

Wpływ procedury otrzymywania antygenów ekskrecyjno-sekrecyjnych *Trichinella spiralis* na wynik testu ELISA u zarażonych świń*

The influence of the procedure of excretory-secretory L1 *Trichinella spiralis* antigen preparation on the efficiency of an ELISA test in pigs

Justyna Bien

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

ABSTRACT. Background. Trichinellosis is a parasitic zoonosis transmitted to humans by consumption of raw or undercooked meat from animals infected by worms of the *Trichinella* genus. Every year seropositive cases are found among the human population and thus trichinellosis still remains an epidemiologically important disease in Poland. The usefulness of ELISA for anti-*T. spiralis* IgG detection in pigs is still limited by the nature of antigen. The objective in the present study was to compare the usefulness of excretory-secretory antigens of L1 *T. spiralis* for the serological detection of IgG antibodies in pigs. **Material and methods.** The antigens were prepared in different laboratories: Ag ES L1 *T. spiralis* (N) in Germany, Ag ES L1 *T. spiralis* (W) in Italy and Ag ES L1 *T. spiralis* in Poland. Conventional, Iberian pigs were infected with 200, 1000 and 20 000 muscle larvae of *T. spiralis*. Serum samples were obtained at 5 and 1 dbi (day before infection), and 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 dpi (day post infection) and screened for specific IgG antibodies to excretory-secretory L1 *T. spiralis* antigens. Serum samples were obtained from the EU project TRICHIPORSE. The cut-off value of ELISA was determined on serum samples from 248 *Trichinella*-free pigs from Poznań and Boża Wola, that were examined by artificial digestion. **Results.** In pigs infected with 200 L1 *T. spiralis* larvae, specific IgG were detectable from 50 dpi, when the Ag ES L1 *T. spiralis* (N) was used, whereas when Ag ES L1 *T. spiralis* (W) and Ag ES L1 *T. spiralis* were used, the specific IgG were detectable from 40 dpi. In pigs infected with 1000 L1 *T. spiralis* larvae, specific IgG was observed from 30 dpi when Ag ES L1 *T. spiralis* (W) and Ag ES L1 *T. spiralis* were used, but when Ag ES L1 *T. spiralis* (N) was used specific IgG were detectable from 40 dpi. In the group infected with the highest dose of *T. spiralis* larvae, specific IgG were detectable from 30 dpi when Ag ES L1 *T. spiralis* (N) and Ag ES L1 *T. spiralis* (W) were used, whereas when Ag ES L1 *T. spiralis* was used specific IgG were detectable from 20 dpi. The results strongly indicated that in the examined pigs, the specific IgG response against *T. spiralis* infection is dose dependent. Furthermore, it was shown that the high infectious dose induced earlier increasing of specific IgG response. Statistical analysis revealed a significant positive correlation between OD values obtained in procedures based on the three antigens. The results were statistically repeatable for procedures and for single pigs ($P < 0.01$).

Key words: ELISA, excretory/secretory L1 antigen, IgG, pigs, *Trichinella spiralis*.

Wstęp

Nicienie z gatunku *Trichinella spiralis* należą do najbardziej rozpowszechnionych pasożytów wystę-

pujących na całej kuli ziemskiej [1]. Stanowią przyczynę pojawiającej się w różnych rejonach świata, w tym również i Polsce, pasożytniczej choroby zwanej włośnicą, którą nabywa się przez spożycie suro-

*Badania wykonano w ramach grantu Nr 2 PO6K 051 26

wego bądź niedogotowanego mięsa wieprzowego i dziczyzny zawierających inwazyjne larwy [2]. Zmieniający się obraz włośnicy pociąga za sobą konieczność modyfikacji przepisów dotyczących przede wszystkim metod stosowanych do badania mięsa przeznaczonego do konsumpcji na obecność włośni. Pojawiające się coroczne raporty na temat występowania włośnicy u zwierząt i ludzi w Polsce wskazują, że jest ona stale aktualnym problemem w naszym kraju, zarówno od strony epizoologicznej jak i epidemiologicznej [3-6].

Jednym z głównych ograniczeń uniemożliwiających prawidłowe kontrolowanie mięsa przeznaczonego do konsumpcji, jest brak odpowiedniej metody wykrywającej obecność *T. spiralis* we wczesnej fazie inwazji, co umożliwiłoby wyeliminowanie z obrotu i sprzedaży mięsa zawierającego larwy włośni. Testem referencyjnym rekomendowanym do potwierdzania inwazji *T. spiralis* jest metoda wytrawiania, którą cechuje 90% czułość dla prób zawierających 3-5 larw w 1g tkanki mięśniowej [7].

Z danych literaturowych wynika, że test immunoenzymatyczny dla świń w kierunku obecności przeciwciał klasy IgG przeciw *T. spiralis*, oparty na antygenie ekskrecyjno-sekrecyjnym cechuje czułość w zakresie 93,1–99,2%, pod warunkiem, że upłynęło wystarczająco dużo czasu od zarażenia, aby mogła rozwinąć się odpowiedź ze strony układu immunologicznego żywiciela. Natomiast specyficzność testu szacowano w zakresie 90,6–99,4% [7–10].

Pomimo, że metoda ELISA jest powszechnie znana i używana w różnego typu badaniach, to jednak nie znalazła szerszego zastosowania w praktyce weterynaryjnej do wczesnego diagnozowania inwazji *T. spiralis*, co umożliwiłoby eliminację z hodowli zarażonych zwierząt, a tym samym chroniłoby człowieka przed zarażeniem się tym pasożytem. Głównym ograniczeniem w wykorzystaniu tej metody w praktyce weterynaryjnej jest brak specyficznego antygeny warunkującego wysoką powtarzalność i porównywalność wyników, a także wykluczającego występowanie reakcji krzyżowych. Brak specyficznego antygeny nie pozwala na wprowadzenie i zastosowanie ELISA w ubojniach w celu wczesnego wykrywania włośni, tzn. jeszcze przed otorbieniem się larw w mięśniach, na podstawie obecności specyficznych przeciwciał.

Celem niniejszej pracy było porównanie przydatności antygenów ekskrecyjno-sekrecyjnych L1 *T. spiralis* uzyskanych według różnych procedur do diagnozowania inwazji u świń z wykorzystaniem metody ELISA.

Material i metody

Znaczna część badań była prowadzona w ramach projektu TRICHIPORSE „Safe pork and horse meat on EU markets: early and unbiased diagnostic tests for *Trichinella*”, Nr QLK1-CT-2001-01156, w związku z czym schemat doświadczeń i procedury zostały zatwierdzone przez kierowników projektu.

Surowice

Surowice od świń konwencjonalnych (Iberian pigs) zarażanych eksperymentalnie uzyskano z Laboratorio del Parasitologia, Facultad de Veterinaria Universidad de Extremadura, Caceres w Hiszpanii w ramach realizacji projektu TRICHIPORSE.

