

Laboratorijska dijagnostika trihineloze

Mario Sviben

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Odjel za parazitologiju

Ključne riječi: Trichinella, trihineloza, parazitološka dijagnostika

Uvod

Postavljanje točne i pouzdane dijagnoze infekcije nematodom roda *Trichinella* često je nemoguće na osnovi epidemioloških podataka.(1) Brojna su klinička stanja koja pokazuju sličnu simptomatologiju. (2-4) Stoga je etiološka, mikrobiološka-parazitološka dijagnostika infekcije jedina specifična i pouzdana.(2)

Mikrobiološka dijagnostika trihineloze može biti direktna i/ili indirektna. Direktnom dijagnostikom izravno se dokazuje uzročnik, dok je indirektna dijagnostika pokazatelj kontakta bolesnika s uzročnikom.(3) Pravilnim odabirom metoda moguće je postaviti ili odbaciti dijagnozu trihineloze.

Direktna dijagnostika trihineloze

Da bi se uzročnik trihineloze direktno dijagnosticirao moguće je učiniti **biopsiju mišića**. Iako se biopsija mišića u praksi rijetko radi, zbog praktičnosti, najčešće se bioptira deltoidni mišić, mada se može uzeti komadić bilo kojeg drugog skeletnog mišića. Kod uzimanja, kirurg treba odrezati komadić mišića veličine zrna graška bez masnog tkiva i kože, što predstavlja 0,2-0,5 grama mišićnog tkiva. Iz jedne polovice tkiva može se učiniti trihineloskopija ili umjetna digestija, dok drugi dio može poslužiti za histološku pretragu trajnim bojenjem preparata. Osjetljivost direktne dijagnostike proporcionalno ovisi o količini pregledanog uzorka.(5) U direktnu dijagnostiku trihineloze spada: trihineloskopija, histološki pregled i umjetna digestija uzorka, te nedavno uvedena molekularna dijagnostika.(2)

Trihineloskopija

Trihineloskopskim pregledom direktno se vizualiziraju ličinke trihinele, utvrđuje se intenzitet infekcije (broj ličinki po gramu pregledanog tkiva), a metoda ujedno omogućuje izdvajanje pojedine ličinke za molekularnu identifikaciju vrste ili genotipa.(6) Broj ličinki po gramu proporcionalan je težini infekcije. Do teške infekcije obično dolazi ako broj ličinki po gramu mišića premašuje 1000 ili više.(4,7)

Trihineloskopija je korisna za dijagnostiku sporadičnih slučajeva bolesti, u dijagnostici dvojbjenih slučajeva (atipični klinički tijek, odsustvo cirkulirajućih protutijela) i ponekad za korištenje u pravne svrhe (za slučaj naknade štete prouzročene infekcijom).(5)

Izvodi se na način da se uzorak mišića (ne veći do zrna riže) stisne između dva stakla kompresorija (koja se stisnu vijcima), a zatim se mikroskopira pod povećanjem od 100 puta. Treba pregledati čitav preparat od ruba do ruba. Veća je vjerojatnost da se nađu ličinke, ako se uzorak mišića uzme u kasnijem tijeku infekcije koji je karakteriziran stvaranjem vezivne čahure oko ličinke. U slučaju niske razine invazije mišića, moguće je izdavanje lažno negativnog nalaza.(2,5)

Histološki pregled uzorka

Histološkim pregledom mišićnog tkiva otkrivaju se dijelovi ličinki u različitim razvojnim stadijima i presjecima. Pregled pomaže i kod lakšeg uočavanja vezivne kapsule, kao i određivanja tipa staničnog infiltrata.

