

Primjena serologije mesnog soka u dijagnostici invazije protistom *Toxoplasma gondii* u klaonički obrađenih svinja



The use of meat juice serology in the diagnostics of invasive protist *Toxoplasma gondii* in slaughterhouse processed pigs

Fuštin, D., M. Kiš, D. Ovničević, T. Zubak, N. Zdolec*

Sažetak

56

Trenutačno obveznim makroskopskim pregledom mesa nije moguće detektirati najčešće uzročnike bolesti koji se prenose svinjskim mesom (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i *Toxoplasma gondii*), pa je nužno koristiti se odabranim epidemiološkim indikatorima rizika od farme do klaonice. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi seroprevalenciju *T. gondii* u mesnom soku, iz ošita svinja uzetog prilikom klaoničke obrade. Komercijalnim testom ELISA pretražen je ukupno 91 uzorak mesnog soka domaćih svinja, od kojih 54 potječu s 18 velikih svinjogojskih farmi te 37 iz 18 malih obiteljskih farmi. Protutijela za *T. gondii* pronađena su u 13 % svinja i na 17 % farmi. *T. gondii* seropozitivne svinje potjecale su samo s malih obiteljskih farmi ($P < 0,05$). Kategorija biosigurnosti farmi imala je utjecaj na seroprevalenciju *T. gondii*.

Ključne riječi: serologija, mesni sok, *Toxoplasma gondii*, svinje, klaonica

Abstract

Currently, mandatory macroscopic examination of meat cannot detect the most common pork-borne pathogens (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Toxoplasma gondii*), making it necessary to use selected epidemiological risk indicators from farm to slaughterhouse. Therefore, the aim of this study was to determine the seroprevalence of *T. gondii* in meat juice from pig diaphragms collected during processing at the slaughterhouse. A total of 91 meat juice samples from domestic pigs were analyzed using a commercial ELISA assay, of which 54 were from 18 large pig farms and 37 from 18 small family farms. Antibodies to *T. gondii* were found in 13% of the pigs and 17% of the farms. The *T. gondii* seropositive pigs were only from small family farms ($p < 0.05$). The biosecurity category of the farm had an influence on the seroprevalence of *T. gondii*.

Key words: serology, meat juice, *Toxoplasma gondii*, pigs

Dunja FUŠTIN, dr. med. vet., stručni suradnik, KRKA-FARMA d.o.o., Radnička cesta 48, 10000 Zagreb, Marta KIŠ, dr. med. vet., asistent, Zavod za higijenu tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Domagoj OVINČEVIĆ, dr. med. vet., ovlaštenu veterinar, Veterinarska stanica Valpovo, Tomislav ZUBAK, dr. med. vet., ovlaštenu veterinar, Veterinarska stanica Jastrebarsko, dr. sc. Nevijo ZDOLEC, dr. med. vet., redoviti profesor, Zavod za higijenu tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Dopsni autor: nzdolec@vef.hr

Uvod

Modernizacija postojećeg sustava inspekcije mesa nužna je u Europskoj uniji kako bi se poboljšala njezina opravdanost, izvedivost i isplativost u usporedbi s tradicionalnim načinom. Iako će praktično implementiranje novog predloženog sustava prevencije i kontrolnih metoda zasnovanih na utvrđivanju javnozdravstvenih rizika duž čitavog lanca proizvodnje mesa biti dug i izazovan pothvat, Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) predviđa mnogo mogućnosti i prilika (Blagojević i sur., 2021.). Premda se tijekom godina svrha inspekcije mesa nije promijenila, znatno su se promijenile prioritetne biološke i kemijske opasnosti koje utječu na sigurnost mesa. Trenutačno su prioritetne biološke opasnosti, prema provedenoj analizi rizika EFSA-e u proizvodnji mesa na razini farme i klaonice, bakterije *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, verotoksična *Escherichia coli* te paraziti *Trichinella* spp. i *Toxoplasma gondii* (EFSA, 2011.). Problem kontrole ovih bioloških opasnosti u lancu proizvodnje mesa jest njihova prisutnost u latentno inficiranih i invadiranih asimptomatskih životinja (EFSA, 2011.; Zdolec i Kiš, 2021.). S obzirom na njihovu ograničenu kontrolu u inspekciji mesa, osim za *Trichinella* spp., novi pristup koji se temelji na stvaranju dostatne baze podataka o seroprevalenciji tih uzročnika bolesti u svinja na farmi, mogao bi pomoći u kontroli i osmišljavanju intervencijskih mjera u klaonicama (Kiš i sur., 2021.a). Uzorkovanje ošita na liniji klanja i određivanje seroprevalencije više patogena iz jednog uzorka pokazalo se vrlo praktičnim i isplativim (Meemken i sur., 2014.). Tom je metodom primjerice nedavno utvrđena prevalencija *Salmonella* spp. u 48 % svinja i na 64 % farmi te *Yersinia* spp. u 13 % svinja na 28 % odabranih farmi u Hrvatskoj (n = 36), pri čemu nije bilo značajnih razlika u seroprevalenciji između velikih farmi svinja i obiteljskih gospodarstava (Kiš i sur., 2023.).