Świnie zarażano trzema dawkami larw *T. spiralis*. Każdą grupę doświadczalną stanowiły 3 świnię: grupa I — świnię nr 1, 2, 3 zarażane dawką 200 L1 *T. spiralis*, grupa II — świnię nr 4, 5, 6 zarażane dawką 1000 L1 *T. spiralis*, grupa III — świnię nr 7, 8, 9 zarażane dawką 20 000 L1 *T. spiralis*.

Surowice uzyskiwano 5 dni i 1 dzień przed zarażeniem (-5, -1) oraz 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 i 60 dni po zarażeniu (dpz) i przetrzymywano w temperaturze -20°C do dalszych oznaczeń. W ramach konsorcjum TRICHIPORSE uzyskano również surowice wzorcowe ujemne i dodatnie, które posłużyły do wyznaczenia czułości procedury ELISA.

Antygeny

Otrzymywanie Ag ES L1 *T. spiralis* w IP PAN

Formy mięśniowe L1 płukano czterokrotnie używając do tego celu podłoża hodowlanego RPMI-1640. Następnie larwy (1000 larw/ml) umieszczano w butelkach hodowlanych w kompletnym podłożu RPMI-1640 zawierającym: 20 mM HEPES, L-glutaminę oraz 50 U/ml penicyliny i 50 µg/ml streptomycyny. Inkubację prowadzono przez 18 godz. w temperaturze +37°C i 5% CO₂. Larwy oddzielono od płynu hodowlanego, który przepuszczono przez filtr o wielkości porów 0,22 µm. Do oczyszczania antygeny ES L1 *T. spiralis* używano również membran dializacyjnych z filtrem 3 500 Da (firmy ROTH). Dializę prowadzono w PBS pH=7,2 przez 24 godz. w +4°C.

Stężenie białka w supernatancie określano metodą Bradforda [11] używając odczynnika Bradford firmy Sigma.

W celu zagęszczenia antygeny, uzyskany supernatant poddawano liofilizacji w aparacie do liofilizacji.

zacji firmy Heto Lab Equipment.

Otrzymywanie Ag ES L1 *T. spiralis* w innych ośrodkach badawczych

W badaniach zastosowano również antygeny ES L1 *T. spiralis* przygotowane wcześniej w Istituto Superiore di Sanita we Włoszech — Ag ES L1 *T. spiralis* (W)¹ i w Bundesinstitut für Gesundheitlichen, Verbraucherschutz und Veterinärmedizin w Niemczech — Ag ES L1 *T. spiralis* (N).

Antygeny były otrzymywane według zastosowanej przez Pozio i wsp. [12] procedury: larwy mięśniowe L1 płukano trzykrotnie w soli fizjologicznej NaCl (0,85%) z dodatkiem antybiotyków: penicyliny (200 U/ml) i streptomycyny (200 µg/ml). Następnie larwy płukano w podłożu hodowlanym DMEM z dodatkiem antybiotyków: penicyliny (500 U/ml) i streptomycyny (500 µg/ml). Larwy w liczbie 5 000 na 1 ml umieszczano w butelkach hodowlanych w kompletnym podłożu DMEM zawierającym: 1 M HEPES, 200 mM glutaminy, 100 mM pirogronianu, 5 000 U/ml penicyliny i 500 µg/ml streptomycyny. Inkubację prowadzono przez 18 godzin w temperaturze + 37°C i 5% CO₂. Następnie larwy oddzielano od płynu hodowlanego, który przepuszczono przez filtr o wielkości porów 0,22 µm. Uzyskany płyn zagęszczono 100 x w aparacie Amicon używając filtru YM-5. Próbkę poddawano całkowitej dializie w PBS pH=7,2.

Antygeny ES L1 *T. spiralis* otrzymane od partnerów były używane według zalecanego rozcieńczenia 1:50.

Procedura ELISA

96-dołkowe płytki firmy Nunc opłaszczano dodając do każdego dołka po 100 µl antygenu ES L1 *T. spiralis* w stężeniu 2 µg/ml rozcieńczonego w PBS (pH=7,2). Opłaszczanie antygenem prowadzono przez noc w temperaturze +4°C. Płytki mikrotitracyjne płukano 3 x w PBS z dodatkiem 0,05% Tween-20. Do płukania wykorzystywano automatyczną płuczkę firmy Thermo Labsystems Wellwash 384. Do każdego dołka dodano po 100 µl badanej surowicy rozcieńczonej w stosunku 1:100 w PBS z dodatkiem 0,25% BSA oraz 0,05% Tween-20. Inkubację prowadzono przez 1,5 godziny w temperaturze +37°C. Następnie płytki płukano 3 x w PBS z dodatkiem 0,05% Tween-20. Do każdego dołka dodano po 100 µl przeciwciała (surowica królicza anti-świńskie IgG; firmy Sigma) koniugowanego z peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu

1:10 000 w PBS z dodatkiem 0,25% BSA oraz 0,05% Tween-20. Inkubację prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze +37°C. Płytki płukano 3 x w PBS z dodatkiem 0,05% Tween-20. Wywołanie reakcji barwnej prowadzono dodając do każdego dołka po 100 µl TMB. Inkubację z substratem prowadzono przez 20 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Reakcję enzymatyczną zatrzymywano dodając do każdego dołka po 50 µl 0,125% HF. Absorbancję prób odczytano przy długości fali 630 nm.

Ocena wartości diagnostycznej testu

Dobór metody wyznaczania punktu odcięcia (cut-off)

Wynik testu, powyżej którego może on zostać uznany za pozytywny, oznaczano przy pomocy trzech metod, oceniając ich czułość i specyficzność.

Do wyznaczenia wartości cut-off zastosowano następujące metody:

(1) M+3SD — średnia absorbancja dla osobników ujemnych powiększona o trzykrotną wartość odchylenia standardowego [12, 13].

(2) S/P% — współczynnik oznaczający stosunek absorbancji próby badanej do absorbancji próby dodatniej pomnożony przez 100. Zgodnie z zaleceniami producenta, dla gotowego zestawu Kit, wykorzystywanego w konsorcjum TRICHIPORSE, pozytywność badanych prób określano na podstawie współczynnika S/P obliczanego wg wzoru:

$$S/P\% = (OD \text{ próby} / OD \text{ kontroli pozytywnej}) \times 100$$

- Jeśli współczynnik S/P% ≤ 40% to próba jest kwalifikowana jako negatywna;

- Jeśli współczynnik S/P% ≥ 50% to próba jest kwalifikowana jako pozytywna;

- Natomiast, jeśli S/P% waha się między 40–50% próbkę traktuje się jako niepewną, wątpliwą.

(3) ROC — (Receiver Operating Characteristic) — na podstawie absorbancji uzyskanych dla osobników dodatnich i ujemnych tworzona jest krzywa ROC umożliwiająca testowanie wpływu różnych cut-off na czułość i specyficzność metody (Win Epi-scope 2.0) [14].

