седиште Подунавског округа, налази се на обали Дунава у северно источном делу Србије. Највиша преваленција трихинелозе домаћих свиња забележена је 2004. године 0,11% да би у наредном периоду опадала и

2011. године износи 0,01%. Географска распрострањеност на укупно 28 насељених места је захватала највише 28,57% територије општине 2003. и 2007. године, од када се бележи пад све до 2011.године када износи 3,57% територије општине Смедерево (Табела 37).

Табела 37 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Смедерево у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
2818	60	2758	7	1	1997.
3671	0	3671	0	1	1998.
6460	501	5959	3	3	1999.
15257	1377	13880	13	6	2000.
14583	2599	11984	5	4	2001.
12232	2890	9342	9	4	2002.
21213	2901	18312	11	8	2003.
17413	2597	14816	19	7	2004.
20823	2099	18724	9	5	2005.
20311	1758	18553	13	6	2006.
20971	1603	19368	11	8	2007.
14068	1896	12172	5	4	2008.
12940	1420	11520	8	5	2009.
16406	2598	13808	1	1	2010.
17016	3892	13124	1	1	2011.

Територија општине **Велике Плане** је претежно пољопривредно подручје плодне Поморавске равнице, преко које протичу реке Велика Морава, Јасеница и Рача. Географска распрострањеност трихинелозе је варирала и кретала се од 11,76% до 41,17% захваћене територије од укупно 17 насељених места. Преваленција трихинелозе домаћих свиња је била најнижа на почетку и крају посматраног периода 0,05%, док је на самом почетку овог века била највиша 0,19% (Табела 38).

Река Велика Морава представља природну границу између Браничевског и Подунавског округа. Преваленција трихинелозе се у Подунавском округу кретала од 0,01% до 0,06%, са максимумом од 87 случајева на самом почетку овог века (Табела 27). До периода 2004. године број забележених случајева се одржавао на истом нивоу, да би уследио период опадања броја случајева трихинелозе, све до најниже забележене преваленције у посматраном периоду од 0,01% 2011.године.

Географска распрострањеност се кретала од 4,68% до највише 28,12% у току 2004.године. Територија Подунавског округа не представља природно станиште за дивље свиње, тако да је ризик одржавања инфекције у овој врсти дивљих животиња минималан обзиром на њихов број на овом округу.

Табела 38 - Приказ кретања трихинелозе у популацији домаћих свиња на територији општине Велика Плана у периоду од 1997. до 2011. године

Укупно прегледано	Кланице	Газдинства	Позитивно	Број насеља	Година
11,923	11,386	537	4	2	1997.
45,089	42,945	2,144	24	2	1998.
48,223	31,410	16,813	39	7	1999.
38,091	17,398	20,693	74	4	2000.
20,052	2,165	17,887	19	4	2001.
42,416	16,692	25,724	45	7	2002.
51,353	14,270	37,083	56	6	2003.
30,444	0	30,444	42	7	2004.
24,151	0	24,151	29	6	2005.
26,329	0	26,329	25	4	2006.
29,197	0	29,197	26	5	2007.
17,342	5,813	11,529	17	5	2008.
7,399	0	7,399	5	2	2009.
4,828	0	4,828	5	2	2010.
6,683	2,662	4,021	5	3	2011.

Посматрајући наведени период од 15 година на целокупној територији епизоотиолошког подручја Браничевског и Подунавског округа, запажа се значајан пораст случајева трихинелозе домаћих свиња крајем 1999. године (Zivojinovic et al., 2009) у поређењу са претходним периодом. Објашњење се налази у чињеници да је у том периоду велики број индустријских фарми и кланица затворено у току ратног периода. У исто време отвара се велики број малих кланица и прерада меса у којима се не примењује адекватан инспекцијски преглед меса. Нестабилна економско-социјална ситуација имала је утицај на рад ветеринарске инспекције, што је све за последицу имало пораст броја заражених животиња и географско ширење трихинелозе (Superlovic et al., 2001). Иако су у то време законски прописи били веома слични важећим прописима у Европској Унији, њихова примена није била

доследна (Djordjevic et al., 2005). Почетком XXI века популација свиња у Србији се смањивала, али је трихинелоза и даље остала озбиљан проблем. Поновно појављивање трихинелозе у виду епизоотија одвија се у периоду од 1999. до 2003. године, када је ресорно Министарство званично прогласило ендемска подручја на територији Србије и утврдила неопходност предузимања одређених мера са циљем сузбијања и искорењивања трихинелозе. Тада је укупно шест општина са територије Браничевског округа проглашено зараженим: Пожаревац, Мало Црниће, Кучево, Велико Градиште, Голубац и Жабари. Ветеринарски специјалистички институт Пожаревац, као надлежни институт за ову епизоотиолошку јединицу припрема програм контроле, који се спроводи од 2003. године. Програмом је обухваћена систематска дератизација, дехелминтизација свиња, серолошки преглед свиња на газдинствима у којим је утврђена трихинелоза после клања свиња, епизоотиолошки увиђај на сваком зараженом газдинству. Сва насеља у којима је утврђена трихинелоза су лоцирана близу река, потока, стајаћих вода. Просечан број свиња по домаћинству био је четири или мање, а за више од 90% власника гајење свиња је представљало додатну делатност. Уочени су врло лоши смештајни и хигијенски услови, неадекватна грађевинска структура објеката у којима су смештене свиње са могућношћу слободног уласка глодара. Врло слична запажања су забележена и од стране других аутора (Superlovic et al., 1989). Серолошка испитивања су показала преваленцију од 1,6% што је потврдило чињеницу да је у овом региону у то време трихинелоза била значајан проблем, са тенденцијом ширења (Zivojinovic et al., 2009). У зависности од доследности примене предложених мера на различитим општинама постигнути су различити резултати. Континуирана примена свих предвиђених мера на територијама заражених општина имала је за резултат значајан пад броја заражених свиња у периоду после 2005.године.

Поред броја заражених свиња праћен је и број насељених места у којима је утврђено присуство врста. Тако се од укупно 256 насеља на територији Браничевског и Подунавског округа број насеља у којима је утврђено присуство заражених животиња кретао од 53 до 120 (20,70% до

46,87%). Може се запазити да је територијална распрострањеност пратила број заражених свиња. Тако је у периоду епизоотија од 1999. до 2004. године, геграфска распрострањеност и била највећа (41,41% до 46,87%), да би постепено почела да опада до 20,70% 2011.године.

У Балканској регији трихинелоза представља ендемску зоопаразитозу. *T. spiralis* и *T. britovi* су две најзаступљеније врсте на територији земаља које окружују Србију (Хрватска, Мађарска, Румунија, Бугарска и Македонија) (Pozio E., 2007). На територији Србије, присуство *T. spiralis* забележено је не само у популацији домаћих, већ и дивљих свиња (Cuperlovic et al., 2005; Pozio E., 2007), док је присуство *T. britovi* забележено само у популацији дивљих животиња (Cvetkovic et al., 2011, Sofronic-Milosavljevic et al., 2013, Zivojinovic et al., 2013).

Примењени Географско информациони систем (ГИС) се показао као драгоцен алатка у области ветеринарске паразитологије у области истраживања, прављења територијалних мапа за узорковање и појаву болести. Тако су Rinaldi et al., 2006. описали примену ГИС-а за прављење планова узорковања и предузимања мера на основу добијених података у случају истраживања паразита паса као потенцијалних зоонозних агенаса. Једна од најдрагоценијих вредности употребе ГИС-а је могућност обједињавања различитих података унутар једног природног окружења одређене територије (Rinaldi et al., 2006). Описане су могућности побољшања контролних програма за заразне болести животиња и зоонозе, као и повезивање података из популације животиња са популацијом људи применом ГИС-а (Haghdooost et al. 2007). Употреба ГИС-а за дефинисање потенцијалних фокуса *Trichinella* инфекције описана је у популацији свиња која се држе у слободним испустима у САД (Burke et al. 2008). Оваква примена ГИС-а показала се као врло корисна у ендемском подручју где је веома изражен утицај човека. Мапирање случајева трихинелозе, развој описних мапа је омогућио проучавање одговарајућих фактора животне средине, као што су топографија, вегетација, врста земљишта и дало могућност предвиђања појаве болести. Просторну распрострањеност у оквиру

еколошког обрасца за *T. spiralis* и *T. britovi* на територији Европе уз помоћ посебно дизајнираног ГИС-а описан је од стране Pozio et al., 2009с.

