

Przydatność ELISA do diagnozowania włośnicy u świń i dzików*

The usefulness of ELISA for diagnosis of trichinellosis in pigs and wild boars

J. Bień

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa; E-mail: jbien@twarda.pan.pl

ABSTRACT. ELISA can be used to measure produced antibodies or *Trichinella* spp. antigens in the samples. They are detected with antibodies linked to an enzyme that reacts with a substrate and generate a colour reaction. The optical density (OD) of the reaction is measured spectrophotometrically. ELISA assays can be done in several different procedures called „direct”, "indirect", "sandwich", and "competition" ELISA.

Since the 1970s, the studies have been done on improving or replacing direct methods of *Trichinella* diagnosis with serological methods based on the ELISA. When somatic antigens of L1 *T. spiralis* were used, the specificity of the ELISA was poor due to a high probability of cross-reactions with other pathogens. During the 1980s the specificity of the ELISA was improved by excretory-secretory (E/S) antigens obtained during *Trichinella* muscle larvae incubation *in vitro*. Recently a synthetic glycan antigen has been developed and the increasing of ELISA specificity and sensitivity was noticed. The sensitivity of the ELISA using an E/S antigen ranging from 93.1 to 99.2% but the specificity from 90.6 to 99.4%.

The ELISA method is relatively simple to apply, reliable, readily standardized and provides an acceptable balance of sensitivity and specificity. But all modified procedures should be validated.

In Poland, the studies on the usefulness of ELISA for antibodies detection against *T. spiralis* in pigs and wild animals are limited. Own ELISA procedure was prepared in Pathophysiology Lab. in W. Stefański Institute of Parasitology of PAS.

ELISA was used to examine IgG level against L1 *T. spiralis* in pigs and wild boars serum samples. Of 1474 pig samples, only 12 were positive. Of 1880 wild boar samples only 14 were positive.

The results of this study are comparable with performance obtained using commercial sets. The results showed the usefulness of ELISA for *T. spiralis* diagnosis in pigs and wild boars and confirmed the possibility of use the ELISA test for application in the slaughterhouse.

Key words: antigens, ELISA, *Trichinella*.

Wstęp

Test immunoenzymatyczny ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), jest jednym z najczęściej stosowanych testów w badaniach naukowych. Służy on do wykrywania określonych białek (antygenów i przeciwciał) w badanym materiale z uży-

ciem przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych koniugowanych z odpowiednim enzymem. Zasada działania testu ELISA polega na tym, że przeciwciało związane z określonym enzymem może specyficznie rozpoznawać dane białko (zawarte w materiale biologicznym), które wcześniej zostało zaadsorbowane do powierzchni płytki. Po dodaniu

*Badania własne wykonano w ramach grantu Nr 2 PO6K 05126

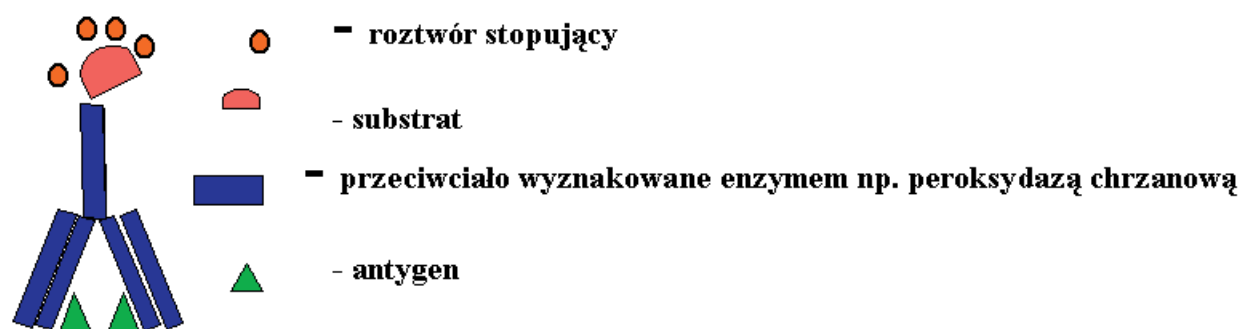
przeciwciał następuje utworzenie kompleksów immunologicznych, a po dodaniu substratu dla enzymu związanego z przeciwciałem zachodzi reakcja barwna świadcząca o obecności w danym materiale badanego białka. Niezależnie od rodzaju przeprowadzanego badania, każdy test immunoenzymatyczny wymaga opłaszczenia przeciwciałami lub antygenami 96-dołkowej płytki polistyrenowej lub pleksiglasowej, która jest później inkubowana. Czas inkubacji oraz temperatura zależą od rodzaju badania [1-7]. W celu uniknięcia niespecyficznego przyłączania się innych białek zwykle blokuje się miejsca niezajęte przez przeciwciało lub antygen poprzez dodanie np. roztworu owoalbuminy lub odtłuszczonego mleka [2].

