

# Laboratorijska dijagnostika trihineloze

---

**Buljan, Gabriјela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:954040>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Gabrijela Buljan**

# **Laboratorijska dijagnostika trihineloze**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2023.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za medicinsku mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom mentora izv.prof.dr.sc. Maria Sviben, prim.dr.med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

## **POPIS KRATICA**

**ELISA** (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - enzimski imunosorbentni test

**IFA** (engl. Immunofluorescence assay) - indirektni imunofluorescentni test

**IIL** (engl. intestinal infective larvae) – crijevne infektivne larve

**EKG** - elektrokardiogram

**CNS** – centralni nervni sustav

**CK** – kreatin kinaza

**LDH** – laktat dehidrogenaza

**AST** – aspartat-aminotransferaza

**DNA** – deoksiribonukleinska kiselina

**PCR** (engl. Polymerase Chain Reaction) – polimerazna lančana reakcija

**ITS** (engl. Internal Transcription Spacer)

**COX** (engl. Cyclooxygenase) - ciklooksigenaza

**mPCR** – multipleks polimerazna lančana reakcija

**RFLP** (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism) - Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

**RLB** (engl. Reverse Line Blot)

**PCR-SSCP** (engl. Polymerase Chain Reaction - Single-Strand Conformation Polymorphism)

**ES** – ekskretorno-sekretorni (antigeni)

**TSL** (engl. Trichinella-Specific Larval Antigen) – za trihinelu specifični antigen ličinke

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EPIDEMIOLOGIJA .....</b>	<b>2</b>
2.1. TRIHINELOZA U HRVATSKOJ .....	2
2.2. IZVOR ZARAZE, NAČIN PRIJENOSA .....	3
<b>3. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA .....</b>	<b>4</b>
<b>4. KLINIČKI TIJEK TRIHINELOZE.....</b>	<b>7</b>
4.1. FAZA 1: INTESTINALNA I PARENTERALNA FAZA.....	7
4.2. FAZA 2: FAZA MIŠIĆNE INVAZIJE .....	8
4.3. KOMPLIKACIJE AKUTNE FAZE .....	8
4.4. FAZA 3: FAZA KRONIČNE BOLESTI.....	9
<b>5. DIJAGNOSTIKA .....</b>	<b>10</b>
5.1. LABORATORIJSKI POKAZATELJI INFEKCIJE.....	10
5.2. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA .....	11
5.3. DIREKTNE METODE DIJAGNOSTIKE.....	11
5.3.1. <i>BIOPSIJA MIŠIĆA</i> .....	11
5.3.2. <i>TRIHINELOSKOPIJA</i> .....	12
5.3.3. <i>UMJETNA DIGESTIJA</i> .....	13
5.3.4. <i>HISTOLOŠKI PREGLED UZORKA</i> .....	14
5.3.5. <i>MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA</i> .....	15
5.4. INDIREKTNE METODE DIJAGNOSTIKE .....	16
5.4.1. <i>UZORAK ZA SEROLOGIJU</i> .....	17
5.4.2. <i>DINAMIKA SEROKONVERZIJE</i> .....	17
5.4.3. <i>ELISA</i> .....	18
5.4.4. <i>MOGUĆNOST KORIŠTENJA NOVIH ANTIGENA</i> .....	19
5.4.5. <i>IFA</i> .....	20
5.4.6. <i>WESTERN BLOT</i> .....	21
<b>6. TERAPIJA .....</b>	<b>22</b>
<b>7. PREVENCIJA .....</b>	<b>24</b>
<b>8. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>26</b>
<b>9. ZAHVALE .....</b>	<b>27</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>28</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>32</b>