Sigurnost mesa bitno je uvjetovana farmskom praksom, odnosno provođenjem mjera sprečavanja unosa i/ili širenja uzročnika u populaciji svinja. Primjerice, održivost intenzivne svinjogojске proizvodnje u javnozdravstvenom smislu primarno se oslanja na stroge unutarnje i vanjske biosigurnosne mjere (Vučemilo i sur., 2004.). Manje, obiteljske farme s manjim brojem svinja i u pravilu lošijom farmskom praksom također zahtijevaju provođenje specifičnih biosigurnosnih mjera i drugih preventivnih postupaka. U Hrvatskoj je biosigurnosna kategorizacija svinjogojških farmi, tj. gospodarstava započela prije nekoliko godina i prvi su podaci pokazali da je oko 50 % njih u najnižoj kategoriji (Acinger-Rogić, 2019.).

Potrebno je naglasiti da neki specifični pokazatelji biosigurnosti i općenito upravljanje farmom, poput infrastrukture, ispusta i pristupa divljim životinjama, načina hranidbe i korištenja vode (bunarska ili javna), postupanje s otpadom, mjere deratizacije i dr. mogu utjecati i na prevalenciju spomenutih bioloških opasnosti u lancu proizvodnje svinjskoga mesa, uključujući *T. gondii* (Dewulf i van Immerseel, 2019.).

Stoga je cilj ovog rada bio istražiti seroprevalenciju *T. gondii* primjenom serološke pretrage mesnog soka ošita (uzorkovanog na liniji klanja) svinja iz različitih sustava držanja i biosigurnosnih statusa farmi, tj. gospodarstava.

Materijali i metode

Uzorkovanje

Uzorkovanje ošita svinja obavljeno je metodom jednostavnog nasumičnog odabira u lokalnim klaonicama (klaonica I i II) u razdoblju od rujna 2021. do ožujka 2022. Ukupno je pretražen 91 uzorak mesnog soka domaćih svinja, od kojih je 54 potjecalo s 18 velikih svinjogojških farmi te 37 s 18 seoskih domaćinstava. Uzorci su pohranjivani u sterilne vrećice i transportirani u prijenosnom hladnjaku u Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Kategorizacija farmi/gospodarstava s obzirom na biosigurnost temeljila se na službenom upitniku i registru farmi: kategorija 1 – ne udovoljavaju uvjetima; kategorija 2 – djelomično udovoljavaju uvjetima; kategorija 3 – u potpunosti udovoljavaju uvjetima; kategorija 4 – drže svinje na otvorenome i koja su odobrena od nadležnog veterinarskog inspektora.

Serološka pretraga mesnog soka

Priprema mesnog soka za detekciju protutijela komercijalnim ELISA kitovima

Uzorci ošita svinja s linije klanja mase oko 10 grama istog su dana uzorkovanja zamrznuti na -20 °C. Potom su premješteni u vrećice za homogenizaciju i odmrzavani pri 4 °C tijekom 24 h ± 4 h. Nakon prikupljanja 1 mL mesnog soka iz svakog uzorka mesni je sok pretočen u plastične kivete od 1,5 mL i ponovno zamrzavan na -20 °C do početka analize.