Rodzaje ELISA

W badaniach wykorzystuje się wiele odmian ELISA: test podwójnego wiązania (sandwicz ELISA), bezpośredni i pośredni test ELISA (direct i in-

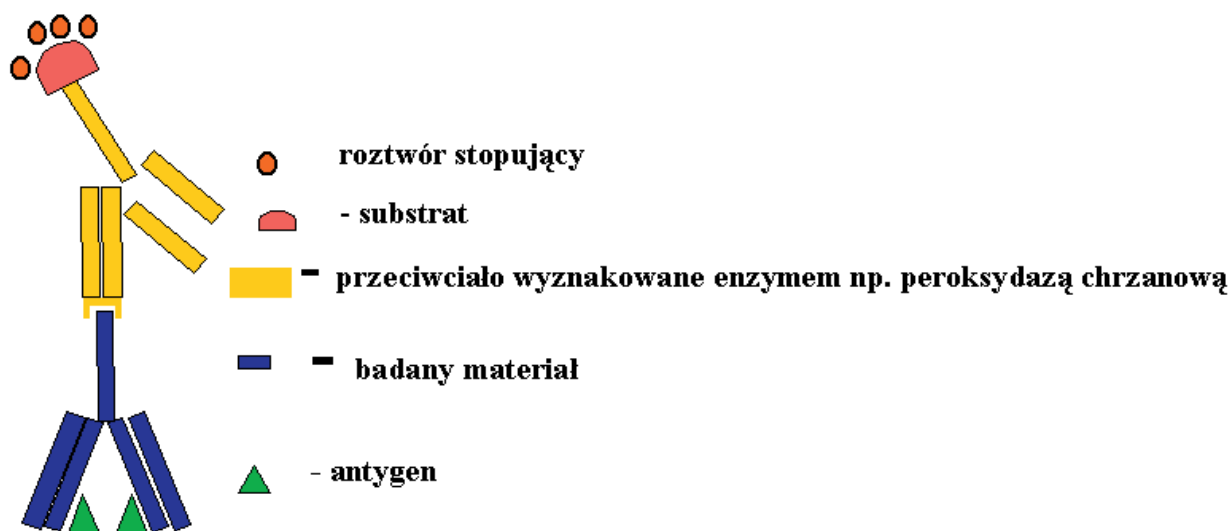
direct ELISA), kompetycyjny test ELISA (c -ELISA), dot-ELISA [8, 9].

Test podwójnego wiązania (sandwicz ELISA) służy do określania stężenia danego białka (antygenu) w badanej próbce. Nazwa testu „kanapkowa” ELISA wynika z faktu, że antygen wiązany jest pomiędzy dwiema „warstwami” przeciwciał. W teście podwójnego wiązania, antygen po związaniu przez specyficzne przeciwciała umieszczone na płytce jest wykrywany przez kolejne przeciwciało, które związane jest ze znacznikiem (enzymem). Wykrywanie antygeny za pomocą jednego tylko swoistego przeciwciała wyznakowanego enzymem nazywamy bezpośrednim testem ELISA (direct ELISA) (Rys. 1). Oznaczenie każdego antygeny wymaga przygotowania innych znakowanych swoistych przeciwciał, co jest kosztowne i nie zawsze możliwe do wykonania. W teście pośrednim ELISA (Rys. 2) — przeciwciała obecne w badanym materiale reagują z antygenem zaadsorbowanym na powierzchni płytki. Przeciwciała obecne w surowicy po związaniu



Rys. 1. Schemat testu bezpośredniego ELISA (direct ELISA)

Fig. 1. Direct ELISA



Rys. 2. Schemat testu pośredniego ELISA (indirect ELISA)