# SAŽETAK

Naslov rada: Laboratorijska dijagnostika trihineloze

Autor: Gabrijela Buljan

Trihinelozu je parazitoza koju uzrokuju oblici iz roda *Trichinella*. Unutar ovog roda do sada je poznato devet vrsta i tri dodatna genotipa te su svi patogeni za čovjeka. Iako se u svijetu bilježi pad incidencije trihineloze zahvaljujući raznim preventivnim mjerama, Hrvatska je još uvijek endemska zemlja za ovu bolest. Izvor infekcije može biti meso bilo koje životinje no najčešće se radi u našim krajevima o mesu domaće ili divlje svinje. Do infekcije dolazi ingestijom nedovoljno termički obrađenog ili sirovog mesa koje sadrži ličinke parazita. Posljedično tome dolazi do oslobađanja ličinki i njihovog prodora u stijenku tankog crijeva gdje dozrijevaju u odrasle jedinke koje legu žive ličinke. Ličinke koje se ondje izlegu imaju sposobnost invazije tkiva i migracije krvotokom do bilo kojeg dijela tijela. Najčešće se encistiraju u poprečno-prugastom mišićju čitavog tijela gdje ostaju žive čak desetljećima od infekcije. Ova parazitoza može biti obilježena nizom nespecifičnih simptoma, a ističu se febrilitet, abdominalni grčevi, proljev, mučnina te bol i slabost u mišićima. Zbog mogućnosti razvoja teških i po život opasnih komplikacija, važno je rano postavljanje dijagnoze i pravovremena primjena specifične terapije. Metode dijagnostike dijele se na direktne i indirektne. Direktna dijagnostika obuhvaća sve dijagnostičke metode koje izravno dokazuju prisutnost uzročnika. To se odnosi na trihineloskopiju, umjetnu digestiju, histološki pregled te molekularnu dijagnostiku. Indirektne metode odnose se na one dijagnostičke metode koje potvrđuju kontakt domaćina s uzročnikom, odnosno potvrđuju prisutnost specifičnih protutijela kod pacijenta i nazivaju se još serološkim metodama. Najčešće se koriste ELISA, IFA i western blot. To su ujedno i najčešće rabljene metode za dijagnostiku trihineloze u ljudi. Liječenje se zasniva na antihelminskoj terapiji albendazolom ili mebendazolom i adjuktivnoj terapiji kortikosteroidima. Uspješnost liječenja izravno je povezana s brzinom primjene specifičnog lijeka.

Ključne riječi: trihinelozu, dijagnostika, antihelminctici

## SUMMARY

Title: Laboratory diagnostics of trichinellosis

Author: Gabrijela Buljan

Trichinellosis is a parasitic disease caused by organisms from the genus *Trichinella*. Within this genus, nine species and three additional genotypes are known, all of which are pathogenic to humans. Although the incidence of trichinellosis has decreased worldwide due to various preventative measures, Croatia is still considered an endemic country for this disease. The source of infection can be meat from any animal, but most commonly domestic or wild pigs. Infection occurs through the ingestion of undercooked or raw meat containing parasite larvae. As a result, the released larvae penetrate the intestinal wall, where they mature into adult worms that lay live larvae. The larvae that hatch there have the ability to invade tissues and migrate through the bloodstream to any part of the body. They most commonly encyst in the striated muscles throughout the body, where they can remain alive for decades after infection. This parasitic disease can be characterized by a range of nonspecific symptoms, with fever, abdominal cramps, diarrhea, nausea, and muscle pain and weakness being prominent. Due to the possibility of severe and life-threatening complications, early diagnosis and timely administration of specific therapy are important. Diagnostic methods are divided into direct and indirect ones. Direct diagnostic methods encompass all methods that directly demonstrate the presence of the causative agent. This includes trichinoscopy, artificial digestion, histological examination, and molecular diagnostics. Indirect methods refer to diagnostic techniques that confirm the host's contact with the causative agent, specifically by confirming the presence of specific antibodies in the patient and they are called serological methods. The most commonly used serological methods are ELISA, IFA, and western blot. These are also the most commonly used methods for diagnosing trichinellosis in humans in general. Treatment is based on anthelmintic therapy with albendazole or mebendazole, along with adjunctive corticosteroid therapy. The success of treatment is directly related to the prompt administration of the specific medication.

Keywords: trichinellosis, diagnostics, antihelminthics

## 1. UVOD

Trihinelozna je parazitarna infekcija koju uzrokuju oblici iz roda *Trichinella*. Ovi su paraziti jedni od najrasprostranjenijih zoonotskih parazita u svijetu radi vrlo raznolikog životinjskog rezervoara koji mogu biti vodozemci, gmazovi, glodavci, ptice i sisavci (1). Unutar roda *Trichinella* do danas je prepoznato i imenovano devet vrsta i tri dodatna genotipa: *Trichinella* (*T.*) *spiralis* (genotip T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4), *T. murrelli* (T5), T6, *T. nelsoni* (T7), T8, T9, *T. papuae* (T10), *T. zimbabwensis* (T11) i *T. patagoniensis* (T12) (2). Svi navedeni genotipovi iz roda *Trichinella* za čovjeka su patogeni te nema velikih razlika u kliničkoj slici prilikom infekcije različitim genotipovima (3).

Do trihineloze dolazi ingestijom nedovoljno obrađenog ili sirovog mesa različitih životinja koje sadrži enkapsulirani oblik parazita (2,4). Ono što ovog parazita izdvaja od većine drugih parazitskih crva je činjenica da se sve faze njegovog razvoja odvijaju unutar jednog domaćina. Osim toga, njegovoj rasprostranjenosti doprinosi otpornost i dugotrajnost njegovih cisti s ličinkama koje mogu ostati infektivne godinama čak i u raspadajućem mišićnom tkivu (2).