Określenie czułości i specyficzności testu

Do określenia czułości i specyficzności testu posłużyły wzory użyte przez Greinera i Gardnera [15].

$$\text{Czułość \%} = 100 \times TP / (TP + FN)$$

$$\text{Specyficzność \%} = 100 \times TN / (TN + FP)$$

gdzie: TP — wynik prawdziwie pozytywny; TN — wynik prawdziwie negatywny; FP — wynik fałszywie pozytywny; FN — wynik fałszywie negatywny

¹ Litery w nawiasie oznaczają pochodzenie antygenu: (W) — Włochy, (N) — Niemcy. Antygen bez litery w nawiasie — to antygen własny

Tabela. 1. Wyznaczanie czułości i specyficzności procedury ELISA z zastosowaniem różnych antygenów: A — Ag ES L1 *T. spiralis* (N), B — Ag ES L1 *T. spiralis* (W), C — Ag ES L1 *T. spiralis*.

Table 1. Estimation of the sensitivity and specificity of the ELISA procedure with different excretory-secretory antigens: A — Ag ES L1 *T. spiralis* (N), B — Ag ES L1 *T. spiralis* (W), C — Ag ES L1 *T. spiralis*.

A	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (N) / świnie konwencjonalne								
	cut-off			czułość %			specyficzność %		
dpz	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD
20				11,11	11,11	11,11			
25				22,22	22,22	22,22			
30	0,2	0,25	0,23	55,56	44,44	44,44			
40				70,70	66,66	77,77	100	100	100
50				100	77,77	100			
60				100	100	100			

B	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (N) / świnie konwencjonalne								
	cut-off			czułość %			specyficzność %		
dpz	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD
20				11,11	11,11	11,11			
25				33,33	33,33	33,33			
30	0,3	0,23	0,27	66,67	66,66	66,66			
40				100	77,77	88,88	100	100	100
50				100	100	100			
60				100	100	100			

B	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (N) / świnie konwencjonalne								
	cut-off			czułość %			specyficzność %		
dpz	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD	ROC	S/P	M+3SD
20				33,33	33,33	33,33			
25				33,33	33,33	33,33			
30	0,2	0,21	0,22	100	77,77	77,77			
40				100	100	100	100	100	100
50				100	100	100			
60				100	100	100			

W celu określenia czułości testu prześlędzono dynamikę występowania przeciwciał przeciw *T. spiralis* u zwierząt doświadczalnie zarażanych różnymi dawkami larw. Ustalono w ten sposób liczbę wyników prawdziwie pozytywnych, prawdziwie negatywnych, fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych. Takie postępowanie umożliwia ocenę czułości testu w poszczególnych dniach badań.

Do określenia specyficzności testu wykorzystano 160 surowic od świń z okolic Poznania oraz 88 od świń z Bożej Woli, u których w ubojni, metodą wytrawiania, nie stwierdzono obecności larw *T. spiralis*. Natomiast wykonując badania koproskopowe stwierdzono obecność innych pasożytów: inwazje jednogatunkowe: *Ascaris suum*, *Eimeria* spp., *Oesophagostomum* spp., *Trichuris suis*, a także znacznie częściej, inwazje mieszane: *Oesophagostomum* spp. + *Eimeria*

spp., *Oesophagostomum* spp. + *Eimeria* spp. + *A. suum*, *T. suis* + *Eimeria* spp. + *Metastrongylus* spp., *T. suis* + *Oesophagostomum* spp., *Eimeria* spp. + *T. suis* + *Oesophagostomum* spp. + *A. suum*.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przy użyciu programu MINITAB 8.3 oraz Excel XP for Windows.

Na podstawie współczynnika korelacji „*r*” oszacowano powtarzalność wyników ELISA uzyskanych w procedurze własnej z wykorzystaniem trzech antygenów: Ag ES L1 *T. spiralis* (N), Ag ES L1 *T. spiralis* (W), Ag ES L1 *T. spiralis*. W pracy przyjęto 5% ryzyko błędu i związany z nim poziom istotności $P < 0,05$ wskazujący na istnienie istotnych statystycznie różnic.