Fig. 2. Indirect ELISA

z antygenem wykrywane są przez inne przeciwciała wyznakowane enzymem. W kompetycyjnych (rywalizacyjnych) testach ELISA (c-ELISA — competitive ELISA) wykorzystuje się mieszaninę standaryzowanego, wyznakowanego antygeny lub przeciwciała, dodawanych do badanego materiału. Jeśli na opłaszczoną odpowiednim antygenem płytkę podziałamy mieszaniną badanej surowicy i specyficznego względem danego antygeny przeciwciała wyznakowanego enzymem, to nastąpi współzawodnictwo pomiędzy przeciwciałami w surowicy a przeciwciałem znakowanym. Natężenie reakcji enzymatycznej jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia przeciwciał w surowicy. Im większe jest stężenie przeciwciał w badanej surowicy, tym mniej znakowanego przeciwciała przyłączy się do antygeny. Stosowana jest również alternatywna metoda, w której płytka opłaszczona jest przeciwciałem, a rywalizacja o miejsca wiążące przeciwciała zachodzi między standaryzowanym, wyznakowanym antygenem a antygenem zawartym w badanym materiale [8].

Zastosowanie ELISA

ELISA jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod służących do wykrywania przeciwciał przeciw *Trichinella* spp. u ludzi i zwierząt. Do najważniejszych zalet testu zaliczamy: szybkość procedury, niezawodność, łatwość przeprowadzenia optymalizacji. Jest metodą rekomendowaną przez Office International des Epizootie (OIE) [10] do testowania surowic świń w kierunku obecności specyficznych przeciwciał przeciw nicieniom z rodzaju *Trichinella* [11]. Dzięki zastosowaniu tej metody, możliwe jest wykrycie zarażenia o intensywności 1 larwy na 100 g tkanki mięśniowej [3, 11, 12].

Prowadzone od wielu lat kompleksowe badania immunologiczne, biochemiczne oraz molekularne przyczyniły się do postępu w wykrywaniu nicieni z rodzaju *Trichinella*. Badania nad diagnozowaniem włośnicy opierają się przede wszystkim na wykrywaniu antygeny krążącego, krążących kompleksów immunologicznych oraz przeciwciał.

Badania polegające na wykrywaniu antygeny krążącego nie są zbyt powszechnie stosowane w diagnozowaniu włośnicy, chociaż ich wyniki są bezpośrednim dowodem obecności pasożyta. Trudności w wykrywaniu antygeny *Trichinella* spp. we wczesnej fazie zarażenia związane są z ich niskim poziomem w surowicy oraz tworzeniem się kompleksów immunologicznych z powodu dużej ilości

przeciwciał. Skuteczność wykrywania antygeny została znacznie podwyższona dzięki opracowaniu modyfikacji metody ELISA, dot-ELISA [9]. Zastosowanie dot-ELISA, jednej z najskuteczniejszych technik immunologicznych, pozwala na wykrycie minimalnych ilości antygeny *Trichinella* nawet we wczesnym okresie zarażenia.

Metoda ELISA znalazła szerokie zastosowanie w wykrywaniu koproantygeny innych pasożytów, np. pierwotniaków [13-18], przywr [19, 20] czy tasiemców [21-23]. Natomiast nie znalazła większego zastosowania do diagnozowania koproantygeny *T. spiralis*. Tylko nieliczne badania, np. Boulosa i wsp. [24], wykazały obecność koproantygeny *T. spiralis* już pierwszego dnia po zarażeniu, a wysoki ich poziom utrzymywał się do trzeciego tygodnia po zarażeniu.

Wykrywanie przeciwciał jest, w porównaniu z wykrywaniem antygeny, metodą bardziej czułą, umożliwiającą właściwą diagnostykę włośnicy. Ocena zmian poziomu przeciwciał w inwazji nicieni z rodzaju *Trichinella* była przedmiotem wielu badań [25-28]. Wykazano między innymi, że pojawienie się różnych klas przeciwciał w przebiegu włośnicy jest niejednakowe w czasie, a poziomy często nieporównywalne. Poziom przeciwciał, a tym samym możliwość ich wykrywania, są uzależnione od gatunku włośnia, intensywności inwazji, różnej fazy zarażenia, a co się z tym wiąże, różnym okresem, w którym rozpoczęto badania serologiczne. W inwazji pasożytniczej wywołanej przez włośnie mamy do czynienia ze stymulacją antygenową, związaną z dłuższym przebywaniem pasożyta w organizmie żywiciela, co w sposób ciągły i fazowy powoduje mobilizację układu immunologicznego do produkcji przeciwciał [29]. Okres po zarażeniu, w którym można stwierdzić obecność przeciwciał w surowicy krwi, jest związany z gatunkiem żywiciela. Jednak najistotniejsza jest czułość stosowanego testu oraz stosowane w tym systemie antygeny detekcyjne.