На територији Србије први пут се ГИС користи 2010.године (Zivojinovic et al., 2010) за проучавање појаве трихинелозе у регији Браничевског округа. Мапе са географским положајем насеља у којима је утврђена трихинелоза код домаћих свиња, положај великих фарми свиња, кланица и ловачких секција, као тачака од интереса у проучавању ове зоопаразитозе. Током проучаваног периода на Браничевском округу је у 2008. године просечна преваленција трихинелозе домаћих свиња се кретала од 0 до 1,65% (Zivojinovic et al., 2010). Трихинелоза домаћих свиња је утврђена само на газдинствима, док у идентификованим великим фармама свиња није било забележених случајева. У складу са важећим законским прописима (Правилник 20/1995) на сваком газдинству где се након клања свиња утврди трихинелоза, обавезан је серолошки преглед свих преосталих свиња. Планирање оваквог надзора било би олакшано употребом ГИС-а и прављењем временских и просторних образаца. Серолошки преглед свиња је веома користан у епизоотиолошким истраживањима и припреми програма надзора на територији где је преваленција трихинелозе животиња висока (Gamble et al., 2004).

Већи број дефинисаних најважнијих фактора ризика за појаву трихинелозе у популацији домаћих и дивљих животиња (Pozio, 2007) је присутна на проучаваној територији Браничевског и Подунавског округа. У њих спадају: храњење свиња отпацама који садрже и непрокуване помије, слободан приступ за свиње које се слободно држе и изгоне на пашу, као и за псе луталице депонијама, остављање животињских лешева и делова трупова након клања у природи, где дивље животиње долазе у додир и постају потенцијални нови домаћини. Технологија ГИС-а омогућава истраживање везе између трихинелозе животиња и људи, епизоотиолошка истраживања у смислу утврђивања врсте заражених животиња, географске распрострањености, дефинисања ендемских дистрикта, прављење контролних програма за сертификавање фарми слободних од трихинелозе, као и научна

истраживања у смислу тачне идентификације врста трихинела на проучаваној територији.

Током ловне сезоне 2009-2010. године, инфекција ларвама трихинела је забележена на територији Браничевског округа код 17% прегледаних дивљих животиња (дивље свиње, лисице, шакали, вукови). У прегледаној популацији животиња утврђено је присуство *T. spiralis* и *T. britovi*, које и представљају две основне врсте које циркулишу на територији Европе (Pozio E. et al., 2009c) и на територији суседне државе Румуније (Blaga et al., 2009). Такође је утврђена мешовита инфекције код истог домаћина са ове две врсте *Trichinella* (Sofronic-Milosavljevic et al., 2013, Zivojinovic et al., 2013). Присуство *T. spiralis* у популацији домаћих животиња, али и дивљих животиња уловљених близу насељених места, може се објаснити навикама у гајењу свиња на овој територији, где се свиње пуштају на испашу близу река Дунав, Морава, Млава, Пек, као и потока и стајаћих вода где лако могу доћи у контакт са дивљим животињама. Услови држања у 90% газдинстава на којима је утврђена трихинелоза домаћих свиња су лоши. Свиње се хране отпаcima које садрже термички необрађене отпатке животињског порекла. Постоји могућност директног додира са депонијама на којима свиње рију и конзумирају отпатке животињског порекла (Zivojinovic et al., 2009). Чест је случај неадекватног уништавања и одлагања животињских лешева и трупова у природи. Десет од 256 насеља ове територије је одвојено Дунавом, као природном границом са Румунијом, где је забележено присуство и *T. spiralis* и *T. britovi* у популацији домаћих и дивљих животиња (Blaga et al., 2009). Добијени резултати се слажу са већ изнетим подацима других аутора (Cvetkovic et al., 2011) о вуковима као главним резервоарима за *T. britovi*.

Инфекција ларвама трихинела је на територији Браничевског и Подунавског округа утврђена у популацији домаћих и дивљих животиња на територији свих општина, односно 124 насеља. Дивље животиње код којих је утврђено присуство *T. spiralis* су изловљене близу насељених места, што указује на то да ова врста циркулише између домаћег и дивљег циклуса. Налаз *T. britovi* само у популацији дивљих животиња указује на њено присуство само унутар дивљег циклуса (Zivojinovic et al., 2013). Веома је

значајно истаћи да је током овог истраживања утврђено присуство инфекција ларвама трихинела у популацији дивљих животиња на територији општина које нису препознате као ендемска подручја за трихинелозу домаћих свиња (Петровац, Жагубица, Велика Плана, Семедерево, Смедеревска Паланка), што указује на сталну угроженост домаћих свиња. У том смислу потпуна је оправданост потребе мониторинга популације дивљих животиња за одређивање степена ризика од појаве трихинелозе у популацији животиња (домаће свиње и дивљач) намењених за људску употребу, као и сталне едукације ловаца.

Европска Регулатива 2075/2005 (Commission Regulation (EC) No 2075/2005) описује услове за проглашење слободним од инфекције свиња трихинелом узгајаних на појединачним газдинствима или категоризованим газдинствима, као и услове за дефинисање региона где се ризик од појаве инфекције у популацији домаћих свиња дефинише као занемарљив. Такве свиње не подлежу инспекцијској контроли после клања. Европска регулатива се заснива на два основна документа: мишљењу научног комитета ветеринарске управе који се односи на јавно здравље и епизоотиолошким подацима (European Commission, 2001). У подручјима у којима је преваленција инфекције врстама трихинела мала, динамика инспекцијског преглед на кланицама може бити промењена, уколико се анализом ризика свих неопходних епизоотиолошких података о биолошким ризицима утврди да је ризик од појаве инфекције занемарљив (European Food Safety Authority, 2005). На основу ова два мишљења, европска регулатива 2075/2005 дозвољава да се газдинства или запати свиња званично прогласе слободним од присуства инфекција изазваних врстама трихинела. У току вршења процене врше се и програми контроле домаћих свиња, дивљих свиња, коња и лисица, као и других могућих животињских врста у улози индикатора инфекције. Званичне институције земаља чланица ЕУ могу издати сертификат газдинствима са товним свињама да су слободне од присуства инфекције изазване врстама трихинела, али се услови разликују у зависности од тога да ли је било појаве инфекције код домаћих свиња у последњих десет година. У земљама где су забележени случајеви инфекције у популацији домаћих

свиња, запати могу добити статус да су слободни уколико су испуниле одређене услове, као што су:

а) најмање две контролне посете фарми у периоду од 12 месеци које обухватају податке о програму дератизације (планови и реализација), термичка обрада заосталих залиха хране за животиње, нешкодљиво уништавање лешева угинулих животиња у року од 24 сата, анализа ризика у случају постојања депонија у околини фарме, одгајање прасади у затвореном, контролисаном систему, могућност пуштања прасади на сиси (старости до неколико недеља) у отворене испусте пре одлучивања, уз обавезну идентификације сваке јединке;

б) све свиње заклане на кланици у току 24 месеца или током дужег периода уколико надлежна државна служба донесе одлуку, морају бити прегледане једном од признатих паразитолошких метода;

в) резултати паразитолошких прегледа морају бити негативни;

г) анализа ризика програма мониторинга дивљих животиња мора бити спроведена у подручјима територијално заједничким за дивље животиње и фарме које траже статус слободне од инфекције трихинелама, мониторинг се спроводи у складу са познатим подацима о присуству трихинела у врстама животиња које су дефинисане као индикатори и узорковањем што је могуће веће количине мишићног ткива од одговарајућег броја животиња, идентификација врсте трихинела се спроводи у подручној лабораторији или Националној референтној лабораторији, која може да припреми протокол о мониторингу у популацији дивљих животиња

д) Историјски подаци о појави трихинелозе и свим предузетим мерама у њеном сузбијању употпуњавају све горе наведене захтеве за добијање статуса фарме слободне од инфекције трихинелама.