Bazofilna transformacija mišićnih stanica predstavlja pouzdani dijagnostički kriterij, čak i kada ličinke nisu otkrivene. Metoda je osjetljivija nego trihineloskopija jer omogućuje i nalaz malih ličinki koje se teško razlikuju od okolnih mišićnih vlakana.(8)

Umjetna digestija

Umjetnom digestijom imitira se prvi korak u prirodnoj infekciji trihinelom. Djelovanjem pepsina i solne kiseline koje djeluju kao stimulans iz mišića se oslobađaju ličinke. Sa dna posudice nakon 12 satne inkubacije u termostatu na 37 stupnjeva pokupi se talog i pregleda mikroskopski na prisustvo najčešće još živih larvi. Izdvojene larve mogu se ujedno koristiti za molekularnu tipizaciju. Da bi korištenje ove metode bilo smisljeno postupak se ne izvodi prije nego što prođe najmanje 3 tjedna od infekcije, jer bi u suprotnom osjetljive ličinke bile uništene. Za neinkapsulirane vrste (*T. pseudospiralis*) vrijeme inkubacije treba biti kraće.(6,9)

Molekularna dijagnostika

Morfološke karakteristike ličinki nisu dovoljne za identifikaciju vrste trihinele. Određivanje vrste važno

je epidemiološki za određivanje izvora infekcije, ali i klinički zbog tijeka bolesti. Za identifikaciju vrsti trihinela posebno su zaslužni Dick (1983)(10) i Pozio (1992)(11) svojim radovima na polju DNA tipizacije i izoenzimske analize. Bandi i suradnici (1993)(12) prvi su opisali korištenje RAPD (random amplified polymorphic DNA) metode za identifikaciju trihinela. Nakon njih brojni su drugi istraživači za identifikaciju vrste i genotipa uspješno koristili PCR (polymerase chain reaction), multiplex PCR, RFLP (restriction fragment length polymorphism) i RLB (reverse line blot) metodu. Navedene metode uglavnom se i dan danas koriste u istraživačke svrhe i nisu dio rutinske dijagnostike trihineloze.(13)

Serološke metode za dijagnostiku trihineloze

U rutinskom radu dijagnostika trihineloze najčešće se potvrđuje serološki.(5) Serološke metode baziraju se na dokazu specifičnih protutijela kod bolesnika. Budući da za razvoj protutijela treba određeno vrijeme, glavno ograničenje ovih metoda je da specifična protutijela uglavnom nisu prisutna na početku klinički simptomatske bolesti. Smatra se da se prvo pojavljuju protutijela klase IgE, koja slijede IgM, a zatim IgG protutijela. Zbog kratkog poluživota IgE protutijela u serumu, njihovo određivanje nije rutinsko. IgG protutijela pouzdan su pokazatelj kontakta s trihinelom. Najčešće su prisutna u serumu pacijenta više godina nakon simptomatske, ali i asimptomatske bolesti.(14-16)

U slučaju kliničke sumnje na trihinelozu, a kod dobivenog negativnog nalaza na protutijela u serumu, preporuča se test ponoviti za 1-2 tjedna. Pojava serokonverzije pouzdan je dokaz infekcije.(17)

Metodološki, brojne su serološke metode koje se koriste u dijagnostici: bentonit flokulacija, indirektni test florescence (IFA), protusmjerna imunoelektroforeza, lateks aglutinacija i enzimski imuno test (EIA). Standardna serološka dijagnostika danas bazira se na enzimskom imuno testu u kombinaciji s Western blot metodom za potvrdu pozitivnih EIA nalaza.(18)

EIA metoda je ekonomična, pouzdana, standardizirana i pruža prihvatljiv omjer osjetljivosti i specifičnosti. Jedina je serološka metoda koju preporuča Međunarodni ured za epizotije (Office International des Epizooties –OIE 2000.) za testiranje svinja.(19)

Za izradu seroloških testova moguće je korištenje nekoliko antigena. Kao prvi, početkom sedamdesetih godina prošlog stoljeća, korištene su metodom umjetne digestije trihineloznog mesa izolirane ličinke trihinele. Međutim zbog mogućnosti križnih reakcija s drugim parazitima (Toxocara sp., Anisakis, Loa loa)(20,21) testovi koji koriste takve antigene više se ne preporučuju. Tijekom osamdesetih godina specifičnost EIA testova poboljšana je korištenjem ekskretorno-sekretornih antigena dobivenih in vitro kultivacijom ličinki trihinela.(23)