Uważa się, że wykorzystanie ELISA do diagnozowania inwazji włośni u świń z użyciem antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego (E/S), jest możliwe pod warunkiem, że upłynęło wystarczająco dużo czasu, aby u zarażonych zwierząt mogła rozwinąć się odpowiedź immunologiczna [11]. Czułość ELISA przy zastosowaniu antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego w wykrywaniu przeciwciał w surowicy świń szacowana jest na 93,1-99,2%, natomiast specyficzność wynosi 90,6-99,4% [11]. Pojawianie się przeciwciał przeciw *T. spiralis* we krwi jest bezpośrednim

dnio skorelowane z poziomem zarażenia. W przypadku niskiej inwazji (mniej niż 1 larwa/g tkanki mięśniowej) obecność przeciwciał nie jest wykrywana wcześniej niż w 4-7 tygodniu po zarażeniu [3]. Natomiast, jeśli inwazja wywołana jest dużą liczbą larw *Trichinella* spp., przeciwciała mogą być wykrywalne już od 2,5-3 tygodnia po zarażeniu [3, 11,30].

Badania nad wykrywaniem krążących kompleksów immunologicznych w przebiegu inwazji *T. spiralis* rozpoczęto pod koniec lat 70. XX wieku [31]. Badania prowadzone przez Dziemian i wsp. [32] wykazały obecność krążących kompleksów immunologicznych w surowicy szczurów od 4 do 15 dnia po zarażeniu. Obecność w tym okresie kompleksów immunologicznych autorzy tłumaczą pojawieniem się prawdopodobnie przeciwciał klasy IgM, które były wiązane przez krążący antygen. W opinii większości autorów, badanie poziomu krążących kompleksów immunologicznych posiada znaczenie jedynie w ogólnej ocenie procesu patologicznego włośnicy, lecz przydatność ich oznaczania w praktyce lekarskiej jest niewielka [33].

Do metod rekomendowanych i najczęściej stosowanych do wykrywania obecności włośni zalicza się metodę kompresorową i wytrawiania [7, 11]. Pierwsze próby podejmowane w kierunku ulepszenia bądź zastąpienia bezpośrednich metod wykrywania włośni, których podstawę miała stanowić metoda ELISA, rozpoczęto w latach 70. XX wieku [1]. Prowadzono wówczas badania surowic świń konwencjonalnych i SPF (Specific Pathogen Free) eksperymentalnie zarażonych *T. spiralis* [1, 2, 34]. Wyniki uzyskane przez Ruitenberga i wsp. [2], potwierdziły możliwość wykrycia przeciwciał przeciw *T. spiralis* w pierwszych dniach po zarażeniu (u świń typu SPF w 3 dpz, u świń konwencjonalnych 14 dpz). W celu wykazania przydatności metody ELISA do diagnozowania włośni przebadano 1022 surowice pochodzące od świń domowych, które uprzednio badano na obecność włośni metodą wytrawiania. Wyniki uzyskane przy użyciu metody ELISA w pełni potwierdziły wyniki metody wytrawiania [2]. Już w latach 70. XX wykazano, że główną zaletą ELISA jest jej szybkość. Test umożliwiał badanie około 4000 prób w bardzo krótkim czasie [1].

Jak wykazały badania Cuperlovica i wsp. [35] warunki socjalne, społeczne oraz sytuacja polityczna kraju to tylko nieliczne przykłady ograniczające bądź uniemożliwiające wprowadzenie tego typu badań w krajach średnio i słabo rozwiniętych (Alba-

nia, Bułgaria, Bośnia i Hercegowina). Jedynie nieliczne kraje podjęły próbę wdrożenia ELISA do badań rutynowych i przeprowadzania monitoringu w kierunku obecności przeciwciał w surowicach świń i dzików wskazujących na obecność larw włośni w mięsie [35, 36]. Głównym ograniczeniem w wykorzystaniu tej metody w praktyce weterynaryjnej jest brak specyficznego antygeny warunkującego wysoką powtarzalność i porównywalność wyników w różnych układach pasożyt-żywicieli, a także wykluczającego występowanie reakcji krzyżowych. Brak specyficznego antygeny nie pozwala na wprowadzenie i zastosowanie ELISA w ubojniach w celu wczesnego wykrywania zarażenia wywołanego przez *T. spiralis* na podstawie obecności specyficznych przeciwciał.