Postupak detekcije protutijela komercijalnim ELISA kitovima

Prisutnost IgG protutijela protiv protista *T. gondii* određena je komercijalnim ELISA dijagnostičkim kitom s inaktiviranim antigenom (Indical Bioscience GmbH, Germany). Uzorci mesnog soka razrjeđivani su u omjeru 1 : 10 prema uputi proizvođača. U jažice

mikrotitracijske pločice koje su obložene specifičnim antigenom dodano je 100 µL uzorka te je potom sve inkubirano na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon inkubacije jažice su ispirane tri puta s razrijeđenom otopinom za ispiranje (1 : 10) te je u svaku dodano 100 µL konjugata. Nakon inkubacije (30 minuta na sobnoj temperaturi) i drugog ispiranja, 100 µL TMB supstrata dodano je u svaku jažicu te su potom inkubirani na sobnoj temperaturi bez izlaganja svjetlosti. Reakcija je zaustavljena nakon 10 minuta dodavanjem 100 µL STOP otopine. Nakon cjelokupne procedure očitana je apsorbancija pomoću čitača mikroplačica (BioTek ELx800) i analizirana pomoću Gen5™ softvera (Bio-Tek Instruments, Inc.). Izračunat je S/P omjer za svaki uzorak te su uzorci sa S/P omjerom $\geq 0,3$ smatrani pozitivnim. S/P omjer upućuje na razinu protutijela u odnosu na izmjerenu pozitivnu i negativnu kontrolu. Nakon što je izračunata srednja vrijednost dobivenih apsorbancija za pozitivnu i negativnu kontrolu, S/P omjer uzorka izračunat je prema formuli: $S/P = (OD \text{ sample} - MV \text{ OD nc}) / (MV \text{ OD pc} - MV \text{ OD nc})$

- pri čemu je OD optička gustoća (engl. optical density), MV srednja vrijednost (engl. mean value), nc negativna kontrola (engl. negative control), a pc pozitivna kontrola (engl. positive control).

Statistička obrada

Statistička obrada rezultata provedena je pomoću računalnog programa TIBCO Statistica 13.5. Statistički značajne razlike u seroprevalenciji *T. gondii* s obzirom na veličinu farme i njezinu kategoriju biosigurnosti utvrđivane su Fisherovim egzaktnim testom na razini $P = 0,05$.

Rezultati

Ukupno je pretražen 91 uzorak mesnog soka domaćih svinja od kojih 54 uzorka potječu s 18 velikih svinjogojskih farmi na kojima je prosječno tovljeno 3793 svinje godišnje, te 37 uzoraka koji potječu s 18 seoskih domaćinstava koja prosječno drže osam svinja na gospodarstvu. Svinja se smatra seropozitivnom ako je S/P omjer uzorka veći ili jednak 0,3, dok se farma smatra pozitivnom ako je barem jedan uzorak na farmi seropozitivan. Rezultati serološke pretrage prikazani su u tablici 1 i tablici 2 prema tipu farme podrijetla i kategoriji biosigurnosti.

Od ukupno 91 pretraženog uzorka mesnog soka svinja 13 % bilo je pozitivno, tj. imalo je protutijela protiv *T. gondii*, pri čemu su sve seropozitivne svinje potjecale sa seoskih domaćinstava ($P < 0,05$). Od ukupnog broja farmi u istraživanju 17 % ih je pozitivno, odnosno svako treće seosko gospodarstvo (33 %).

Tablica 1. Seroprevalencija *T. gondii* u svinja koje potječu s velikih svinjogojških farmi i seoskih domaćinstava

	Pozitivne svinje		Pozitivne farme	
	n	%	n	%
Velike farme (n=18)	0	0	0	0
Seoska domaćinstva (n=18)	12	13	6	33
Ukupno	12	13	6	17

Tablica 2. Prikaz rezultata serološke pretrage mesnog soka s obzirom na kategoriju biosigurnosti farme

	Kategorija biosigurnosti farme (broj testiranih uzoraka)			
	1 (10)	2 (43)	3 (36)	4 (2)
Broj pozitivnih	1	11	0	0
Postotak pozitivnih	8	92	-	-
Ukupno	12	13	6	17

Seroprevalencija *T. gondii* razlikuje se između kategorija biosigurnosti farme. Naime u kategoriji 3 i 4 nisu pronađene pozitivne svinje, a u kategoriji 2 zamijećena je značajno veća seroprevalencija ($P < 0,05$).