Novije znanstvene spoznaje govore u prilog o TSL (tyveloznom) antigenu kao predominantnom antigenom epitopu imunološki prepoznatom u čovjeka. TSL antigeni pronađeni su na kutikuli parazita, no također i bivaju aktivno lučeni u mišićima. Za dijagnostičku upotrebu proizvode se in vitro kultivacijom ličinki ili sintetski. TSL antigeni zajednički su svim vrstama i genotipovima trihinele tako da ih nije moguće koristiti za vrsta-genotip diferencijaciju.(24)

Korištenje u testu tyveloznih antigena dovelo je do povećanja specifičnosti testa, ali smanjilo osjetljivost.(25) EIA test koji koristi ekskretorno-sekretorni antigen pokazao se je osjetljivijim.

Druga najčešće korištena serološka metoda je IFA. Kao antigen kod ove metode koriste se rezovi inficiranog mišića ili formalinom fiksirane čitave ličinke. Test se može koristiti za detekciju svih relevantnih klasa imunoglobulina. Kod ove metode IgM protutijela su zabilježena pozitivna i nekoliko godina nakon infekcije. Lažno pozitivni nalaz ne može se uvijek isključiti, posebno kod ljudi s autoimunim bolestima. Zbog toga se preporuča svaki pozitivan rezultat potvrditi EIA testom ili Western blot metodom. IFA test ne smije se proglašavati pozitivnim u slučajevima kada ličinka ne svijetli čitavom kutikulom. Sekundarno bojenje Evans modrilom smanjuje lažno pozitivne rezultate i pospješuje „čitanje“ preparata.(26)

Kao uzorak za serološko ispitivanje najčešće se koristi serum. Moguće je kao uzorak koristiti i plazmu, punu krv i ostale tkivne tekućine.

Nakon uzimanja krvi u epruvetu bez antikoagulansa, krv se ostavi da se zgruša, nakon čega se serum odvoji od staničnih komponenti. Ako se serum ne koristi odmah za testiranje preporuča se spremati u ledenicu na -20 stupnjeva do tri mjeseca. U slučaju potrebe dužeg spremanja, može se zamrznuti na -80 stupnjeva ili liofilizirati. Ako zamrzavanje nije moguće serumu se može dodati 1% merthiolat u razrjeđenju 1:10 000. Treba izbjegavati opetovano odmrzavanje i zamrzavanje seruma jer to može rezultirati padom titra protutijela.(27)

Lungström u svojem radu izdvaja tri glavna cilja imunodijagnostike trihineloze(28):

- 1.prepoznavanje akutne bolesti koje će omogućiti ranu antihelmintnu terapiju
2. retrospektivnu analizu infekcije
- 3.informacije o epidemiologiji infekcije

Do serokonverzije kod T.spiralis infekcije obično dolazi između drugog i četvrtog tjedna infekcije, a vrijeme potrebno za pojavu detektabilnih vrijednosti protutijela obično je razmjerno infektivnoj dozi. Razina protutijela ne mora nužno kolerirati s kliničkim tijekom infekcije. Nalaz IgG protutijela u serumu pacijenta moguć je tijekom čitavog života pacijenta dok se zanimljivo i IgM protutijela kod nekih pacijenata mogu detektirati i više godina nakon akutne bolesti.(29)

Kod infekcije vrstom *T. britovi* do serokonverzije dolazi obično za desetak tjedna, dok je kod infekcije vrstom *T. nativa* seropozitivitet nakon četiri i deset tjedana 45 i 87 %.