Początkowo do badań immunoenzymatycznych używano antygeny somatycznego pochodzącego z larw wyizolowanych z mięśni. Larwalny antygen somatyczny umożliwia wykrywanie specyficznych przeciwciał przeciw *T. spiralis* znacznie wcześniej niż larwalne antygeny metaboliczne [37, 38]. Jednakże nawet wprowadzenie do badań oczyszczonych frakcji antygeny somatycznego z larw mięśniowych *T. spiralis* o ciężarze cząsteczkowym 43 kDa i 47 kDa nie wpłynęło na zwiększenie jego przydatności diagnostycznej. Specyficzność ELISA była słaba również ze względu na pojawienie się krzyżowych reakcji [34, 39]. Antygen somatyczny uzyskany z larw mięśniowych *T. spiralis* posiada bowiem pewne epitopy, które są wspólne dla innych pasożytów, między innymi *Ascaris suum*, *Trichuris suis*, *Loa loa*, *Toxocara* spp., *Anisakis* spp., *Onchocerca* spp. czy *Schistosoma* spp. [7, 11].

W latach 80. XX wieku, specyficzność i czułość ELISA zostały zwiększone przez wykorzystanie antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego (E/S) uzyskanego z hodowli larw mięśniowych *T. spiralis* prowadzonej *in vitro* [3]. Od czasu poznania natury i funkcji stichosomu larw *Trichinella* i wprowadzenia do badań antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego (E/S) o masie cząsteczkowej 49 kDa i 53 kDa, wybitnie zwiększyła się swoistość badań diagnostycznych [40] i ELISA stał się techniką z wyboru w diagnostyce włośnicy.

Wyrazem postępu w dziedzinie diagnozowania włośnicy u ludzi i zwierząt są próby wprowadzenia antygeny syntetycznego (β -tyvelose) charakteryzującego się większą swoistością w wykrywaniu przeciwciał klasy IgG w porównaniu z antygenem ekskrecyjno-sekrecyjnym [7, 41]. Jak wykazały badania Zarlengi i Gamble [40], zastosowanie w diagno-

zowaniu włośnicy u świń antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego wykazuje większą specyficzność testu niż przy użyciu antygeny somatycznego. Natomiast wprowadzenie do badań antygeny syntetycznego stanowi alternatywę dla antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego w diagnozowaniu włośnicy u świń [4, 42]. Wstępne badania prowadzone przez Mollera i wsp. [42] wykazały, że czułość antygeny ekskrecyjno-sekrecyjnego w wykrywaniu zarażenia *Trichinella* spp. w badanych próbach wynosiła 99-100%, natomiast dla syntetycznego 90-95% [42].

Skuteczność wykrywania specyficznych przeciwciał metodami immunoenzymatycznymi zależy w dużym stopniu od metodyki przygotowywania antygenów. Innym ważnym czynnikiem wpływającym na specyficzność wyników uzyskanych przy pomocy ELISA, jest jakość pobranej do badań krwi lub surowicy. Próbkę niskiej jakości (np. hemoliza), szczególnie od zwierząt wolno żyjących (np. dzików), mogą znacząco zmniejszać specyficzność i czułość testu [7]. Metody serologiczne, które wykorzystuje się do badania próbek krwi lub surowic w celu określania poziomu specyficznych przeciwciał, wydają się być bardziej czułe niż metody bezpośrednie. Prowadzone od kilku lat badania wykazały, że „sok mięsny” (meat juice) uzyskany z tuszek zwierząt zarażonych włośnicami jest również przydatnym materiałem do przeprowadzenia serologicznych testów, w tym ELISA [7].

Walidacja

Aby opracowywany test diagnostyczny został uznany za wiarygodny i przydatny w diagnostyce należy przeprowadzić jego walidację, czyli ocenę wartości diagnostycznej [43, 44]. Oceniając test diagnostyczny należy dysponować testem referencyjnym, za pomocą którego wyznacza się liczbę osobników dodatnich i ujemnych [45]. Jakość metody referencyjnej determinuje dokładność, z jaką można dokonać oceny testu diagnostycznego. Testem referencyjnym rekomendowanym do potwierdzania inwazji *T. spiralis* jest metoda wytrawiania, którą cechuje czułość 90% dla prób zawierających 3-5 larw w 1g tkanki mięśniowej [11].