Wyniki

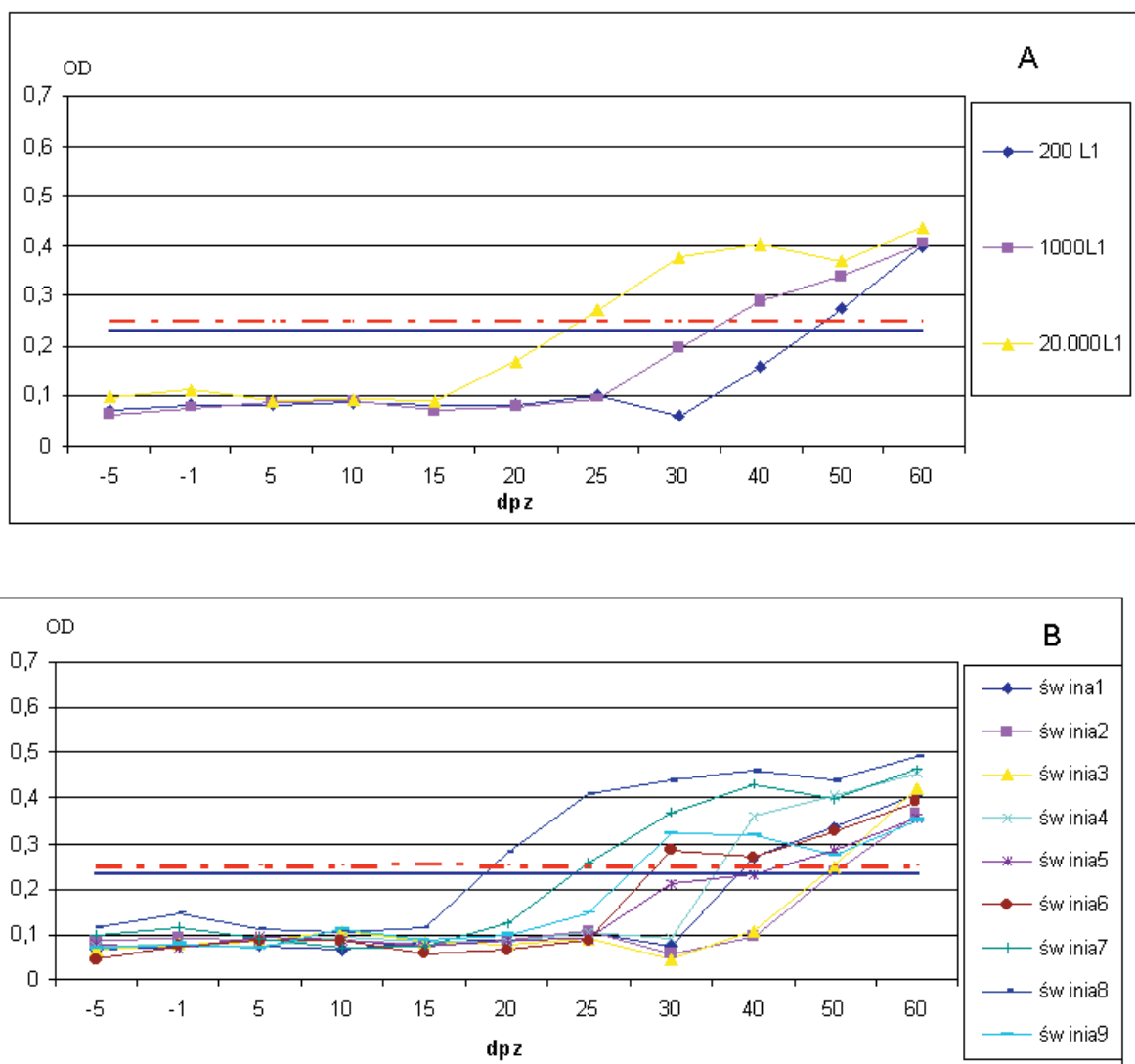
Specyficzność procedury ELISA

Wykorzystywane antygeny: Ag ES L1 *T. spiralis* (N), Ag ES L1 *T. spiralis* (W), Ag ES L1 *T. spiralis* nie wykazały reaktywności krzyżowej z surowicami świń wolnych od *T. spiralis*, a zarażonych innymi pasożytami stwierdzonymi w badaniach. Wartości OD uzyskiwane dla badanych surowic wahały się w zakresie 0,021-0,224. Określana na tej podstawie specyficzność testu wynosiła 100%.

Czułość procedury ELISA

Uzyskane wartości absorbancji OD dla surowic doświadczalnych i kontrolnych posłużyły do wyznaczenia punktu odcięcia (cut-off) przy pomocy trzech metod: ROC, S/P%, M+3SD oraz wyznaczenia na tej podstawie czułości testu. Otrzymane cząstkowe wyniki przedstawiono w Tabelach 1A, B, C.

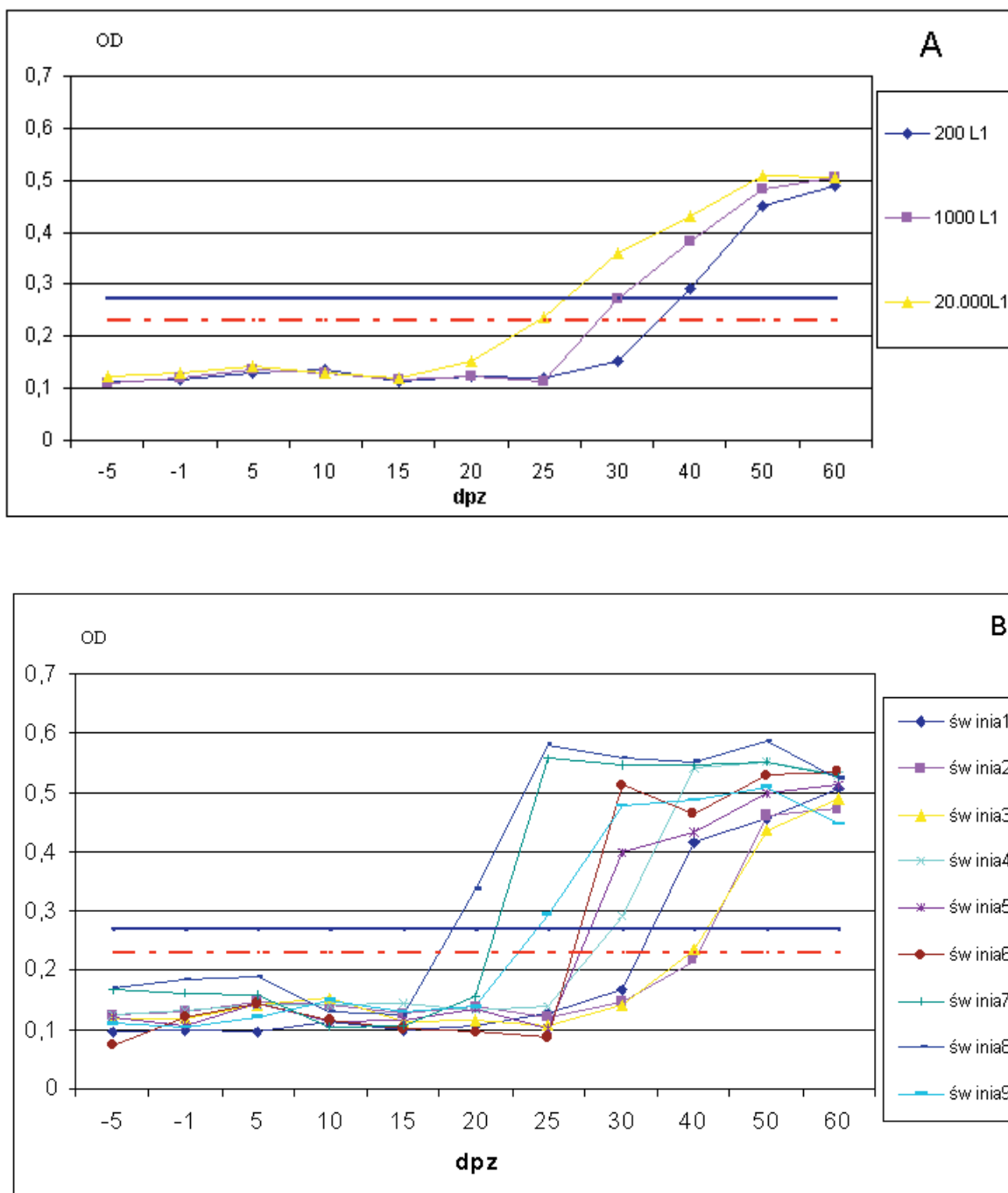
Najwyższe średnie wartości czułości ELISA obserwowano w przypadku zastosowania Ag ES L1 *T. spiralis*. Na podstawie wyznaczonych wartości cut-off (ROC; S/P%; M+3SD) test oparty na Ag ES L1 *T. spiralis* cechuje odpowiednio czułość: 77,7%,



Rys. 1. Zmiany poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicach od świń konwencjonalnych eksperymentalnie zarażonych różnymi dawkami larw *T. spiralis* względem Ag ES L1 *T. spiralis* (N): A — wyniki średnie dla dawki inwazyjnej, B — wyniki indywidualne.

Fig. 1. Anti-*Trichinella*-IgG dynamics in conventional pigs infected with different doses of L1 *T. spiralis* against Ag ES L1 *T. spiralis* (N): A — the average results, B — the individual results.