Rasprava

Kvalitativnom procjenom rizika identificirano je da su *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *T. gondii* i *Trichinella* spp. najrelevantnije biološke opasnosti u inspekciji mesa svinja (EFSA, 2011.). Najveći je problem njihove kontrole prisutnost latentno inficiranih životinja koje na liniji klanja nije moguće otkriti rutinskom inspekcijom osim *Trichinella* spp. čija se prisutnost određuje kao sastavni dio post mortem pregleda (EFSA, 2011; Felin i sur., 2015.). Ipak, prisutnost rizika s obzirom na *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u mesu može se neizravno ispitati praćenjem njihove seroprevalencije serološkom pretragom mesnog soka. Tako su Kiš i suradnici (2021.a) utvrdili prevalenciju od 38 % u 92 testirane svinje (mesni sok) s 46 malih gospodarstava. Pritom je 89 % serološki pozitivnih svinja na *T. gondii* potjecalo

s gospodarstava niže kategorije biosigurnosti (kategorija 1 ili 2). Također, Kiš i suradnici (2021.a) izvijestili su o najvećoj seroprevalenciji na gospodarstvima koja drže tri do pet svinja. Od 23 seropozitivna gospodarstva u 48 % slučajeva najmanje je jedna svinja posjedovala protutijela na *T. gondii*, dok su na 52 % farmi sve testirane svinje bile pozitivne. Nadalje, pretraživanjem jednakog broja uzoraka mesnog soka divljih svinja (n = 92) zabilježena je seroprevalencija od 55 % (Kiš i sur., 2021.b).

U ovom su istraživanju protutijela za *T. gondii* utvrđena u 13 % svinja i na 17 % farmi. Ti rezultati odgovaraju pojedinim provedenim istraživanjima u Europi (Dubey i sur. 2009.; Villari i sur., 2009.; Foroutan i sur., 2019.). Iako bi uzgoj svinja u zatvorenim objektima trebao znatno pridonijeti smanjenju invazije svinja s *T. gondii* (Dubey i sur., 2009.), dokazana veća seroprevalencija na seoskim domaćinstvima u ovom istraživanju, koja većinom uzgajaju svinje u zatvorenim objektima bez ispusta, može se povezati s prisutnošću mačaka i glodavaca te neadekvatnom deratizacijom (Kijlstra i sur., 2008.; Villari i sur., 2009.). Prema ovom istraživanju svinje su sa svakog trećeg seoskog domaćinstva seropozitivne. Većina je pozitivnih uzoraka potjecala s farmi kategorije biosigurnosti 2, što znači da mjere biosigurnosti ne ispunjavaju uvjete u potpunosti na tim farmama, te bi trebalo razmotriti prikladnu reklasifikaciju kategorije biosigurnosti dodijeljene tim istim farmama (Kiš i sur., 2021.a). Iako je seroprevalencija *T. gondii* općenito bila niska, na nekim je farmama pronađena 100 %-tna seroprevalencija. Serološki bi nadzor u ovom slučaju omogućio identifikaciju farmi na kojima bi trebalo uvesti i unaprijediti postojeće biosigurnosne mjere. Veterinari bi te farme trebali posjećivati i savjetovati kako poboljšati biosigurnosne mjere, smanjiti rizik i povećati sigurnost mesa za potrošače. Trupove svinja s tako rizičnih objekata treba zamrznuti ili podvrgnuti toplinskoj obradi (Felin i sur., 2019.).

Zaključno, rezultati serološkog testiranja mesnog soka svinja mogu se preporučiti kao epidemiološki indikator u okviru podataka o lancu prehrane koji prate pošiljku životinja u klaonicu. Serološka pretraga mesnog soka brza je, jednostavna i lako izvediva metoda te moguć alat u upravljanju rizikom od ove zoonoze. Pritom nije primjenjiva ni isplativa u testiranju svake pojedine životinje upućene na klanje, već u kategorizaciji rizičnosti farmi na reprezentativnom uzorku. No serološko profiliranje farmi samo po sebi ne može biti jednostavno rješenje za donošenje odluka u upravljanju rizikom, ako procjena isključuje sve druge čimbenike rizika koji mogu biti odgovorni za pojavu uzročnika na farmi.

Zahvala

Istraživanje je financirano projektom *Unapređenje stručne prakse na farmskim životinjama i konjima na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu* – VETFARM (UP.03.1.1.04.0045).

Napomena

Rad je izvadak iz diplomskog rada Dunje Fuštin *Primjena serologije mesnog soka u kontroli Toxoplasma gondii, Salmonella spp. i Yersinia spp. u klaonici svinja* izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Nevija Zdoleca u Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je odobrilo Fakultetsko vijeće Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu (klasa: 640-01/21-02/12; ur. broj: 251-61-01/139-21-30).