Dla wyznaczenia czułości i specyficzności testu niezwykle istotne znaczenie ma wartość punktu odcięcia (cut-off). Wybór nieprawidłowej wartości cut-off może spowodować, że parametry te nie zostaną wyznaczone właściwie.

Wykorzystanie ELISA w Polsce

Metoda ELISA po raz pierwszy została wykorzystana do przeprowadzenia monitoringowych badań epizootycznych i epidemiologicznych w kierunku włośnicy u świń na terenie Polski przez van Knapena i wsp. [46, 47].

W ostatnich latach w IP PAN podjęto pierwszą w Polsce próbę kompleksowego monitoringu włośnicy u świń domowych i dzików wolno żyjących na podstawie obecności specyficznych przeciwciał klasy IgG przy użyciu metody ELISA.

W badaniach wykorzystywano gotowy zestaw opracowany w Instytucie Pourquier w Paryżu (ELISA *Trichinella* — Serum Screening-192 Tests, Detection of specific antibodies to *Trichinella* by ELISA), otrzymany w ramach realizacji projektu TRICHIPORSE „Safe pork and horse meat on EU markets: early and unbiased diagnostic tests for *Trichinella*, a także opracowaną własną procedurę ELISA, w której wykorzystywano antygen ekskrecyjno-sekrecyjny E/S L1 *T. spiralis* przygotowany w Pracowni Fizjopatologii.

Przebadane surowice świń pochodziły z ferm z okolicy Białegostoku, z Natulina koło Lublina, z Poznania, Bożej Woli oraz z województw: śląskiego, lubelskiego, świętokrzyskiego, podlaskiego, kujawsko-pomorskiego, łódzkiego, warmińsko-mazurskiego, podkarpackiego.

Surowice od dzików pozyskano z okolic Gdańska i Krosna oraz z województw: opolskiego, warmińsko-mazurskiego, zachodniopomorskiego, lubelskiego, dolnośląskiego.

Wyniki urzędowego badania zwierząt rzeźnych wskazują, że każdego roku w Polsce ubojowi poddawanych jest kilkanaście milionów świń domowych, a odsetek zarażonych zwierząt wynosił 3,6/1 000 000 w 2003 roku, 1,4/1 000 000 w 2004 roku. Odsetek zarażonych dzików był znacznie wyższy i w ostatnich dwóch latach wynosił odpowiednio 2003 r. — 3,1/1 000 i w 2004 r. — 3,2/1 000 [48, 49].

Wyniki badań własnych przeprowadzonych przy wykorzystaniu ELISA wskazują na znacznie wyższy procent zarażenia włośnicami wśród świń domowych i dzików. Odsetek zarażonych świń wynosił 0,99% z 1474 zbadanych, a dzików 0,78% z 1784 zbadanych.

Prowadzone badania polegały jedynie na przeprowadzeniu badań „screeningowych” pośród pozyskanych surowic świń domowych i dzików oraz określenia odsetka zarażenia. Z tego też względu trudno jest ocenić bezpośrednią zależność między

odsetkiem zarażonych świń i dzików, a częstością zachorowań ludzi na włośnicę w poszczególnych rejonach kraju.

Zaletą przeprowadzonych badań jest przede wszystkim opracowanie procedury własnej, której wyniki są równocześnie z wynikami uzyskanymi przy użyciu komercyjnych zestawów. Wykazano przydatność procedury ELISA w diagnozowaniu włośnicy, co potwierdza możliwość jej wykorzystania w praktyce weterynaryjnej, jako metody uzupełniającej wytrawianie, pozwalającej wykryć specyficzne przeciwciała przeciw pasożytowi znacznie wcześniej niż larwy w mięśniach wytworzą torebki. Równoległe stosowanie obu metod: wytrawiania i immunoenzymatycznej, daje większą szansę na wyeliminowanie ze sprzedaży mięsa zawierającego larwy włośni.

Wykorzystanie ELISA do diagnozowania włośnicy zostało dobrze udokumentowane w przypadku badań doświadczalnych u zwierząt zarażonych wysokimi dawkami. Problem stanowi w dalszym ciągu możliwość wykrycia specyficznych przeciwciał u zwierząt zarażonych małymi dawkami larw, a także wykrycie przeciwciał w okresie, gdy larwy mięśniowe stają się inwazyjne dla człowieka.