- — — — — cut-off, dla S/P%, (cut-off for S/P% of the method)
- — — — — cut-off, dla M+#SD, (cut-off for M+3SD of the method)



Rys. 2. Zmiany poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicach od świń konwencjonalnych eksperymentalnie zarażonych różnymi dawkami larw *T. spiralis* względem Ag ES L1 *T. spiralis* (W): A — wyniki średnie dla dawki inwazyjnej, B — wyniki indywidualne.

Fig. 2. Anti-*Trichinella*-IgG dynamics in conventional pigs infected with different doses of L1 *T. spiralis* against Ag ES L1 *T. spiralis* (W): A — the average results, B — the individual results.

— — — — — cut-off, dla S/P%, (cut-off for S/P% of the method)

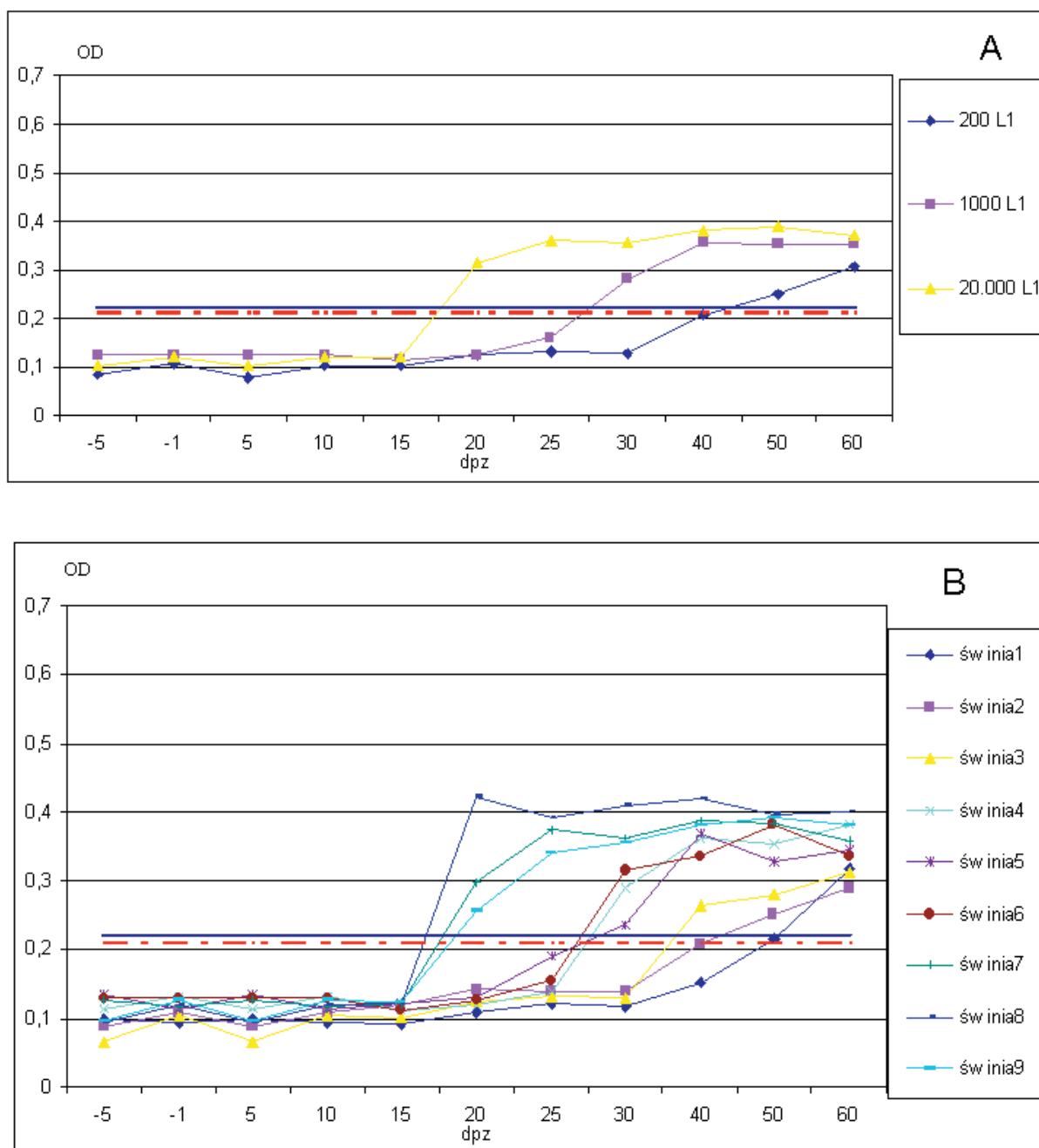
— — — — — cut-off, dla M+#SD, (cut-off for M+3SD of the method)

74,1%, 74,1%. Uwzględniając wartości cut-off wyliczone w oparciu o ROC, S/P% oraz M+3SD, niższe wartości czułości testu stwierdzono przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis* (W): 68,5%; 64,8% oraz 66,6%. Natomiast najniższe średnie wartości

czułości wyznaczono dla Ag ES L1 *T. spiralis* (N), i wynosiły one odpowiednio: 59,9%; 53,7%; 59,2%.

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna wyników wykazała wysoce



Rys. 3. Zmiany poziomu przeciwciał klasy IgG w surowicach od świń konwencjonalnych eksperymentalnie zarażonych różnymi dawkami larw *T. spiralis* względem Ag ES L1 *T. spiralis*: A — wyniki średnie dla dawki inwazyjnej, B — wyniki indywidualne.

Fig. 3. Anti-*Trichinella*-IgG dynamics in conventional pigs infected with different doses of L1 *T. spiralis* against Ag ES L1 *T. spiralis*: A — the average results, B — the individual results.

— — — — — cut-off, dla S/P%, (cut-off for S/P% of the method)
 ————— cut-off, dla M+#SD, (cut-off for M+3SD of the method)

statystycznie istotną ich powtarzalność dla procedury ELISA z zastosowaniem trzech antygenów: Ag ES L1 *T. spiralis* (N), Ag ES L1 *T. spiralis* (W), Ag ES L1 *T. spiralis* (P<0,01). Wartości współczynnika korelacji „r” dla poszczególnych zwierząt oraz procedur z wykorzystaniem trzech antygenów przed-

stawiono w Tabeli 2.

ELISA z wykorzystaniem trzech antygenów do wykrywania przeciwciał klasy IgG

Analiza wyników dla poszczególnych dawek (wartości średnie) pozwala zaobserwować pewne

Tabela. 2. Współczynnik korelacji „ r ” pomiędzy wartościami OD uzyskanymi dla świní doświadczalnych w zależności od używanego antygeny.

Table 2. The coefficient correlation r between OD values obtained in sera from experimentally infected pigs, in relation to antigens.

