

## Badanie przydatności testu ELISA do wczesnego diagnozowania inwazji z rodzaju *Trichinella* u świń

### The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella* spp. infection in pigs

Justyna Bień

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 24 października 2006 r.

Promotor: doc. dr hab. Bożena Moskwa  
Recenzenci: prof. dr hab. Tadeusz H. Dzbeński  
prof. dr hab. Andrzej B. Sadzikowski

**ABSTRACT.** Trichinellosis is a parasitic zoonosis transmitted to humans through consumption of raw or undercooked meat from animals infected with nematodes of the *Trichinella* genus. Every year seropositive cases are found among the human population and thus trichinellosis still remains an epidemiologically important disease.

The first step of the study was the optimization of a new ELISA method enabling an early and specific serological diagnosis of trichinellosis in pigs and wild boars using excretory-secretory (ES) antigens obtained from *in vitro* cultures of L1 *T. spiralis*. Serum samples were assayed for anti-*T. spiralis* IgG antibodies using the new ELISA protocol and a reference test — Standard manufactured by Institut Pourquier. The optimization involved the selection of suitable plates for antigen coating, dilution of sera and antibodies and their time of incubation. On the basis of the optimization a new ELISA procedure for the detection of IgG and IgM against *T. spiralis* was elaborated.

Conventional, Iberian pigs and SPF (Specific Pathogen Free) 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 against excretory-secretory L1 *T. spiralis* antigens. Serum samples were obtained from the EU project Trichiporse: „Safe pork and horse meat on EU markets: early and unbiased diagnostic tests for *Trichinella*”.

Field samples of conventional pigs (1474) and wild boars (1784) were obtained from slaughter houses in different parts of Poland. Pigs were examined for the presence of *Trichinella* spp. using the artificial digestion method. Only four pigs were naturally infected with *T. spiralis*, the remaining were *Trichinella* larvae free.

ELISA was used to examine IgG levels against L1 *T. spiralis* in pig and wild boar sera. The usefulness of ELISA for anti-IgG detection in pigs is usually limited by the nature of the antigen. The antigens were prepared in different laboratories: in Germany — Ag ES L1 *T. spiralis* (N), Italy — Ag ES L1 *T. spiralis* (W)) and in Poland — Ag ES L1 *T. spiralis*. Cut-off values for ELISA along with the estimated sensitivity and specificity were calculated using different methods: S/P%, M+3SD and ROC (Receiver Operating Characteristic). In SPF and Iberian pigs inoculated with 200, 1000 and 20,000 L1 *T. spiralis*, specific antibodies were detected 40, 30 and 25 dpi, respectively, with the use of the Standard (reference test). The analysis of the two ELISA procedures demonstrated a high sensitivity and specificity for the newly elaborated test utilizing the Ag ES L1 *T. spiralis*. In conventional pigs infected with 20,000 L1 *T. spiralis* specific antibodies were detected from 20 dpi when employing the new protocol. Similar results for the Standard and new ELISA test were obtained for serum samples of conventional pigs infected with 200 and 1000 larvae, which became positive from 40 dpi and 30 dpi, respectively. The results showed that both: the Standard and new protocols were comparable, and based on this, the new test was applied for further research.

Results obtained adopting the new protocol with three antigens showed that two of them: Ag ES L1 *T. spiralis* (W) and Ag ES L1 *T. spiralis* are similar. The specific IgG antibodies for infective doses of 200 and 1000 larvae for these antigens were detectable 40 and 30 dpi respectively. In pigs infected with the highest dose of *T. spiralis* larvae IgG anti-

bodies were detectable from 20 dpi when Ag ES L1 *T. spiralis* was used. These results strongly indicate that in examined pigs, the specific IgG response to *T. spiralis* infection is dose dependant.

Of 1474 examined pig sera only 0.99% gave a positive signal against ES L1 *T. spiralis* antigen. Of 1784 examined wild boars sera only 0.68 % gave positive results using the new ELISA protocol.

ELISA is a useful method for detecting specific IgG antibodies in pigs experimentally infected with different doses of *T. spiralis* and naturally infected pigs. In pigs the specific IgG response is dose dependant. The Ag ES L1 *T. spiralis* increases the specificity of the method and reduces false positive results. Simultaneous use of both methods: digestion and ELISA for the diagnosis of *Trichinella* in naturally infected pigs and wild boars may increase the chances of eliminating meat infected with *T. spiralis* larvae.