Стручна служба ВСИ Пожаревац је већ више пута давала предлог предузимања мера у складу са смерницама. Стални рад на едукацији држаоца животиња, ветеринара и ловаца, инспекцијски преглед меса закланих домаћих свиња, као и одстрељених дивљих свиња чије је месо намењено за људску исхрану, систематска дератизација, епизоотиолошки мониторинг (паразитолошки преглед мишићног ткива, серолошки преглед и

идентификација присутних врста трихинела) домаћих и дивљих животиња који би се спроводио на основу израђене анализе ризика, са циљем постизања статуса фарми и подручја слободних од инфекције трихинелама (Zivojinovic et al., 2013).

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. На ендемском подручју Браничевског и Подунавског округа утврђена је инфекција ларвама рода *Trichinella* код домаћих и дивљих животиња на територији свих општина, односно 124 насеља.
2. Употребом *multiplex PCR* технике урађена је генотипизација 53 узорка ларви и установљено присуство *T. spiralis* и *T. britovi*.
3. Утврђено је присуство ларви *T. spiralis* у популацији домаћих свиња које се гаје у индивидуалним газдинствима, док на фармама са стално примењиваним биосигурносним мерама, инфекција није установљена.
4. Инфекција са *T. spiralis* је установљена у популацији паса луталица.
5. Код дивљих животиња, инфекција са *T. spiralis* је утврђена код дивљих свиња, лисица и шакала, док је *T. britovi* установљена код дивљих свиња, лисица, шакала и вукова.
6. Мешовита инфекција установљеним врстама трихинела регистрована је у популацији шакала и лисица.
7. Дивље животиње код којих је утврђено присуство *T. spiralis* су изловљене близу насељених места, што указује да ова врста циркулише између домаћег и сивлатичног циклуса.
8. *Trichinella britovi* циркулише само у оквиру сивлатичног циклуса и аутохтоно се одржава само код вукова.
9. Утврђено је присуство инфекције ларвама трихинела у популацији дивљих животиња на територији општина које нису препознате као ендемска подручја за трихинелозу домаћих свиња (Петровац, Жагубица, Велика Плана, Смедерево, Смедеревска Паланка), што указује на сталну угроженост домаћих свиња.
10. Применом Географско информационог система (ГИС) извршено је мапирање утврђених врста трихинела као и тачака од интереса (жаришта, фарме, ловачка удружења), што је од значаја за израду програма за контролу и сузбијање ове зоонозе.

11. Резултати серолошког испитивања добијени применом *ELISA* и *Western blot* теста указују на значај њихове употребе у програму надзора трихинелозе.
12. Резултати истраживања указују да постоји ризик од појаве трихинелозе на подручју Браничевског и Подунавског округа и неопходност израде Националног програма за сузбијање трихинелозе у популацији домаћих животиња, као и праћење инфекције ларвама трихинела у популацији дивљих животиња.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Ancelle T. (1998) - History of trichinellosis outbreaks linked to horse meat consumption 1975-1998. *Eurosurveillance*, 3, 86-89.
2. Ancelle T., Dupouy-Camet J., Bougnoux M.E., Fourestie V., Petit H., Mougeot G., Nozais J.P., Lapierre J. (1988) - Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *Am. J. Epidemiol.*, 127, 1302-1311.
3. Andrews J.R.H., Bandi C., Pozio E., Gomey-Morales M.A., Ainsworth R., Abernethy D. (1995) - Identification of *Trichinella pseudospiralis* from a human case using random amplified polymorphic DNA. *The Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 185-188.
4. Annual epidemiological report Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data 2012 www.ecdc.europa.eu
5. Appleton J.A., Bell R.G., Homan W. and Van Knapen F. (1991) - Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today*, 7, 190-192.
6. Beck R., Beck A., Lucinger S., Florijancić T., Bosković I., Marinculić A. (2009) - *Trichinella pseudospiralis* in pig from Croatia. *Vet. Parasitol.*, 159(3-4): 304-307.
7. Basset D., Thiebaut M.M., Pratlong F. *et al.* (1996) - Two familial outbreaks of trichinellosis in the Languedoc region of France due to ingestion of wild boar meat [in French]. *Sem. Hop. (Paris)*, 72, 567-568.
8. Blaga R., Durand B., Antoniu S., Gherman C., Cretu C.M., Cozma V., Boireau, P. (2007) - A dramatic increase in the incidence of human trichinellosis in Romania over the past 25 years: impact of political changes and regional food habits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 983-986.
9. Blancou J. (2001) - Hystory of Trichinellosis Survailance. *Parasite*, 8, 16-19.
10. Boireau P., Vallee I., Roman T., Perret C., Mingyuan L., Gamble H.R., Gajadhar A. (2000) - *Trichinella* in horses: a low frequency infection with human risk. *Vet. Parasitol.*, 93, 309-320.
11. Britov V.A., Boev S.N. (1972) - Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestnik Akademii Nauk SSSR*, 28, 27-32.

12. Bruschi F., Marucci G., Pozio E., Masetti M. (2008) - Evaluation of inflammatory responses against muscle larvae of different *Trichinella* species by an image analysis system. *Vet. Parasitol.*, 159, 3-4, 258-262.
13. 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, 141-143.
14. Bruschi F., Murrell K.D. (2002) - New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad. Med. J.*, 78, 15-22.
15. Bruschi F., Pozio E., Watanabe N., Gomez Morales M.A., Ito M., Huang Y., Binaghi R. (1999) - Anaphylactic response to parasite antigens: IgE and IgG1 independently induce death in *Trichinella*-infected mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 119, 291-296.
16. Burke R., Masuoka P., Murell K.D. (2008) - Swine *Trichinella* infection and geographic information system tools. *Emerg. Infect. Dis.*, 14, 1109-1111.
17. Cabaj W. (2006) - Wild and domestic animals as permanent *Trichinella* reservoir in Poland. [in Polish]. *Wiad. Parazytol.*, 52, 175-179.
18. Campbell W.C. (1983a) - Historical introduction. In: Campbell, W.C. (ed.), *Trichinella* and trichinosis. New Yourk: Plenum Press, p. 1-28.
19. Campbell, W.C. (1983b) - Epidemiology. In: Campbell, W.C. (ed.), *Trichinella* and trichinosis. New Yourk: Plenum Press, p. 425– 444.
20. Capo V., Despommier D.D. (1996) - Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev*, 47-54.
21. Capo V., Despommier D., Polvere R.I. (1998) - *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J. Parasitol.*, 84, 209-214.
22. Clinard E.H. (1978) - Serum fractions associated with positive and false positive reactions in the EIA test for trichinellosis in swine. In *Trichinellosis* (C.W. Kim and Z.S. Pawlowski, eds). 4th Int. Conf. of Trichinellosis, University Press of New England, Hanover, 509-517.
23. Cortés-Blanco, M., García-Cabañas, A., Guerra-Peguero, F., Ramos-Aceitero, J.M., Herrera-Guibert, D., Martínez-Navarro, J.F. (2002) - Outbreak of trichinellosis in Cáceres, Spain, December 2001–February 2002. *Euro. Surveill.* 7, 136-138.