Za praćenje uspjeha antihelminthnog liječenja u osoba koje su „uhvaćene“ dovoljno rano da bi takvo liječenje bilo uspješno preporuča se praćenje kinetike protutijela. Kod infekcije vrstom *T. britovi* cirkulirajuća protutijela uglavnom nestanu za šest mjeseci, a nakon tri godine svi inficirani su seronegativni. Kod infekcije *T. spiralis* protutijela su često prisutna više godina nakon infekcije (u literaturi su zabilježeni slučajeva pozitiviteta više od dvadeset godina). Suprotno je kod osoba kod kojih je primjenjena antihelminthna terapija unutar dva tjedna nakon infekcije kada protutijela uglavnom nestaju u kratkom vremenu.(30,31)

Serološke metode ne mogu se koristiti za razikovanje vrste kojom je bolesnik inficiran. Iako postoje male razlike u imunološkom odgovoru na različite trihinele, one su uglavnom povezane s kinetikom pojave protutijela.(5,9,31-34)

Zaključak

Infekcija trihinelom i dan danas ima važan javno zdravstveni značaj. Prvenstveno je to zbog epidemijskog potencijala infekcije. U kontroli bolesti svakako je najvažnija primarna prevencija odgovarajućim držanjem životinja i veterinarskom kontrolom njihovog mesa. Pravodobna i točna dijagnostika posebice je važna zbog primjene adekvatne specifične terapije i kao pomoć u epidemiološkom nadzoru bolesti. Jedina specifična dijagnostika trihineloze je ona mikrobiološka-parazitološka. Na tržištu postoji velik izbor metoda različite primjenjivosti, osjetljivosti, specifičnosti, zahtjevnosti i cijene. Odabir testa prvenstveno bi trebao ovisiti o populaciji koju istražujemo, kao i opremljenosti i mogućnosti laboratorija i laboratorijskog osoblja koje tu dijagnostiku izvodi. Na Odjelu za parazitologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo trihinelozu se detektira direktnim metodama koje uključuju trihineloskopiju, histološki pregled i umjetnu digestiju mišića pacijenta i inkriminiranog mesa, te i serološkom dijagnostikom koja se temelji na nalazu specifičnih protutijela IgM i IgG klase. O odabiru testa često se konzultira s kliničarem ili epidemiologom na osnovi kliničkih i/ili epidemioloških podataka koji su često iznimno važni i korisni.

Literatura

1. Orihel TC, Ash LR. Tissue heminits. U: Murray PR, Baron JE, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, White
2. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4. izd. Washington DC: ASM Press; 2001.
3. Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. Human Parasitology. 3. izd. Burlington: Elsevier; 2005.
4. Maguire JH. Diseases due to parasites. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ur. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier; 2005: str. 3258-3315
5. Camet JD, Kociecka W, Bruschi F, Fernandez FB, Pozio E. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. Expert Opin Pharmacother 2002; 3 (8): 1117-1130.
6. Zarlenga DS, La Rosa G. Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within the genus *Trichinella*. Vet Parasitol 2000; 93: 279-292.
7. Pawlowski ZS. Clinical aspect in man. U: *Trichinella* and trichinosis. New York: Campbell WC; 1983. str. 367-401.
8. Wranicz MJ, Gustowska L, Gabryel P, Kucharska E, Cabaj W. *Trichinella spiralis* induction of the basophilic transformation of muscle cells by synchronous newborn larvae. Parasitol Res 1998; 84: 403-407.
9. Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K. International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. Vet Parasitol 2000; 93: 393-408.
10. Dick TA. Species and intraspecific variations in *Trichinella* and Trichinellosis. U: New York and London Plenum Press; 1983. str. 31-73.
11. Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD. Biological characterisation on *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J Parasitol 2003; 78: 647-653.
12. Bandi C, La Rosa G, Comincini S, Damiani G, Pozio E. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. Parasitology 1993; 107: 419-424.
13. Mitreva M, Jasmer PD. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. U. Worm book. The *C. elegans* Research Community. 2006; 1-21.
14. Van Knapen F, Franchimont JH, Verdonk AR, Stumpf J, Undeutsch K. Detection of specific immunoglobulins levels in human trichinosis by means of the enzyme linked immunosorbent assay. Am J trop Med Hyg 1982; 31: 973-976.
15. Ljungström I. Immundiagnosis in man. U: *Trichinella* and trichinosis. New York: Campbell WC; 1983, str. 403-424.
16. Bruschi F, Tassi C, Pozio E. Parasite specific antibody response in *Trichinella* sp. Human infection. Am J Trop Med Hyg 1990; 43: 186-193.
17. Bruschi F, Moretti A, Wassom D, Piergili Fioretti D. The use of a synthetic antigen for serological diagnosis of human trichinellosis. Parasite 2001; 8: 141-143.