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

Włośnica jest poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego w wielu rejonach naszego globu. Na terenie Polski przypadki zachorowań ludzi na włośnicę notowane są każdego roku, pomimo istnienia przepisów dotyczących obowiązku badania zwierząt rzeźnych i mięsa oraz nadzoru sanitarnego nad produkcją żywności. Głównym źródłem zarażenia dla człowieka jest wieprzowina i mięso z dzika. Pomimo wprowadzenia obowiązku badania każdej sztuki mięsa zalecanymi metodami (metoda wytrawiania), nie jesteśmy w stanie uchronić społeczeństwa przed zarażeniem włośniem ze względu na nieprawidłowe wykonywanie badań, bądź nawet ich zaniechanie.

Pierwsze próby w kierunku ulepszenia metod bezpośrednich (trychinoskopii i trawienia) metodami serologicznymi, których podstawę miała stanowić metoda ELISA, prowadzono już w latach 70. i 80. XX wieku. Jednak wprowadzenie metody ELISA do rutynowych badań weterynaryjnych jest sprawą nadal otwartą ze względu na obowiązujące przepisy prawne.

Część badań prowadzona była w ramach projektu TRICHIPORSE, dlatego surowice od świń konwencjonalnych i SPF zarażonych doświadczalnie trzema dawkami *T. spiralis* (200 L1, 1000 L1, 20.000 L1) pochodziły od partnerów z Niemiec i Hiszpanii. Materiał własny stanowiły surowice od świń i dzików z różnych rejonów Polski, pozyskane z wojewódzkich Inspektoratów Sanitarnych oraz z PIWET w Puławach. Surowice pochodziły od zwierząt, które w badaniu poubojowym zostały uznane za wolne od włośni, z wyjątkiem 4 tuszek, u których stwierdzono larwy włośni. W badaniach wykorzystywano antygeny ekskrecyjno-sekrecyjne otrzymywane w trzech laboratoriach: w Niemczech — Ag ES L1 *T. spiralis* (N), Włoszech — Ag ES L1 *T. spiralis* (W) i w Polsce — Ag ES L1 *T. spiralis* oraz antygen somatyczny Ag S L1 *T. spiralis*.

W badaniach wykorzystano udostępnioną przez

konsorcjum TRICHIPORSE procedurę Standard ELISA do wykrywania przeciwciał klasy G u świń oraz własną procedurę opracowaną w IP PAN do wykrywania przeciwciał klasy M i G.

Elementem poprzedzającym wprowadzenie do badań metody ELISA było przeprowadzenie optymalizacji, która dotyczyła wyboru odpowiednich płytek do opłaszczenia antygenem, rozcieńczeń reagentów, doboru odpowiednich koniugatów, ich rozcieńczeń oraz czasu inkubacji z poszczególnymi reagentami. Optymalizacja pozwoliła na opracowanie własnych procedur pozwalających na wykrywanie przeciwciał klasy M i G przeciw *T. spiralis*. Następnie przeprowadzono częściową walidację testu, czyli ocenę wartości diagnostycznej poprzez oszacowanie czułości i specyficzności testu. Oceniając czułość testu zastosowano 3 metody wyznaczania granicy pozytywności (cut-off): M+3SD, S/P% (zalecana przez producenta) i ROC. Do wyznaczenia specyficzności zastosowano surowice od zwierząt, u których w badaniach poubojowych nie stwierdzono włośni.

Procedura Standard posłużyła do zbadania obecności przeciwciał IgG w surowicach od świń konwencjonalnych i SPF. W obu grupach zwierząt IgG pojawiają się odpowiednio: 40 dpz dla dawki 200 L1, 30 dpz dla 1000 L1 oraz 25 dpz dla dawki 20.000 L1. W końcowej fazie doświadczenia (60 dpz) obserwowano tendencję wzrostową poziomu przeciwciał.

Własna procedura ELISA oraz 3 antygeny ES L1 *T. spiralis* posłużyły do prześledzenia dynamiki przeciwciał IgG w surowicach od świń konwencjonalnych. Stosując Ag ES L1 *T. spiralis* (N), IgG stwierdzono w 50 dpz w grupie zwierząt zarażonych dawką 200 L1. Ag ES L1 *T. spiralis* (W) i własny Ag ES L1 *T. spiralis* wykrywały IgG wcześniej, bo już 40 dpz. Antygen włoski i własny uznano za równocenne w przypadku wykrywania IgG u zwierząt zarażonych dawką 1000 L1 *T. spiralis*. U świń zara-

zonych dawką 20.000 L1, zastosowanie Ag własnego pozwoliło wykryć IgG 20 dpz, natomiast Ag ES L1 *T. spiralis* (W) i Ag ES L1 *T. spiralis* (N) w 25 dpz. Uzyskane wyniki potwierdziły zależność pomiędzy dawką inwazyjną a poziomem przeciwciał.