24. Costantino S.N., Malmassari S.L., Dalla Fontana M.L., Diamante M.A., Venturiello S.M. (2001) - Diagnosis of human trichinellosis: pitfalls in the use of a unique immunoserological technique. *Parasite*, 8, S144-S146.
25. Cristea G. (1996) - Considerations regarding the distribution of the *Trichinella* larvae in natural infestation at the wild fox (*Vulpes vulpes*). *Parasitologia (Rome)*, 38, 283.
26. Cuperlovic K., Djordjevic M. (2003) - *Trichinella* and Trichinellosis. Institute of Meat Hygiene and Technology, SD Public, Belgrade, p. 23-25.
27. Cuperlovic K., Djordjevic M., Pavlovic S. (2005) - Re-emergence of trichinellosis in southeastern Europe due to political and economic changes. *Vet. Parasitol.*, 132, 159-166.
28. Čuperlović K., Lalić R., Ivanoska D., Sofronić Lj., Bezbradica Lj., Djordjević M., Perović M., Mladenović M., Savić Z., Konstantinović F. (1989a) Epizootiology and prevalence of swine Trichinosis in an endemic locus in Yugoslavia. I. Parasitological and seroepidemiological studies. *Acta Vet-Beograd*, 39, 4, 235-240.
29. Čuperlović K., Lalić R., Ivanoska D., Sofronić Lj., Bezbradica Lj., Djordjević M., Perović M., Mladenović M., Savić Z., Konstantinović F. (1989b) Epizootiology and prevalence of swine in an endemic locus in Yugoslavia. I. Parasitological and seroepidemiological studies. II. Epidemiological observations. *Acta Vet-Beograd*, 39, 5-6, 331-336.
30. Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., (2000) - Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
31. Davidson R.K., Gjerde B., Vikoren T., Lillehaug A., Handeland K. (2006) - Prevalence of *Trichinella* larvae and extra-intestinal nematodes in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.*, 136, 307-316
32. Dea-Ayuela M.A., Romaris F., Ubeira P.M., Rama-Iniguez S., Martinez-Fernandez A., Bolas F. (2001) - Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several helminths. *Parasite*, 8, S120-S122.
33. Despommier D.D. (1988) - The immunobiology of *Trichinella spiralis*. In: Soulsby, E.J.L.(ed) Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, Nematodes. vol.1. Boca Raton, FL: CRC Press, 43-60.

34. Despommier D.D. (1990) - *Trichinella spiralis* the worm that would be virus. Parasitol. Today, 6, 193-196.
35. Despommier D.D. (1993) - *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J. Parasitol., 79, 472-82.
36. Despommier D.D., Gwadz R. W., Hotez P. J (1994) - Parasitic diseases, 757-767.
37. Djordjevic M., Bacic M., Petricevic M., Cuperlovic K., Malakauskas A., Kapel C.M., Murrell K.D. (2003) - Social, political, and economic factors responsible for the reemergence of trichinellosis in Serbia: a case study. J. Parasitol., 89, 226-231.
38. Doby J.M., Couatarmanac'h A., Champion J.P., Beurton D., Gendre B. (1984) - Trichinose humaine et immunodepression. Un cas chez un greffe renal. Med. Mal. infect., 14, 293-298.
39. Dupouy-Camet J. (2006) - Trichinellosis: still a concern for Europe. Euro. Surveill., 11, 1.
40. Dupouy-Camet J., Ancelle T., Lavarde V. and Lapierre J. (1985) - Aspects cliniques de l'epidemie de trichinose d'aout 1985 a Melun et Paris. Bull. Soc. Franç. Parasitologie, 2, 21-24.
41. Dupouy-Camet J., Bruschi F. (2007) - Management and diagnosis of human trichinellosis, p. 37-68. In: Dupouy-Camet J., Murrell K.D. (Eds.), FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health Press, Paris.
42. Dupouy-Camet J., Kociecka W., Bruschi F., Bolas-Fernandez F., Pozio E. (2002) - Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. Exp. Opin. Pharmacother., 3, 1117-1130.
43. Dupouy-Camet J., Paugam A., De Pinieux G., Lavarde V. and Vieillefond A. (2001) - *Trichinella murrelli*: pathological features in human muscles at different delays after infection. Parasite, 8, S176-S179.
44. Durack D.T., Sumi S.M., Klebanoff S.J. (1979) - Neurotoxicity of human eosinophils. Proc. natl Acad. Sci. USA, 76, 1443-1447.
45. Enemark H.L., Bjorn H., Henriksen S.A., Nielsen B. (2000) - Screening for infection of *Trichinella* in red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. Vet. Parasitol., 88, 229-237.

46. European Community (1964) - Directive 64/433/EEC of 26 June 1964 on health problems affecting intra-Community trade in fresh meat to extend it to the production and marketing of fresh meat, consolidated by Directive 91/497/EEC of 29 July 1991. Off. J. EC, L 268, 69-104, and amended by Directive 95/23/EEC of 11 October 1995. Off. J. EC, L 243, 7-13.
47. European Community (1976) - Directive 77/96/EEC of 21 December 1976 on the examination for trichinae (*Trichinella spiralis*) upon importation from third countries of fresh meat derived from domestic swine. Off. J. EC, L 26, 67-77, amended by Decision 95/1/EC Off. of 1 January 1995. Off. J. EC, L 1, 1-219.
48. European Community (1992) - Directive 92/45/EEC of 16 June on health problems and questions of the communicable disease act in animals concerning hunted wildlife and the commercialization of game meat. Off. J. EC, L 268, 35-53.
49. European Community (2004) - Regulation (EC) No 853/2004 of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. Off. J. EC, L 139, 55-205.
50. European Community (2004). - Regulation (EC) No 854/2004 of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Off. J. EC, L 139, 206-319.
51. European Community (2004) - Regulation (EC) No 882/2004 of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. Off. J. EC, L 165, 1-141.
52. European Community (2005) - Regulation (EC) No 2075/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. Off. J. EC, L 338, 60-82.
53. European Food Safety Authority (2005) - Opinion of the Scientific Panel BIOHAZ on the Request for an opinion on the feasibility of establishing *Trichinella-free* areas, and if feasible on the risk increase to public health of not examining pigs from those areas for *Trichinella* spp. Adopted on 26 October 2005 in Parma.
54. Ferraccioli G.F., Mercadanti M., Salaffi F., Bruschi F., Melissari M., Pozio E. (1988) – Prospective rheumatological study of muscle and joint symptoms during *Trichinella nelsoni* infection. Q. J. Med., 69, 973-984.

55. Forbes L.B., Gajadhar A.A. (1999) - A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. J. Food Protec., 62, 1308-1313.
56. Forbes L.B., Appleyard G.D., Gajadhar 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.
57. Forbes L.B., Scandrett W.B., Gajadhar A.A. (2005) - A programme to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*. Vet. Parasitol., 132, 173-177.
58. Fourestie V., Douceron H., Brugieres P., Ancelle T., Lejonc J.L., Gherardi R.K. (1993) - Neurotrichinosis. A cerebrovascular disease associated with myocardial injury and hypereosinophilia. Brain, 116, 603-616.
59. Froscher W., Gullotta F., Saathoff M., Tackmann W. (1988) - Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. Eur. Neurol., 28, 221-226.
60. Gajadhar A.A., Forbes L.B. (2002) - An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety, with example data on trichinellosis. Vet. Parasitol., 103, 133-140.
61. Gajadhar, A.A., Pozio, E., Gamble, H.R., Nöckler, K., Maddox-Hyttel, C., Forbes, L.B., Vallée, I., Rossi, P., Marinculić, A., Boireau, P. (2009) - *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Vet. Parasitol., 159, 197-205.
62. Gamble H.R. (1996) - Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. J. Food Protec., 59, 295-298.
63. Gamble H.R. (1998) - Sensitivity of artificial digestion and enzyme immunoassay methods of inspection for trichinae in pigs. J. Food Protec., 61, 339-343.
64. Gamble H.R., Anderson W.R., Graham C.E., Murrell K.D. (1983) - Serodiagnosis of swine trichinosis using an excretory-secretory antigen. Vet. Parasitol., 13, 349-361.
65. Gamble H.R., Graham C.E. (1984) - Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. Am. J. Vet. Res., 45, 67-74.
66. Gamble H.R., Patrascu I.V. (1996) - Whole blood, serum and tissue fluids in an EIA for swine trichinellosis. J. Food Protec., 59, 1213-1217.