Nr świni	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (W) /Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (N) r	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (W) /Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> r	Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> (W) /Ag ES L1 <i>T. spiralis</i> r
1	0,980*	0,896*	0,945*
2	0,929*	0,921*	0,863*
3	0,937*	0,900*	0,806*
4	0,958*	0,973*	0,899*
5	0,974*	0,938*	0,926*
6	0,987*	0,980*	0,301*
7	0,935*	0,917*	0,178*
8	0,975*	0,910*	0,928*
9	0,957*	0,920*	0,870*
Współczynnik korelacji r dla procedury	0,779**	0,910**	0,750**

Objaśnienia (explanations) * $n=1$, $P<0,01$; ** $n=99$; $P<0,01$

podobieństwa pomiędzy stosowanymi w badaniach antygenami ekskrecyjno-sekrecyjnymi.

W surowicach od zwierząt zarażonych najniższą dawką 200 L1 zastosowanie Ag ES L1 *T. spiralis* (N) pozwala stwierdzić obecność przeciwciał IgG dopiero 50 dpz (Rys. 1A). Wcześniej, bo 40 dpz obserwowano przeciwciała IgG używając antygenów Ag ES L1 *T. spiralis* (W) oraz Ag ES L1 *T. spiralis* (Rys. 2A, 3A).

W grupie zwierząt zarażonych dawką 1000 L1 *T. spiralis* obecność przeciwciał wykryto 30 dpz przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis* (W) oraz Ag ES L1 *T. spiralis*, natomiast 40 dpz przy użyciu Ag ES L1 *T. spiralis* (N) (Rys. 1A, 2A, 3A). W grupie zwierząt zarażonych dawką 20 000 L1 *T. spiralis* obecność przeciwciał wykryto 30 dpz przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis* (W) oraz Ag ES L1 *T. spiralis* (N), natomiast 20 dpz przy użyciu Ag ES L1 *T. spiralis* (Rys. 1A, 2A, 3A).

Analiza wyników indywidualnych pozwoliła zaobserwować obecność przeciwciał klasy IgG najwcześniej (20 dpz) w surowicy od świni nr 8 w przypadku wszystkich trzech stosowanych antygenów (Rys. 1B, 2B, 3B).

Najwyższe wartości OD odzwierciedlające poziom przeciwciał uzyskano stosując Ag ES L1 *T. spiralis* (W) (Rys. 2B).

Porównując wyniki uzyskane po zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis* (W) i Ag ES L1 *T. spiralis* (N) stwierdzono różnice indywidualne w okresie pojawiania się przeciwciał i w ich poziomie. W poszczególnych grupach stwierdzono znaczne rozpiętości czasowe w okresie pojawiania się przeciwciał. Dla

Ag ES L1 *T. spiralis* (N) w grupie zwierząt zarażonych dawką 20 000 L1 przeciwciała pojawiły się między 20 a 30 dpz, dla Ag ES L1 *T. spiralis* (W) między 20 a 25 dpz (Rys. 1B, 2B). Dla Ag ES L1 *T. spiralis* (N) w grupie zwierząt zarażonych dawką 1 000 L1 przeciwciała klasy IgG pojawiły się między 30 a 50 dpz, a dla Ag ES L1 *T. spiralis* (W) 30 dpz. Nie stwierdzono tak dużych rozpiętości w czasie pojawiania się przeciwciał przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis*. W surowicach od wszystkich świní zarażonych dawką 20 000 L1 przeciwciała pojawiły się 20 dpz, a dla dawki 1000 L1 — 30 dpz. Jedyne różnice stwierdzono w grupie zwierząt zarażonych dawką 200 L1 *T. spiralis* (Rys. 1B, 2B, 3B).

Dyskusja

Pomimo wzrostu wiedzy na temat włośnic i wywoływanej przez niego choroby, pasożyt nadal stanowi potencjalne zagrożenie dla człowieka. Nicie nie z rodzaju *Trichinella* są przyczyną licznych, występujących każdego roku, w różnych częściach świata epidemii włośnicy, niezależnie od statusu społeczno-ekonomicznego poszczególnych krajów [16]. Zachorowania ludzi są w większości przypadków spowodowane konsumpcją surowego lub niedogotowanego mięsa lub jego produktów zawierających inwazyjne larwy włośni. W latach 1995-1997 do Międzynarodowej Komisji Włośnicowej (ICT) zostało zgłoszonych więcej niż 10 000 przypadków włośnicy u ludzi, w tym 18 śmiertelnych [17]. Źródłem zarażenia było głównie mięso wieprzowe i mięso dzików. Według Meldunku 7/B/05 opraco-

wanego przez Państwowy Zakład Higieny, o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach, w 2004 r. zarejestrowano 172 przypadki włośnicy u ludzi, a 62 w 2005 r. [18]. Głównym źródłem włośnicy u ludzi w Polsce jest mięso dzików zawierające larwy *T. spiralis* [19].

Według „Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines” publikowanym przez Office International des Epizootie (OIE), do diagnozowania włośnicy rekomendowane są dwie metody: bezpośrednie wykrywanie larw nicieni z rodzaju *Trichinella* w mięśniach (metoda wytrawiania) oraz pośrednie wykrywanie inwazji przy pomocy testów serodiagnostycznych określających poziom specyficznych przeciwciał [20-22].

Pierwsze próby podejmowane w kierunku ulepszenia bądź zastąpienia bezpośrednich metod pozwalających wykryć włośnice metodami serologicznymi, których podstawę miała stanowić ELISA, rozpoczęto w latach 70. XX wieku [23]. Początkowo do badań używano antygenu somatycznego z larw wyizolowanych z mięśni. Jednak specyficzność ELISA była słaba, ze względu na pojawienie się krzyżowych reakcji, co znacznie obniżało wartość testu [24, 25]. W latach 80. XX wieku, specyficzność i czułość ELISA zostały zwiększone przez wykorzystanie antygenu ekskrecyjno-sekrecyjnego (ES) uzyskanego z hodowli larw mięśniowych *T. spiralis* prowadzonej *in vitro* [26].

Aby test diagnostyczny został uznany za wiarygodny i przydatny do wykrywania obecności specyficznych przeciwciał klasy IgG przeciw *T. spiralis* należy przeprowadzić jego walidację, czyli ocenę wartości diagnostycznej.

Oceniając test diagnostyczny należy dysponować testem referencyjnym, za pomocą którego wyznacza się liczbę osobników dodatnich i ujemnych [27]. Jakość metody referencyjnej determinuje dokładność, z jaką można dokonać oceny testu diagnostycznego. Dla prezentowanych badań immunoenzymatycznych testem referencyjnym była rekomendowana przez ICT metoda wytrawiania.