Kolejnym etapem badań było porównanie wyników uzyskanych przy zastosowaniu procedury Standard i własnej, z wykorzystaniem surowic pochodzących od świń konwencjonalnych zarażonych trzema dawkami larw *T. spiralis*. Wykazano, że obie procedury są równocenne dla wykrywania IgG w grupie zwierząt zarażonych dawką 200 L1 i 1000 L1, natomiast dla dawki 20.000 L1 bardziej przydatny okazał się własny test. Analiza statystyczna wyników dla procedury Standard i własnej wykazała wysoce statystycznie istotną ich powtarzalność.

Zastosowanie antygeny somatycznego w badaniach dynamiki poziomu przeciwciał IgG pozwoliło na wcześniejsze wykrywanie przeciwciał w porównaniu z Ag ES L1 *T. spiralis*.

Dodatnie wyniki ELISA potwierdzono metodą Western Blot. Analizie poddano surowice od świń konwencjonalnych i SPF zarażonych eksperymentalnie oraz od czterech świń ze środowiska naturalnego, u których w ELISA uzyskiwano wysokie miano przeciwciał klasy IgG. Obserwowano pojawianie się charakterystycznych prążków, których liczba była zależna od dawki inwazyjnej.

Opracowana własna procedura do wykrywania przeciwciał klasy M pozwoliła na zbadanie ich dynamiki w obu grupach doświadczalnych zwierząt. W grupie zwierząt konwencjonalnych niewielki wzrost obserwowano pomiędzy 10 a 15 dpz tylko dla dawki 1000 L1 i 20.000 L1, natomiast u świń SPF między 5 a 20 dpz.

Surowice pochodzące od świń domowych i dzików badano na obecność przeciwciał IgG przy użyciu własnego testu ELISA. Dla każdej partii surowic granica pozytywności (cut-off) była wyznaczana

oddzielnie, stosując metodę M+3SD. Odsetek zarażonych świń wynosił 0,99%, natomiast dzików 0,78%. Uzyskane wyniki nieco odbiegają od oficjalnych danych opublikowanych w raportach GIW, a przyczyną różnic może być zdecydowanie mniejsza liczba przebadanych prób w stosunku do całkowitej liczby ubijanych rocznie zwierząt.

Powyższe wyniki pozwoliły na wysunięcie następujących wniosków. (1) ELISA jest przydatna do badania dynamiki humoralnej odpowiedzi immunologicznej świń zarażonych doświadczalnie L1 *T. spiralis* na podstawie obecności specyficznych przeciwciał klasy IgG. (2) ELISA jest przydatna do różnicowania odpowiedzi immunologicznej na podstawie obecności przeciwciał klasy IgG w zależności od dawki inwazyjnej. (3) Przeciwciała klasy IgM nie są dobrym markerem humoralnej odpowiedzi immunologicznej świń zarażonych *T. spiralis* i nie mogą służyć do monitorowania włośnicy. (4) Zastosowanie antygeny Ag ES L1 *T. spiralis* w ELISA zwiększa specyficzność metody i ogranicza występowanie wyników fałszywie pozytywnych. (5) Przydatność ELISA w diagnozowaniu włośnicy zwierząt zarażających się w warunkach naturalnych potwierdza możliwość jej wykorzystania w praktyce weterynaryjnej, jako metody uzupełniającej wytrawianie. (6) Równoległe stosowanie obu metod: wytrawiania i immunoenzymatycznej, wykorzystywanych do wykrywania inwazji *T. spiralis* u świń i dzików zarażających się w warunkach naturalnych, daje większą szansę na wyeliminowanie ze sprzedaży mięsa zawierającego larwy włośni.

Pierwsze cztery wnioski mają charakter naukowy, natomiast wnioski 5 i 6 mają charakter praktyczny. Jednak ich realizacja nie jest możliwa ze względu na obowiązujące ograniczenia prawne.

Wpłynęło 15 grudnia 2006

Zaakceptowano 19 grudnia 2006