67. Gamble H.R., Bessonov A.S., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Nockler K., Schenone H., Zhu X. (2000) - International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet Parasitol.*, 93,393-408.
68. Gamble H.R., Brady R.C., Bulaga L.L., Berthoud C.L., Smith W.G., Detweiler L.A., Miller L.E. and Lautner E.A. (1999) - Prevalence and risk factors for trichinellosis in domestic pigs in the northeastern United States. *Vet. Parasitol.*, 82, 59-69.
69. Gamble H.R., Gajadhar A.A., Solomon M.B. (1996) - Methods for the detection of trichinellosis in horses. *J. Food Protec.*, 59, 420-425.
70. Gamble H.R., Pozio E., Bruschi F., Nockler K., Kapel C.M.O., Gajadhar 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.
71. Gerwel C., Kociecka W., Pawlowski Z. (1970) - Parasitological examination of muscle several years after trichinosis. *Przegl. Epidemiol.*, 24, 381-388.
72. Gomez-Morales M.A., Ludovisia 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. Parasit.*, 42, 1017-1023.
73. Gottstein B., Pozio E., Nockler K., (2009) - Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22, 127-145.
74. Guisan A., Broennimann O., Eengler R., Vust M., Yoccoz N.G., Lehman A., Zimmermann N.E. (2006) - Using niche-based models to improve the sampling of rare species. *Conserv. Biol.*, 20, 501-511.
75. Hanbury R.D., Doby P.B., Miller H.O., Murrell K.D. (1986) - Trichinosis in a herd of swine: cannibalism as a major mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188, 1155-1159.
76. Harms G., Binz P., Feldmeier H., et al. (1993) -Trichinosis: a prospective controlled study of patients ten years after acute infection. *Clin. Infect. Dis.*, 17, 637-643.
77. Hill D.E., Forbes L., Kramer M., Gajadhar A., Gamble H.R. (2007) - Larval viability and serological response in horses with long-term *Trichinella spiralis* infection. *Vet. Parasitol.*, 146, 1-2, 107-116.

78. Jacobson E.S., Jacobson H.G. (1977) - Trichinosis in an immunosuppressed human host. Am. J. Clin. Pathol., 68, 791-794.
79. Jakob H.P., Eckert J., Jemmi T., Gottstein B. (1994) - Untersuchungen von Schlacht- und Wildtieren in der Schweiz auf Trichinellose mit der Verdauungsmethode und einem serologischen Verfahren (E/S-ELISA) (Investigations on trichinellosis in slaughter animals and game in Switzerland with a digestion method and a serological approach (E/S-ELISA). Schweiz. Arch. Tierheilkd., 136, 298-308.
80. Jarvis T., Miller I., Pozio E. (2002) - *Trichinella britovi* in domestic pig – a case report. Acta Vet. Scand., 43, 131-134.
81. Jasmer D.P. (1995) - *Trichinella spiralis*: subversion of differentiated mammalian skeletal muscle cells. Parasitol. Today, 11, 185-188.
82. Jongwutiwes S., Chantachum N., Kraivichian P., Siriyasatien P., Putaporntip C., Tamburrini A., La Rosa G., Sreesunpasirikul C, Yingyourd P., Pozio E. (1998) - First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. Clin. Infect. Dis., 26, 111-115.
83. Jovic S., Djordjevic M., Kulisic Z., Pavlovic S., Radenkovic B. (2001) - Infectivity of *Trichinella spiralis* larvae in pork buried in the ground. Parasite, 8, S213-S215.
84. Kapel C.M.O. (2000) - Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. Vet. Parasitol., 93, 262-278.
85. Kapel C.M.O. (2005) - Changes in the EU legislation on *Trichinella* inspection - new challenges in the epidemiology. Vet. Parasitol., 132, 189-194.
86. Kapel C.M.O. (2001) - Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. J. Parasitol., 87, 309-314
87. Kapel C.M.O., Gamble H.R. (2000) - Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. Int. J. Parasitol., 30, 215-221.
88. Kapel C.M.O., Henriksen S.A., Berg T.B., Nansen P. (1995) - *Trichinella* infections in arctic foxes from Greenland: studies and reflections on predilection sites of muscle larvae. J. Helminthol., 69, 325-330.
89. Kapel C.M.O., Webster P. and Gamble R. (2005) - Muscle distribution of sylvatic and domestic *Trichinella* larvae in production animals and wildlife. Vet. Parasitol., 132, 101-105

90. Kapel C.M.O., Webster P., Lind P., Pozio E., Henriksen S.A., Murrell K.D., Nansen P. (1998) - *Trichinella spiralis*, *T. britovi* and *T. nativa*. Infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. *Parasitol. Res.*, 84, 264-271.
91. Kauhala K., Helle, E and Taskinen K. (1993) Home range of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in southern Finland. *J. Zool. Lond.*, 231, 95-106.
92. Khamboonruang C. (1991) - The present status of trichinellosis in Thailand. *Se. Asian J. Trop. Med.*, 22, 312-315.
93. Kociecka W. (2000) - Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.*, 93, 365-383.
94. Krivokapich S.J., Pozio E., Gatti G.M., Gonzalez Prous C.L., Ribicich M., Marucci G., La Rosa G., Confalonieri V. (2012) - *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.*, 42, 10, 903-910.
95. Kurdova R., Müller N., Tsvetkova N., Michov L., Georgieva D., Ivanova M., Gottstein B. (2004) - Characterisation of *Trichinella* isolates from Bulgaria by molecular typing and cross-breeding. *Vet. Parasitol.*, 123, 179-188.
96. La Rosa G., Marucci G., Zarlenga D.S., Casulli A., Zarnke R.L., Pozio E. (2003) - Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella* T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. *Int. J. Parasitol.*, 33, 209-216.
97. La Rosa G., Marucci G., Zarlenga D.S., Pozio E. (2001) - *Trichinella pseudospiralis* populations of the Palearctic region and their relationship with populations of the Nearctic and Australian regions. *Int. J. Parasitol.*, 31, 297-305.
98. Larter N.C., Forbes L.B., Elkin B.T., Allaire D.G. (2011) - Prevalence of *Trichinella* spp. in black bears, grizzly bears, and wolves in the Dehcho Region, Northwest Territories, Canada, including the first report of *T. nativa* in a grizzly bear from Canada. *J. Wildl. Dis.* 47, 745-749.
99. Leiby D.A., Duffy C.H., Murrell K.D., Schad G.A. (1990) - *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission in the rat population. *J. Parasitol.*, 76, 360-364.

100. Leiby D.A., Schad G.A., Duffy C.H., Murrell K.D. (1988) - *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: III. Epidemiological investigations of *Trichinella spiralis* in resident wild and feral animals. J. Wildl. Dis., 24, 606-609.
101. Leclair D., Forbes L.B., Suppa S., Gajadhar A.A. (2003) - Evaluation of a digestion assay and determination of sample size and tissue for the reliable detection of *Trichinella* larvae in walrus meat. J. Vet. Diagn. Invest., 15, 188-191.
102. Liu M., Boireau P. (2002) - Trichinellosis in China: epidemiology and control. Trends Parasitol., 18, 553-556.
103. Louthrenoo W., Mahanuphab P., Sanguanmitra P., Thamprasert K. (1993) - Trichinosis mimicking polymyositis in a patient with human immunodeficiency virus infection. British J. Rheumatol., 32, 1025-1026.
104. Mac Lean J.P., Viallet J., Law C., Stuart M. (1989) - Trichinosis in the Canadian Arctic: report of five outbreaks and a new clinical syndrome. J. Infect. Dis., 160, 513-520.
105. Malakauskas A., Paulauskas V., Jarvis T., Keidans P., Eddi C., Kapel C.M. (2007) - Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. in three Baltic countries: Lithuania, Latvia, and Estonia. Parasitol. Res., 100, 687-693.
106. Malczewska M., Malczewski A., Rocki B., Cabaj W. (1997) - The red fox (*Vulpes vulpes*) as reservoir of *Trichinella* sp. in Poland. Wiadom. Parazytol., 43, 303-306.
107. Masuoka P. M., Burke R., Colaccico M., Razuri H., Hill D., Murrell K. D. (2009) - Predicted geographic ranges for north American sylvatic *Trichinella* species. American Society of Parasitologists, J. Parasitol., 95, 4, 829-837
108. Moller L.N., Petersen E., Gamble R., Kapel C.M.O. (2005) - Comparison of two antigen for demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluids of foxes, pigs and wild boars. Vet. Parasitol., 132, 81-84.
109. Murrell K.D., Anderson W.R., Schad G.A., Hanbury R.D., Kazacos K.R., Gamble H.R., Brown J. (1986) - Field evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinellosis: efficacy of the excretory-secretory antigen. Am. J. Vet. Res., 47, 1046-1049.
110. Murrell K.D., Bruschi F. (1994) - Clinical trichinellosis. In Progress in clinical parasitology (T. Sun, ed.). CRC Press, Boca Raton, 117-150.