Literatura

- [1] Ruitenber E.J., Steerenberg P.A., Brosi B.J.M., Buys J. 1974. Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bulletin of the World Health Organization* 51: 108-109.
- [2] Ruitenber E.J., Steerenberg P.A., Brosi B.J.M., Buys J. 1975. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) as preventive and repressive control method for the detection of *Trichinella spiralis* infections in slaughter pigs. *Wiadomości Parazytologiczne* 31: 747-751.
- [3] Gamble H.R., Anderson W.R., Graham C.E., Murrell K.D. 1983. Diagnosis of swine trichinellosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Veterinary Parasitology* 13: 349-361.
- [4] Gamble H.R., Wiśniewski N., Wassom D. 1997. Diagnosis of trichinellosis in swine by enzyme immunoassay using a synthetic glycan antigen. *American Journal of Veterinary Research* 58: 417-421.
- [5] Nasinyama G.W., Gordon J.C., Bech-Nielsen S., Barriga O.O. 1991. IgG response in guinea pigs to *Trichinella spiralis* infection. *Veterinary Parasitology* 39: 301-311.
- [6] van der Leek M.L., Dame J.B., Adams C.L., Gillis K., Littell R.C. 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of trichinellosis in swine. *American Journal of Veterinary Research* 53: 877-882.
- [7] Nöckler K., Pozio E., Voigt W.P., Heidrich J. 2000. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary Parasitology* 93: 335-350.
- [8] Burgess G.W. 1988. ELISA technology in diagnosis and research. James Cook University of North Queensland, Townsville, Australia.
- [9] Dzbeński T.H., Bitkowska E., Płonka W. 1994. Detection of circulation parasitic antigen in acute infection with *Trichinella spiralis*: diagnostic significance of findings. *Zentralblatt für Bakteriologie* 281: 519-525.
- [10] Manual of standards for diagnostic tests and vaccines 2000. Office International des Epizooties, Paris, France: 322-327.
- [11] Gamble H.R., Pozio E., Bruschi F., Nöckler 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.
- [12] Kapel C.M.O., Gamble H.R. 2000. Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. experimentally infected pigs. *International Journal for Parasitology* 30: 215-221.
- [13] Grundy M. 1982. Preliminary observations using a multilayer ELISA method for detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool samples. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 396-400.
- [14] Ghandi B., Irshad M., Acharya S., Samantray J., Tandon B. 1989. Use of affinity purified heterologous antibodies in an ELISA for detection of *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. *National Medical Journal of India* 2: 223-227.
- [15] Kabil S., Hassan M., Atta M., El-Ghysha O. 1990. ELISA in detection of *Entamoeba histolytica* antigens in stool. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 20: 673-676.
- [16] Wonsit R., Thammapalero N., Tharavanus S., Radomyos P., Bunnag D. 1992. Enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal and polyclonal antibodies for detection of *Entamoeba histolytica* antigens in faecal specimens. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86: 166-169.
- [17] Ungar B., Yolken R., Nash T., Quinn T. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *The Journal of Infectious Diseases* 49: 90-97.
- [18] Green E., Miles M., Warhurst D. 1985. Immunodiagnostic detection of *Giardia* antigen in faeces by a rapid visual enzyme-linked immunosorbent assay. *Lancet* 2: 691-693.
- [19] Espino A.M., Marcet R., Finalay C.M. 1997. *Fasciola hepatica*: detection of antigenemia and coproantigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology* 85: 117-120.