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. W literaturze można znaleźć kilka sposobów wyznaczania cut-off. Do najczęściej stosowanych należą: ROC, S/P% oraz M+3SD [13, 28, 29]. Stosowanie analizy ROC, w której należy dysponować wartościami absorbancji dla osobników pozytywnych i negatywnych, jest

ograniczone. Analiza ROC została użyta tylko w 3 przypadkach na 65 medycznych badań i tylko w 1 na 33 badania weterynaryjne [28]. Wyznaczenie cut-off przy pomocy współczynnika S/P% jest możliwe i wiarygodne jedynie w przypadku dysponowania referencyjnymi surowicami kontrolnymi (ujemnymi i dodatnimi) i stosowane jest głównie w dostępnych diagnostycznych zestawach komercyjnych. Natomiast M+3SD stosuje się zwykle w przypadku posiadania dużej liczby surowic od zwierząt wolnych od badanego patogenu.

Ocena specyficzności ELISA wykonywana przez innych badaczy dokonywana była w oparciu o badanie surowic świń wolnych od inwazji *T. spiralis*, lecz zarażonych innymi pasożytami jak: *Ascaris suum*, *Eimeria* spp., *Balantidium coli*, *Sarcocystis* spp., *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Metastrongylus* spp., *Trichuris suis*, *Oesophagostomum* spp., *Macracanthorhynchus hirudinaeus* [30]. W badaniach tych antygen ES L1 *T. spiralis* nie wykazywał reaktywności krzyżowej z antygenami innych pasożytów. Podobny wynik uzyskano w badaniach własnych, gdzie do oceny specyficzności procedury wykorzystano surowice 248 świń, u których w ubojni, rekomendowaną metodą wytrawiania, nie stwierdzono obecności larw *T. spiralis*, natomiast metodą koproskopową stwierdzono inne pasożyty. Żadna z badanych surowic nie dawała reakcji pozytywnej z trzema antygenami ES L1 *T. spiralis* i na tej podstawie wyznaczono specyficzność testu (100%).

Analiza czułości procedur wyznaczonych w badaniach własnych potwierdziła dane literaturowe, które mówią, że wartość ta zależy nie tylko od sposobu wyznaczania punktu odcięcia [30]. Niezwykle ważny jest również wspomniany wcześniej sposób interpretacji wyników [15]. Czułość metody ELISA jest determinowana przez zestaw surowic pochodzących z zarażenia doświadczalnego [10]. W badaniach własnych wykorzystano surowice pozyskane od zwierząt doświadczalnych dwukrotnie kontrolowanych przed zarażeniem (18 surowic ujemnych). Wykorzystując kompletny panel surowic (n=99) wyznaczono odpowiednie, analizowane powyżej czułości procedur. Gdyby pominąć w obliczeniach 9 surowic ujemnych (n=90), wówczas wyliczone czułości byłyby zupełnie inne.

Niezwykle ważne w opracowaniu ELISA w celu wczesnego wykrywania przeciwciał jest zastosowanie odpowiedniego antygenu. Zarlenga i Gamble [31] wykazali, że u świń zarażonych *T. spiralis* najwyższą wartość diagnostyczną ma antygen ekskrecyjno-sekrecyjny.

cyjno-sekrecyjny L1. Chociaż, jak wskazują liczne badania, antygen somatyczny L1 *T. spiralis* może być bardziej przydatny do wczesnego diagnozowania świń zarażonych *T. spiralis*, to natura tego antygeny wpływa na występowanie licznych reakcji fałszywie pozytywnych [7, 12, 26].

Uzyskane wyniki wskazują, że wykorzystywane antygeny, przy stosowaniu jednakowej procedury testu, generują różne wartości OD. Dlatego też, jak wynika z badań prowadzonych w projekcie unijnym TRICHIPORSE, procedura otrzymywania antygenów winna być ujednolicona, co gwarantowałoby utrzymanie stężenia białka na tym samym poziomie. Indywidualne wartości OD oraz średnie dla grupy, uzyskane przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis* oraz Ag ES L1 *T. spiralis* (N) były zbliżone. Natomiast stosując Ag ES L1 *T. spiralis* (W) uzyskiwano wyższe wartości OD, szczególnie w okresie 30-60 dpz. Przyczynę tych różnic można upatrywać w niezbyt precyzyjnym oznaczeniu stężenia białka, bądź w stosowaniu nieznacznych technicznych różnic podczas otrzymywania antygenów.

W oparciu o opracowaną własną procedurę ELISA prześledzono dynamikę odpowiedzi immunologicznej świń zarażonych doświadczalnie trzema dawkami L1 *T. spiralis* z wykorzystaniem antygenów otrzymanych w trzech różnych ośrodkach. Wyniki uzyskane dla 3 antygenów oraz surowic od zwierząt zarażonych najwyższą dawką 20 000 L1 *T. spiralis*, wykazały wysoką przydatność Ag ES L1 *T. spiralis*. Wczesna detekcja przeciwciał przy pomocy Ag ES L1 *T. spiralis* mogła być warunkowana „naturą” antygeny. W procedurze jego otrzymywania zastosowano 100x niższe stężenia penicyliny i 10x niższe stężenie streptomycyny. Dodatkowo na aktywność antygeny mogła mieć wpływ mniejsza liczba larw hodowanych w 1 ml płynu hodowlanego. Wysokie stężenie antybiotyków oraz przegęszczenie hodowli może mieć supresyjny wpływ na uwalnianie antygenów.

Poziom przeciwciał IgG w grupie zarażonej najwyższą dawką larw L1 badany względem antygeny Ag ES L1 *T. spiralis* (N) oraz Ag ES L1 *T. spiralis* (W) był zbliżony do poziomu uzyskanego przy zastosowaniu Ag ES L1 *T. spiralis*, jednakże pojawienie się przeciwciał było opóźnione w czasie. Natomiast charakter odpowiedzi immunologicznej świń zarażonych małą dawką, 200 L1 *T. spiralis* wskazuje, że Ag ES L1 *T. spiralis* oraz Ag ES L1 *T. spiralis* (W) mają jednakową wartość diagnostyczną.

Ocena dynamiki odpowiedzi immunologicznej oznaczonej przy pomocy trzech antygenów przepro-

wadzona metodami statystycznymi wskazuje na jej dużą powtarzalność. Dodatkowo wyniki uzyskane dla trzech antygenów potwierdzają zależność między wielkością dawki inwazyjnej a poziomem przeciwciał [25, 29, 32]. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż we wszystkich przypadkach w ostatnim okresie badań obserwowano tendencję wzrostową badanego poziomu przeciwciał.