111. Murrell K.D., Djordjevic M., Cuperlovic K., Sofronic L, Savic M., Djordjevic M., Damjanovic S. (2004) - Epidemiology of *Trichinella* infection in the horse: the risk from animal product feeding practices. *Vet. Parasitol.*, 123, 223-233.
112. Murrell K.D., Lichtenfels R., Zarlenga D., Pozio E. (2000) - The systematics of *Trichinella* with a key to the species. *Vet. Parasitol.*, 93, 293-307.
113. Murrell, K.D., Pozio, E. (2011) - Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 2194-2202.
114. Murrell K.D., Stringfellow F., Dame J.B., Leiby D.A., Duffy C., Schad G.S. (1987) - *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: II. Evidence for natural transmission of *Trichinella spiralis spiralis* from domestic swine to wildlife. *J. Parasitol.*, 73 103-109.
115. Nelson G.S. (1970) - Trichinosis in Africa. *In: Trichinosis in man and animals* (S.E. Gould, ed.). C.C. Thomas Publisher, Springfield, 473-492.
116. Nelson G.S., Blackie E.J., Mukundi J. (1966) - Comparative studies on geographical strains of *Trichinella spiralis*. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.*, 60, 471-480.
117. Nockler K., Voigt W.P. (1997) - Experimental *Trichinella spiralis* infection in the silver fox (*Vulpes vulpes fuviva*). *In Trichinellosis. 9th Int. Conf. on Trichinellosis* (G. Ortega-Pierres, H.R. Gamble, F. van Knapen & D. Wakelin, eds). Germar Press, Nonoalco Tlateloco, Mexico, 319-323.
118. Nockler K., Hamidi A., Fries R., Heidrich J., Beck R., Marinculic A. (2004) - Influence of methods for *Trichinella* detection in pigs from endemic and non-endemic European region. *J. Vet. Med. B*, 51, 297-301.
119. Nockler K., Kapel C.M.O. (2007) - Detection of *Trichinella*, meat inspection and Hygiene, legislation. *In: Dupouy-Camet, J., Murrell, K.D. (Eds.), FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health Press, Paris, 61-98.*
120. Nockler K., Pozio E., Voigt W.P., Heidrich J. (2000) - Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.*, 93, 335-350.
121. Nockler K., Serrano Aguilera F.J., Boireau P., Kapel C.M.O., Pozio E. (2005) - Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.*, 132, 85-90.

122. Nockler K., Voigt W.P., Protz D., Miko A., Ziedler K. (1995) - Intravitale Diagnostik der Trichinellose beim Schwein mit dem indirekten ELISA (Indirect ELISA for the diagnosis of trichinellosis in living pigs). Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 108, 167-174.
123. Oivanen L., Kapel C.M., Pozio E., La Rosa G., Mikkonen T., Sukura A. (2002) - Associations between *Trichinella* species and host species in Finland. J. Parasitol. 88, 84–88.
124. Oliver D.G., Singh P., Allison D.E., Murrell K.D. and Gamble H.R. (1989) - Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of hogs in a high volume North Carolina abattoir. In Trichinellosis (C.E. Tanner, ed.). Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press, Madrid, 439-444.
125. Ortega Pierres M.G., Arriaga C., Yepez-Mulia L. (2000) - Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. Vet. Parasitol., 93, 201-225.
126. Ortega Pierres M.G., Yepez-Mulia L., Homan W., Gamble H.R., Lim P.L., Takahashi Y., Wasson D.I., 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.
127. Owen I.L, Gomez Morales M.A., Pezzotti P., Pozio E. (2005) - *Trichinella* infection in a hunting population of Papua New Guinea suggests an ancient relationship between *Trichinella* and human beings. T. Roy. Soc. Trop. Med. H., 99, 618-624.
128. Paolucci N., Sironi M., Bettini M., Bandi C, Magni F. and Bruschi F. (1998) – Immunopathological mechanisms underlying the time course of *Trichinella spiralis* cardiomyopathy in rats. Virchows Arch., 432, 261-266.
129. Patrascu I.V., Gamble H.R., Sofronic-Milosavljevic Lj., Radulescu R., Andrei A., Ionescu V., Timocanu V., Boireau P., Cuperlovic K., Djordjevic M., Murrell K.D., Nockler K., Pozio E. (2001) - The Lateral Flow Card Test: an alternative method for the detection of *Trichinella* infection in swine. Parasite, 8, 240-242.
130. Pawlowski Z.S. (1983) - Clinical aspects in man. In *Trichinella* and trichinosis (W.C. Campbell, ed.), Plenum Press, New York and London, 367-401.
131. Pérez-Martín J.E., Serrano F.J., Reina D., Mora J.A., Navarrete I. (2000) - Sylvatic trichinellosis in southwestern Spain. J. Wildl. Dis., 36, 531-534.

132. Petkova S., Mihov L., Vutova K., Tsenov I., La Rosa G., Pozio E. (2008) - Epidemiological and clinical patterns of trichinellosis in Bulgaria from 1995 to 2002. *Parasite*, 15, 86-88.
133. Petrov D.V., Skvortsova F.K., Bessonov A.S., Uspensky A.V. (1999) - *Trichinella pseudospiralis* trichinellosis of poultry: the veterinary-sanitary inspection of carcasses. Abstracts of the 17th International Conference of the WAAVP in Copenhagen, 15-19 August.
134. Pinelli E., van der Lugt G., Homan W., van der Giessen J., Kortbeek L.M. (2001) - Antigen recognition by IgG4 antibodies in human trichinellosis. *Parasite*, 8, S 168-S171.
135. Plavsic B., Nedic D., Micovic Z., Stanojevic S., Asanin R., Krnjajic D., Tajdic N., Milanovic S. (2009) - Veterinary information management system (VIMS) in the process of notification and management of animal diseases. *Acta Vet-Beograd*, 59, 99-108.
136. Polvere R.I., Kabbash C.A., Capo V.A., Kadan I. and Despommier D.D. (1997) - *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Exp. Parasitol.*, 86, 191-199.
137. Pozio E. (2001a) - New patterns of *Trichinella* infection. *Vet. Parasitol.*, 98, 133-148.
138. Pozio E. (2007) - Taxonomy, biology and epidemiology of trichinella parasites. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis, FAO/WHO/OIE, 31-35.
139. Pozio E. (2001b) - Taxonomy of *Trichinella* and the epidemiology of infection in the Southeast Asia and Australian regions. *Se. Asian J. Trop. Med.*, 32 (S2), 129-132.
140. Pozio E. (2005) - The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold to warm blooded animals. *Vet. Parasitol.*, 132, 3-11.
141. Pozio E. (1998) - Trichinellosis in the European Union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitol. Today*, 14, 35-38.
142. Pozio E., Celano G.V., Sacchi L, Pavia C, Rossi P., Tamburrini A., Corona S., La Rosa G. (1998) - Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in muscles from a naturally infected horse. *Vet. Parasitol.*, 74, 19-27.

143. Pozio E., Cossu P., Marucci G., Amati M., Ludovisi A., Gomez Morales M.A., La Rosa G., Firinu T. (2009a) - The birth of a *Trichinella britovi* focus on the Mediterranean island of Sardinia (Italy). *Vet. Parasitol.*, 159, 3-4, 361-363.
144. Pozio E., Foggin C.M., Gelanew T., Marucci G., Hailu A., Rossi P., Gomez Morales M.A. (2007) - *Trichinella zimbabwensis* in wild reptiles of Zimbabwe and Mozambique and in farmed reptiles of Ethiopia. *Vet. Parasitol.*, 143, 3-4, 305-310.
145. Pozio E., Hoberg E., La Rosa G., Zarlenga D.S. (2009b) - Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect. Genet. Evol.*, 9, 606-616.
146. Pozio E., La Rosa G. (1998) - Identification of the likely etiological agent of human trichinellosis in Sicily (Italy) between 1933 and 1946. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59, 906-907.
147. Pozio E., La Rosa G., Murrell K.D., Lichtenfels J.R. (1992) - Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *J. Parasitol.*, 78, 654-659.
148. Pozio E., Rinaldi L., Marucci G., Musella V., Galati F., Cringoli G., Boireau P., La Rosa G., (2009c) - Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *Int. J. Parasit.*, 39, 1, 71-79.
149. Pozio E., Mesina P., Sechi F., Pira M., Liciardi M., Cossu P., Marucci G., Garippa G., Firinu A. (2006) - Human outbreak of trichinellosis in the Mediterranean island of Sardinia, Italy. *Vet. Parasitol.*, 140, 177-180.
150. Pozio E., Murrell K.D. (2006) - Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv. Parasitol.*, 63, 368-439.
151. Pozio E., Owen I.L., Marucci G., La Rosa G. (2005) - Inappropriate feeding practice favors the transmission of *Trichinella papuae* from wild pigs to saltwater crocodiles in Papua New Guinea. *Vet. Parasitol.*, 127, 245-251.
152. 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.
153. Pozio E., Rossi P. (2008) - Guidelines for the identification and development of sampling methods and design of suitable protocols for monitoring of *Trichinella* infection in indicator species. *Ann.Ist.Super.Sanita*, 44, 02, 200-204.