- [20] Dumenigo B.E., Mezo M. 1999. Monoclonal antibody sandwich immunoassay detection of coproantigen to evaluate the efficacy of treatment in natural ovine fasciolosis. *Research in Veterinary Science* 66: 165-167.
- [21] Allan J., Craig P. 1989. Coproantigen in gut tapeworm infections: *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitology Research* 76: 68-73.
- [22] Allan J., Avila J., Garcia Noval J., Flisser A., Craig P. 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 101: 473-477.
- [23] Deplazes P., Gottstein B., Eckert J., Jenkins D., Ewald D., Jimenez-Palacios S. 1992. Detection of *Echinococcus* coproantigens by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. *Parasitology Research* 78: 303-308.
- [24] Boulos L.M., Ibrahim I.R., Negm A.Y., Aly S.M. 2001. Detection of coproantigen in early trichinellosis. *Parasite* 8: 136-139.
- [25] Engvall E., Ljungström J. 1975. Detection of human antibodies to *Trichinella spiralis* by enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 83: 231-237.
- [26] van Knapen F., Franchimot J.H., Verdonk A.R., Stumpf J., Undeutsch K. 1982. Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 31: 973-976.
- [27] Tomasik J., Grzybowski J., Golińska Z., Prokopowicz D. 1992. Activity of specific IgG, IgM and IgE antibodies in human trichinellosis. *Wiadomości Parazytologiczne* 38: 127-133.
- [28] Machnicka B., Prokopowicz D., Madaliński K., Dziemian E., Prokopowicz K., 1994. Antibodies, circulating antigens and circulating immune complexes in human trichinellosis. In: *Trichinellosis*. (Ed. Campbell, W.C., Pozio, E., Bruschi, F.). Istituto Superiore di Sanita Press, Rome, Italy, 341-346.
- [29] Golińska Z. 1984. Przeciwciała powstające pod wpływem stymulacji antygenami pasożytów. *Wiadomości Parazytologiczne* 30: 73-83.
- [30] Gamble H.R. 1996. Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *Journal of Food Protection* 59: 295-8.
- [31] Geniteau M., Verroust P.J., Smith M.D., Morel-Marguerit L., Saimot G., Coulaud J.P. 1977. Circulating immune complex in six patients with trichinosis. *Clinical and Experimental Immunology* 30: 141-144.
- [32] Dziemian E., Machnicka B. 2000. Influence of *Trichinella spiralis* infective dose on the level of antibodies, circulating antigens and circulating immune complexes in rats. *Helminthologia* 37: 59-66.
- [33] Kocięcka W. 1996. Włośień kręty i włośnica. Volumed, Wrocław.
- [34] Ruitenbergh E.J., Steerenberg P.A., Brosi B.J.M., Buys J. 1976. Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *Trichinella spiralis* infections in conventionally raised pigs. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 101: 57-68.
- [35] Cuperlovic K., Djordjevic M., Pavlovic S. 2004. Re-emergence of trichinellosis in southeast Europe due to political and economic changes. XI International Conference on Trichinellosis. 8-12 August, 2004, San Diego, 23.
- [36] Forbes L.B. 2004. Food safety risk associated with trichinellosis in marine mammals. XI International Conference on Trichinellosis. 8-12 August, 2004, San Diego, 24.
- [37] Lind P., Eriksen L., Henriksen S.A., Homan W.L., van Knapen F., Nansen P., Stahl P. 1991. Diagnostic tests for *Trichinella spiralis* infection in pigs. A comparative study of ELISA for specific antibody and histamine release from blood cells in experimental infections. *Veterinary Parasitology* 39: 241-252.
- [38] Chapa-Ruiz M.R., Salinas-Tobon M.R., Aguilar-Alvarez D.J., Martinez-Moranon R. 1992. Recognition of *Trichinella spiralis* muscle larvae antigens by sera from human infected with this parasite and its potential use in diagnosis. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 34: 95-99.
- [39] Ruitenbergh E.J., van Knapen F. 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a diagnostic method for *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology* 3: 317-326.
- [40] Zarlenga D.S., Gamble H.R. 1990. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 42: 165-174.
- [41] 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.
- [42] Moller L.N., Petersen E., Kapel C.M.O. 2005. Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. *Veterinary Parasitology* 132: 81-84.
- [43] Greiner M., Kumar S., Kyeswa C. 1997. Evaluation and comparison of antibody ELISA for serodiagnosis of bovine trypanomosis. *Veterinary Parasitology* 73: 197-205.
- [44] Greiner M., Gardner I.A. 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 3-22.
- [45] Whiting P., Rutjes A.W., Reitsma J.B., Glas A.S., Bossuyt P.M., Kleijnen J. 2004. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review. *Annals of Internal Medicine* 140: 189-202.
- [46] van Knapen F., Franchimont J.H., Ruitenbergh E.J. 1980. The reliability of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of swine trichinellosis. *Trichinellosis (Proceeding of the Interna-*

- tional Conference on Trichinellosis) 5: 399-404.
- [47] Ramisz A., Szymborski J., Balicka-Ramisz A. 1996. Ocena stosowanych w Polsce metod rozpoznawania włośnicy. *Życie Weterynaryjne* 10: 333-337.
- [48] Główny Inspektorat Weterynarii 2003 rok.
- [49] Główny Inspektorat Weterynarii 2004 rok.

Wpłynęło 25 lipca 2006
Zaakceptowano 27 lipca 2006