Badania z wykorzystaniem ELISA służące do oceny dynamiki przeciwciał klasy IgG były tematem wielu wcześniejszych prac. Jednakże porównanie wyników własnych z opublikowanymi wcześniej nastręcza wiele trudności. Jest to spowodowane odmiennym typem zwierząt doświadczalnych, szerokim zakresem dawek inwazyjnych (50-20 000 L1) oraz różnymi procedurami testu. Gamble i wsp. [26] używając świń rasy Yorkshire lub Hampshire x Yorkshire, stwierdzili obecność specyficznych IgG między 15 a 20 i 25 dpz u świń zarażonych odpowiednio dawką 10 000 larw i 500 larw na zwierzę. W badaniach Smitha [33] najwcześniej przeciwciała klasy IgG były wykryte 30 dpz w przypadku zarażenia świń dawką 1500 larw, natomiast u świń zarażonych dawką 100 larw dopiero 86 dpz. Autor uważa, że tak późna odpowiedź mogła być spowodowana słabą inwazyjnością użytych do zarażenia larw. Badania Smitha [34] wykazały, że zarażenie świń dawką 15 400 larw indukuje pojawienie się przeciwciał klasy IgG znacznie wcześniej, bo 22 dpz.

Wyniki urzędowego badania zwierząt rzeźnych wskazują, że każdego roku w Polsce ubojowi poddawanych jest kilka milionów świń domowych, a odsetek zarażonych zwierząt wynosił 3,6/1000000 w 2003 roku oraz 1,4/1000000 w 2004 roku. Natomiast odsetek zarażonych dzików był znacznie wyższy i wynosił odpowiednio 2003r. — 3,1/1000 i w 2004 r. — 3,2/1000 [35, 36]. W Polsce do wykrywania obecności włośni stosuje się przede wszystkim metodę wytrawiania. Mimo iż ELISA znana jest od ponad 30 lat, do tej pory nie była wykorzystywana do kompleksowych badań w kierunku włośnicy u świń domowych i dzików [23]. Zaprezentowane wyniki wskazują nie tylko na zależność między wykorzystanym antygenem a wynikiem testu ELISA, ale również na przydatność tej procedury do wczesnego diagnozowania inwazji włośni u świń. Jednakże tylko wybór jednakowych testów referencyjnych zwanych w literaturze „gold standard” we wszystkich laboratoriach diagnostycznych, opracowanie i zatwierdzenie jednakowej procedury otrzymywania antygenów, wyeliminowanie różnic wyni-

kających z interpretacji wartości cut-off czy ograniczenie manipulacji wynikami pośrednimi [15] doprowadzi do standaryzacji ELISA.

Literatura

- [1] Dupouy-Camet J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology* 93: 191-200.
- [2] Pozio E. 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary Parasitology* 98: 133-148.
- [3] Ramisz A., Szymborski J., Balicka-Ramisz A. 1997. Epidemiological and epizootiological problems of trichinellosis in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 43: 297-301.
- [4] Ramisz A., Szymborski J., Balicka-Ramisz A. 2001. Trichinellosis in swine and wild boars in Poland from 1993-1998. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 233-235.
- [5] Gołąb E., Sadowska-Todys M. 2003: Współczesne problemy epidemiologii i diagnostyki włośnicy w krajach Unii Europejskiej i w Polsce. *Przegląd Epidemiologiczny* 57: 561-570.
- [6] Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Malczewski A. 2004. Włośnica u zwierząt wolno żyjących i świń w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna* 60: 80-83.
- [7] 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.
- [8] Oliver D.G., Singh P., Allison D.E. 1988. Trichina detection techniques as applied to a high-speed slaughterhouse environment. *Agri Practice* 6: 45-48.
- [9] Murrell K.D., Anderson W.R., Schad G.A., Hanbury R.D., Kazacos K.R., Brown J., Gamble H.R., 1986. Field evaluation of the ELISA test for swine trichinosis: efficacy of the excretory-secretory antigen. *American Journal of Veterinary Research* 47: 1046-1049.
- [10] 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.
- [11] Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- [12] Pozio E., Sofronic-Milosavljevic L., Gomez-Morales M.A., Boireau P., Nöckler K. 2002. Evaluation of ELISA and Western Blot Analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Veterinary Parasitology* 108: 163-178.
- [13] Chapa-Ruiz M.R., Salinas-Tobon M.R., Martinez-Maranon R., Cedillo R., Garcia-Latorre E. 1989. Diagnosis of human trichinellosis by indirect enzyme linked immunosorbent assay. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 31: 136-139.
- [14] www.infecepi.unizar.es/pages/ratio/soft_sp.htm
- [15] Greiner M., Gardner I.A., 2000. Epidemiological issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 3-22.
- [16] Gajadhar A.A., Gamble H.R. 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology* 93: 183-189.
- [17] www.med.unipi.it/ict/statursp.html
- [18] www.pzh.gov.pl/biblioteka/index.html#5
- [19] Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Bień J. 2005. Włośnica u zwierząt wolno żyjących stałym zagrożeniem zdrowia ludzi w Polsce. *Kosmos* 54: 95-103.
- [20] van Knapen F., Franchimot J.H., Ruitenber E.J., Baldelli B., Gibson T.E., Gottal C., Henriksen S.A., Köhler G., Skovgaard N., Soule C., Taylor S.M. 1980. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology* 7: 109-121.
- [21] Gamble H.R. 1996. Trichinellosis. In: *OIE, Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. List A and B Diseases of Mammals, Birds and Bees*. Office International des Epizooties, Paris: 477-480.
- [22] Nöckler K., Pozio E., Voigt W.P., Heidrich J. 2000. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary Parasitology* 93: 335-350.
- [23] 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 WHO* 51: 108-109.
- [24] Ruitenber 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.
- [25] Ruitenber 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. 2000. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 45: 23-41.
- [29] Nöckler K., Serrano F.J., Boireau P., Kapel C.M.O., Pozio E. 2005. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vete-*

- rinary Parasitology* 132: 85-90.
- [30] Serrano F., Perez E., Reina D., Navarrete I. 1992. *Trichinella* strain, pig race and other parasitic infections as factors in the reliability of ELISA for the detection of swine trichinellosis. *Parasitology* 105: 111-115.
- [31] Zarlenga D.S., Gamble H.R. 1990. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *T. spiralis* muscle larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology* 42: 165-174.
- [32] Kapel C.M.O., Webster P., Lind P., Henriksen S., Murrell K.D., Nansen P. 1998: *Trichinella spiralis*, *T. britovi* and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection in pigs. *Parasitology Research* 84: 264-271.
- [33] Smith H.J. 1987. Evaluation of the ELISA for the serological diagnosis of trichinosis in Canadian swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 5: 194-197.
- [34] Smith H.J. 1988. Comparison of pepsin-digestion and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of trichinosis in swine. *Canadian Journal of Veterinary Research* 52: 63-66.
- [35] Sprawozdanie z wyników urzędowego badania zwierząt rzeźnych, mięsa, drobiu, dziczyzny i królików za rok 2003. GIW 2003.
- [36] Sprawozdanie z wyników urzędowego badania zwierząt rzeźnych, mięsa, drobiu, dziczyzny i królików za rok 2004. GIW 2004.

Wpłynęło 2 czerwca 2006

Zaakceptowano 17 lipca 2006