154. Pozio E., Sofronic-Milosavljevic L., Gomez Morales M.A., Boireau P., Nockler K. (2002) - Evaluation of ELISA and western blot analysis using three antigens to detect anti- *Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.*, 108, 2, 163-178.
155. Pozio E., Tamburrini A., Sacchi L., Gomez Morales M.A., Corona S., Goffredo E. and La Rosa G. (1997) - Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. *Int. J. Parasitol.*, 27, 1613-1621.
156. Pozio E., Varese P., Gomez-Morales M.A., Croppo G.P., Pelliccia D., Bruschi F. (1993) - Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 48, 568-575.
157. Pozio E., Zarlenga D.S. (2005) - Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.*, 35, 1191-1204.
158. Pozio E., Zarlenga DS. (2013) New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int. J. Parasit.*, 2013 Jun 28. doi:pii: S0020-7519(13)00156-2.)
159. Pravilnik o merama za suzbijanje trihineloze životinja Pravilnik je objavljen u "Službenom listu SRJ", br. 20/95.
160. Proulx J.F., MacLean J.D., Gyorkos T.W., Leclair D., Richter A.K., Serhir B., Forbes L. and Gajadhar A. (2002) - Novel prevention program for trichinellosis in inuit communities. *Clin. Infect. Dis.*, 34, 1508-1514.
161. Rafter P., Marucci G., Brangan P. and Pozio E. (2005) - Rediscovery of *Trichinella spiralis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Ireland after 30 years of oblivion. *J. Infect.*, 50, 61-65.
162. Ramisz A., Szymborski J., Balicka-Ramisz A. (2001) - Epidemiological studies on trichinellosis among swine, wild boars and humans in Poland. *Parasite*, 8 (2S), S90-S91.
163. Ranque S., Faugere B., Pozio E. *et al.* (2000) - *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. *Emerg. Infect. Dis.*, 6, 543-547.
164. Rausch R. L., George J.C., Brower H.K. (2007) - Effect of climatic warming on the Pacific Walrus, and potential modification of its helminth fauna. *J. Parasitol.*, 93, 1247-1251.
165. Reason A.J., Ellis L.A., Appleton J.A., Wisnewski N., Grieve R.B., McNeil M., Wassom D.L, Morris H.R., Dell A. (1994) - Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*, 4, 593-603.

166. Ribicich M., Gamble H.R., Rosa A., Bolpe J., Franco A. (2005) - Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet. Parasitol.*, 132,137-142
167. Rodríguez de las Parras E., Rodríguez-Ferrer M., Nieto-Martínez J., Ubeira F.M., Gárate-Ormaechea T. (2004) - Trichinellosis outbreaks in Spain (1990–2001). *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22, 70-76. (in Spanish)
168. Romig T., Thoma D., Weible A.K. (2006) - *Echinococcus multilocularis* a zoonosis of anthropogenic environments? *J. Helminthol.*, 80, 207-212.
169. Root T.L., Price J.T., Hall K.R., Schneider S.H., Rosenzweig C., Pounds J.A. (2003) - Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57-60.
170. Rosenthal B.M., La Rosa G., Zarlenga D., Dunams D., Chunyu Y., Mingyuan L., Pozio E. (2008) - Human dispersal of *Trichinella spiralis* in domesticated pigs. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 6, 799-805.
171. Ruitenbergh E.J., van Knapen F. (1977) - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a diagnostic method for *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Vet. Parasitol.*, 3, 317-326.
172. Ruitenbergh E.J., Steerenberg P.A., Brosi B.J., Buys J. (1974) - Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bull. WHO*, 51, 108-109.
173. Ruitenbergh E.J., Steerenberg P.A., Brosi B.J.M., Buys J. (1976) - Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in conventionally raised pigs. *J. Immunol. Meth.*, 10, 67-83.
174. Schad G.A., Duffy C.H., Leiby D.A., Murrell K.D., Zirkle E.W. (1987) - *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission under natural and experimentally modified on-farm conditions. *J. Parasitol.*, 73, 93-102.
175. Schellenberg R.S., Tan B.J., Irvine J.D., Stockdale D.R., Gajadhar AA, Serhir B., Botha J., Armstrong C.A., Woods S.A., Blondeau J.M., McNab T.L. (2003) - An outbreak of trichinellosis due to consumption of bear meat infected with *Trichinella nativa* in 2 northern Saskatchewan communities. *J. Infect. Dis.*, 188, 835-843.
176. Shaikenov B.S., Boev S.N. (1983) - Distribution of *Trichinella* species in the old world. *Wiadom. Parazytol.*, 29, 595-608.
177. Schipper J., J. S. Chanson, F. Chiozza, N. A. Cox, M. Hoffmann, V. Katariya, J. Lamoreux, A. S. L. Rodrigues, S. N. Stuart, H. J. Temple *et al.* (2008) - The status of

- the world's land and marine mammals: Diversity, threat, and knowledge. *Science*, 322, 225-230.
178. Schynts F., Giessen J.V., Tixhon S., Pozio E., Dorny P., de Borchgrave J. (2006) - First isolation of *Trichinella britovi* from a wild boar (*Sus scrota*) in Belgium. *Vet. Parasitol.*, 135, 191-194.
179. Smith H.J. (1987) - Evaluation of the ELISA for the serological diagnosis of trichinosis in Canadian swine. *Can. J. Vet. Res.*, 51, 194-197.
180. Smith H.J., Snowdon K.E. (1989) - Comparative assessment of a double antibody enzyme immunoassay test kit and a triple antibody enzyme immunoassay for the diagnosis of *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis nativa*. *Can. J. Vet. Res.*, 53, 497-499.
181. Smith R.D. (1991) - *Clinical veterinary epidemiology*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, p. 223.
182. Sofronic-Milosavljevic Lj., Djordjevic M., Plavsic B., Grgic B. (2013) - *Trichinella* infection in Serbia in the first decade of the twenty-first century. *Vet. Parasitol.*, 194, 136-138.
183. Sofronic-Milosavljevic Lj, Ilic N, Djordjevic M, Savic M, Gruden-Movsesijan A, Cuperlovic K, Murrell KD. (2005) - Anti-*Trichinella* antibodies detected in chronically infected horses by IFA and Western blot, but not by ELISA. *Vet. Parasitol.*, 132, 1-2, 107-111.
184. Soule C., Dupouy-Camet J., Georges P., Ancelle T., Giliet J.P., Valsaire J., Delvigne A., Plateau E. (1989) - Experimental trichinellosis In horses: biological and parasitological evaluation. *Vet. Parasitol.*, 31, 19-36.
185. Soule C., Dupouy-Camet J., Georges P., Fontaine J J., Ancelle T., Delvigne A., Perret C., Collobert C. (1993) - Biological and parasitic variations in horses infested and reinfested by *Trichinella spiralis*. *Vet. Res.*, 24, 21-31.
186. Stewart T. (2003) - Detailed Taxonomy of the Parasitic Helminthes, Division of Microbiology and Parasitology, University of Cambridge (<http://www.path.com.uk/schisto/homepage.html>)
187. Taylor S.M., Kenny T., Mallon T., Davidson W.B. (1980) - The micro-ELISA for antibodies to *Trichinella spiralis*: elimination of false positive reactions by antigen