18. Andiva S, Yera H, Haeghebaert S, Tourte-Schaeffer C, Magnaval JF, Dupouy-Camet J. Comparative evaluation of a latex agglutination test, two Elisa kits and a westernblot kit for the serodiagnosis of human trichinellosis. *Ann Biol Clin* 2002; 60: 79-83.
19. Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K i sur. X. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology* 2000; 93: 393-408.
20. Office International des epizooties. Quality standards and guidelines for veterinary laboratories: Infectious diseases. Paris, France; 2002, str. 1-63.
21. Pozio E, Varese P, Gomez Morales MA, Croppo GP, Pelliccia D, Bruschi F. Comparison of human trichinellosis by *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*. *Am J trop Med Hyg* 1993; 48: 568-575.
22. Gamble HR, Anderson WR, Graham CE, Murrell KD. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet Parasitol* 1983; 13: 349-361.
23. Appleton JA, Bell RG, Homan W, Van Knapen F. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol Today* 1991; 7: 190-192.
24. Bruschi F, Moretti A, Wassom D, Piergili-Fioretti D. The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite* 2001; 8: 141-143.
25. Nöckler K, Voigt WP. Comparison of methods for the diagnosis of trichinellosis. U: Ortega-Pierres G, Gamble HR, Van Knapen F, Wakelin D, ur. *Trichinellosis*. Nonoalco Tlateloco. Mexico: Germar Press; 1997, str. 319-323.
26. Brzosko W, Gancarz Z, Nowoslawski A. Immunofluorescence in the serological diagnosis of *Trichinella spiralis* infection. *Experim Med Microb* 1965; 17: 355-365.
27. Gamble HR, Patrascu IV. Whole blood, serum and tissue fluids in an EIA for swine trichinellosis. *J Food Protect* 1996; 59: 1213-1217.
28. Ljungström CMO. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet Parasitol* 2000; 93: 263-278.
29. Murrell KD, Bruschi F. Clinical trichinellosis. U: Sun T, ur. *Progress in Clinical Parasitology*. Boca Raton: CRC Press; 1994; str. 117-150.
30. Schellenberg RS, Tan BJK, Irvine JD, Stockdale DR, Gajadhar AA, Serhir B i sur. An outbreak of trichinellosis due to consumption of bear meat infected with *Trichinella nativa* in 2 northern Saskatchewan communities. *J Infect Dis* 2003; 188: 835-843.
31. Pozio E, Varese P, Gomez Morales MA, Croppo GP, Pelliccia D, Bruschi F. Comparison of human trichinellosis caused by *trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 568-575.
32. Kapel CMO. Host diversity and biological characteristics of *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet Parasitol* 2000; 93: 263-278.
33. Kapel CMO, Gamble HR. Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol* 2000; 30: 215-221.
34. Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol* 2000; 93: 365-383.

Kontakt

Mario Sviben, dr.med. specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom
Hrvatski zavod za javno zdravstvo
Odjel za parazitologiju
Rockefellerova 2, Zagreb
+385 1 4863 268/269
e-mail: mario.sviben@hzjz.hr