Literatura

- ACINGER-ROGIĆ, Ž. (2019): Rezultati kategorizacije gospodarstava na kojima se drže svinje u odnosu na rizik od afričke svinjske kuge – prethodno priopćenje. Veterinarski dani (Primošten, 23.-26. listopada), Zbornik radova, Zagreb.
- BLAGOJEVIĆ, B., T. NESBAKKEN, O. ALVSEIKE, I. VÅGSHOLM, D. ANTIĆ, S. JOHLER, K. HOUF, D. MEEMKEN, I. NASTASIJEVIĆ, M. VIEIRA PINTO, B. ANTUNOVIĆ, M. GEORGIEV, L. ALBAN (2021): Drivers, opportunities, and challenges of the European risk-based meat safety assurance system. Food Control 124, 107870.
- DEWULF, J., F. VAN IMMERSEEL (2019): Biosecurity in animal production and veterinary medicine. From principles to practice. CABI.
- DUBEY, J.P. (2009): Toxoplasmosis in pigs - The last 20 years. Vet. Parasitol. 164, 89-103.
- EFSA (2011): Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from swine. EFSA J. 9, 2351.
- FELIN, E., E. JUKOLA, S. RAULO, M. FREDRIKSSON-AHOMAA (2015): Meat juice serology and improved food chain information as control tools for pork-related public health hazards. Zoonoses Public Health 62, 456-464.
- FELIN, E., O. HÄLLI, M. HEINONEN, E. JUKOLA, M. FREDRIKSSON-AHOMAA (2019): Assessment of the feasibility of serological monitoring and on-farm information about health status for the future meat inspection of fattening pigs. Prev. Vet. Med. 162, 76-82.
- FOROUTAN, M., Y. FAKHRI, S.M. RIAHI, S. EBRAHIMPOUR, S. NAMROODI, A. TAGHIPOUR, A. SPOTIN,

- H.R. GAMBLE, A. ROSTAMI (2019): The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. *Vet. Parasitol.* 269, 42-52.
- KIJLSTRA, A., B. MEERBURG, J. CORNELISSEN, S. DE CRAEYE, P. VEREIJKEN, E. JONGERT (2008): The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Vet. Parasitol.* 156, 183-190.
 - KIŠ, M., N. ZDOLEC, V. BADOVINAC, L. LOVRIĆ (2021.a): The use of meat juice serological surveillance for the control of important zoonotic agents in pigs at slaughter. *Hygiena alimentorum XLI (Štrbske Pleso, Slovačka, 23. studenoga 2021). Zbornik radova, Kosice (244-251).*
 - KIŠ, M., V. BADOVINAC, L. LOVRIĆ, N. ZDOLEC (2021.b): Meat juice serology as a potential tool in farm risk categorization - survey on *Toxoplasma gondii* antibodies in domestic pigs and wild boars in Karlovac county. 9th International Congress Veterinary Science and Profession (Zagreb, 9. listopada 2021.) *Zbornik sažetaka, Zagreb, 48-48.*
 - KIŠ, M., D. FUŠTIN, N. ZDOLEC (2023): Relevance of Meat Juice Seroprevalence and Presence of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. in Pig Tonsils for Risk Management at Slaughter. *Processes* 11, 2234.
 - MEEMKEN, D., A., H. TANGEMANN, D. MEERMEIER, S. GUNDLACH, D. MISCHOK, M. GREINER, G. KLEIN, T. BLAHA (2014): Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by "meat juice multi-serology". *Prev. Vet. Med.* 113, 589-598.
 - VILLARI, S., G. VESCO, E. PETERSEN, A. CRISPO, W. BUFFOLANO (2009): Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet. Parasitol.* 161, 1-8.
 - VUČEMILO, M., B. VINKOVIĆ, A. TOFANT, Ž. PAVIČIĆ, S. HAĐINA (2004): Veterinarska zaštita okoliša i animalna higijena danas. 3. hrvatski veterinarski kongres (Opatija, 17. - 21. studenoga 2004.). *Zbornik radova, Opatija (315-322).*
 - ZDOLEC, N., M. KIŠ (2021): Meat Safety from Farm to Slaughter – Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. *Processes* 2021, 9, 815.

*Čestit Božić
te uspješnu i
sretnu Novu godinu
želi Vam
Instruвет*