- fractionation and technical improvements. Zentralbl. Veterinärmed. B., 27, 9-10, 764-772.
188. Takahashi Y., Mingyuan L and Waikagul J. (2000) - Epidemiology of trichinellosis in Asia and Pacific Rim. Vet. Parasitol., 93, 227-239.
189. Thiess A., Schuster R., Nockler K., Mix H. (2001) - Helminthenfunde beim einheimischen Marderhund *Nyctereutes procyonoides* (Gray, 1834). Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., 114, 273-276.
190. Tesic M., Teodorovic V., Mirilovic M., Dimitrijevic M., Nedic D., Zivojinovic M., Stojiljkovic Lj. (2012) - Effects of the application of the trichinellosis control program in the endemic part of Serbia, Biological Food Safety and Quality-Proceedings of the International Conference, Belgrade, Serbia, 78-80.
191. Teodorović V., Bunčić, O., Kulišić Z., Radenković-Damnjanović B., Teodorović R., Đorđević M., Mirilović M. (2007): *Trichinella* - Trichinellosis. Naučna KMD d.o.o., Beograd, s. 47-59.
192. Van der Giessen J.W.B., Rombout Y., van der Veen A., Pozio E. (2001) - Diagnosis and epidemiology of *Trichinella* infections in wildlife in the Netherlands. Parasite, 8 (2S), S103-S105.
193. Van der Leek M.L., Dame J.B., Adams C.L, Gillis K.D., Littell R.C. (1992) - Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of trichinellosis in swine. Am. J. Vet. Res., 53, 877-882.
194. Virchow R. (1864) - Darstellung der Lehre von den Trichinen mit Rucksicht auf die dadurch gebotenen Vorsichtsma regeln, fur Laien und Arzte (Teaching on trichinae with regard to preventive measures for layman and physician). G. Reimer Verlag, Berlin.
195. Voigt W.P., Nockler K., Freischem B., Henriksen S.A., van Knapen F., Martinez-Fernandez F., Pfeiffer G., Pozio E., Reuter G., Ring C., Soule C., Weiss H. (1997) - Detection of low levels of *Trichinella spiralis* in experimentally infected horses. In Trichinellosis. In Trichinellosis. 9th Int. Conf. on Trichinellosis (G. Ortega-Pierres, H.R. Gamble, F. van Knapen & D. Wakelin, eds). Germar Press, Nonoalco Tlateloco, Mexico, 289-292.

196. Wacker K., Rodriguez E., Garate T., Geue L., Tackmann K., Selhorst T., Staubach C., Conraths F.J. (1999) - Epidemiological analysis of *Trichinella spiralis* infections of foxes in Brandenburg, Germany. *Epidemiol. Infect.*, 123, 139-147.
197. Watanabe N., Bruschi F., Korenaga M. (2005) - IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends Parasitol.*, 21, 175-178.
198. Webster P., Maddox-Hyttel C, Nockler K., Malakauskas A., van der Giessen J., Pozio E., Boireau P., Kapel C.M.O. (2006) - Meat inspection for *Trichinella* in pork, horsemeat and game within EU: available technology and its present implementation. *Euro. Surveill.*, 11, 1, 50-55.
199. Wisniewski N., McNeil M., Grieve R.B., Wassom D.L. (1993) - Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 61, 1, 25-35.
200. Yera H., Andiva S., Ferret C., Limonne D., Boireau P., Dupouy-Camet J. (2003) - Development and evaluation of a western blot kit for the diagnosis of human trichinellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10, 5, 739-796.
201. Zarlenga D.S., G. La Rosa (2000) - Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within genus *Trichinella*. *Vet. Parasitol.*, 93, 3-4, 279-292.
202. Zarlenga D. S., M. B. Chute, A. Martin and C. M. Kapel (1999) - A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.*, 29, 1859-1867.
203. Zarlenga D.S., Rosenthal B., La Rosa G., Pozio E. and Hoberg E.P. (2006) - An old genus learned new tricks: late Tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among Eutheria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 7354-7359.
204. Zimmer I.A., Hunter S.J., Morgan C.P., Hunt K.R., Smith G.C., Howell M., Taylor M.A. (2008) - Detection and surveillance for animal trichinellosis in GB. *Vet. Parasitol.*, 151, 233-241.
205. Zivojinovic M., Dimitrijevic G., Lazic M., Petrovic M., Sofronic-Milosavljevic Lj. (2009) - *Trichinella* prevalence in swine in an endemic district in Serbia: Epidemiology and control. *Vet. Parasitol.*, 159, 358-360.
206. Zivojinovic M., Sofronic-Milosavljevic Lj., Cvetkovic J., Dobrosavljevic I., Lazic M., Plavsic B., Radojicic S., Kulisic Z. (2012) - *Trichinella* species in wild animals at

epizootiological area of VSI Pozarevac. 2nd International epizootiology days 2012, 163-164, Belgrade, Serbia.

207. Zivojinovic M., Sofronic-Milosavljevic Lj., Cvetkovic J., Pozio E., Interisano M., Plavsic B., Radojicic S., Kulisic Z. (2013) - *Trichinella* infections in different host species of an endemic district of Serbia. Vet. Parasitol., 194, 136-138.

208. Zivojinovic, M., Sofronic-Milosavljevic, Lj., Radojicic, S., Kulisic, Z. (2010) - Application of GIS in epizootiological surveillance of swine trichinellosis in one endemic district in Serbia. Parasite, 17, 369-373.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: **Милена Ж. Живојиновић**

број уписа _____

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Епизоотиолошка, серолошка и молекуларна истраживања врста рода
Trichinella

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.11.2013.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Милена Ж. Живојиновић**

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада:

**Епизоотиолошка, серолошка и молекуларна истраживања врста рода
*Trichinella***

Ментор: Проф. др Зоран Кулишић

Потписани: Милена Ж. Живојиновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 01.11.2013.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Епизоотиолошка, серолошка и молекуларна истраживања врста рода *Trichinella*

која је моје ауторско дело.

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


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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 01.11.2013.



БИОГРАФИЈА АУТОРА

Милена Живојиновић је рођена 20.02.1970. године у Пожаревцу, Србија. Дипломирала је 12.07.1994. године на Факултету ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, са просечном оценом 8,02.

Академско звање магистра ветеринарских наука стекла је 23.11.2001. године, на Катедри за заразне болести животиња и болести пчела, Факултета ветеринарске медицине, Универзитета у Београду. У звање истраживач-сарадник изабрана је 23.11.2010. године.

Запослена је у Ветеринарском специјалистичком институту “Пожаревац”- Пожаревац, као сарадник на епизоотиологији од 1994. године. Од 2001. године налази се на месту шефа одељења за епизоотиологију ВСИ Пожаревац. Од 2005. обавља и послове менаџера квалитета у складу са стандардима ISO 9001:2008 и SRPS ISO/IEC 17025:2006 за целокупни институт.

Научно-истраживачка активност Милене Живојиновић везана је за епизоотиолошко-епидемиолошка истраживања заразних болести животиња и зооноза. Посебна област јесте истраживање присуства врста рода *Trichinella* у популацији домаћих и дивљих животиња. У току усавршавања издвајају се следеће обуке:

Основи ветеринарске епидемиологије, у трајању од 2 недеље 2004. године (Denver, Colorado, USA).

Surveillance and Risk Assessment for TSE, SAFOSO, Bern, Swicerland, 4 недеље 2004. године.

Workshop on Epidemiology and GIS/GPS Methods, FAO, MPSV Serbia, 2008. године, Краљево, Србија.

Боравак и рад у Референтној лабораторији ЕУ за паразитологију у Риму, Италија 2010. године у трајању од 5 дана.

Workshop on Control, monitoring and diagnosis of *Trichinella* and other parasitic foodborne diseases, Загреб, Хрватска 2011. године.

Учествовање по позиву, на радионици NRL за трихинелозу 2012. године у Референтној лабораторији ЕУ за паразитологију у Риму.

Introduction to Risk Assessment, (Denver, Colorado, USA), 7 дана 2012. године.