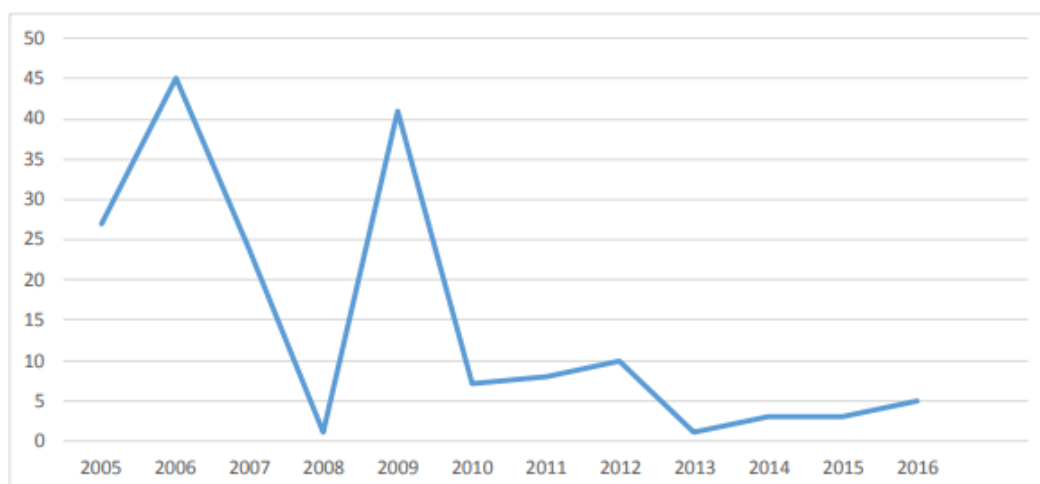


## 2. EPIDEMIOLOGIJA

Oblici roda *Trichinella* zoonotski su paraziti sa zabilježenom rasprostranjenošću u 55 zemalja diljem svijeta. Procjenjuje se da se broj ukupno zahvaćenih ljudi u svijetu broji u milijunima (5,6). Krajem prošlog stoljeća u zemljama istočne Europe, uključujući i Hrvatsku, zabilježen je značajni porast incidencije trihineloze, prvenstveno zbog političkih, društvenih i ekonomskih izazova tog razdoblja (7). Kasnije je zapažen pad broja slučajeva u mnogim zemljama koji se pripisuje strožim sanitarnim propisima nametnutim komercionalnim hranilištima svinja prvenstveno u vidu zabrane hranjenja svinja životinjskim i nekuhanim otpadom (8).

### 2.1. TRIHINELOZA U HRVATSKOJ

Hrvatska se ipak još uvijek smatra endemskim područjem za trihinelozu, što se posebice odnosi na istočne dijelove države gdje se trihinelozu još uvijek javlja u ekonomski slabije razvijenim područjima (9).



Slika 1. Broj prijava oboljelih ljudi od trihineloze u RH u razdoblju od 2005. do 2016.

Preuzeto na: <https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/godisnje-izvjesce-o-zoonozama-u-hrvatskoj/>

U razdoblju od 2000. do 2009. godine bilježilo se oko 30 do 50 slučajeva godišnje od kojih je većina bila posljedica konzumacije mesa domaćih svinja koje nije podvrgnuto veterinarskom pregledu (10). Od 2009. do 2016. godine prijavljeni broj oboljelih od trihineloze pao je na manje od 10 godišnje (11).

Najčešće zapažena vrsta u Hrvatskoj i drugim zemljama jugoistočne Europe je *T. spiralis*, a u divljih životinja, posebice vukova, češće se dokaže *T. britovi* (1,10).

## **2.2. IZVOR ZARAZE, NAČIN PRIJENOSA**

Do nedavno je glavni način zaraze bio konzumiranje nedovoljno kuhane domaće svinjetine koja sadrži infektivne larve ili domaćih proizvoda koji sadrže svinjetinu, kao što je primjerice kobasica (2). Danas se trihineloza ipak rjeđe povezuje sa svinjskim proizvodima, pogotovo u Sjedinjenim Američkim Državama, Europi i Aziji zbog znatnog higijenskog napretka u domaćoj industriji svinjskog mesa kao i zbog bolje regulacije proizvodnje mesa (12). Kao posljedica navedenog, trihineloza je sada sve češće uzrokovana konzumacijom sirovog ili nedovoljno kuhanog mesa divljih životinja kao što su vepar, medvjed, jelen i los.

Osim navedenih, kao neki drugi rjeđe mogući izvor zaraze spominju se i konji, psi, različiti reptili, npr. gušteri, zmije, krokodili, kornjače i mnoge druge životinje (4,12).

Za održavanje ovako široke rasprostranjenosti među životinjama prvenstveno se odgovornima smatraju zaraženi glodavci ili lešine drugih zaraženih životinja kojima se hrane veći grabežljivci i tako održavaju preživljenje parazita i ponavljanje životnog ciklusa.

Prijenos trihineloze s čovjeka na čovjeka nije dokazan (8).

### 3. ŽIVOTNI CIKLUS PARAZITA

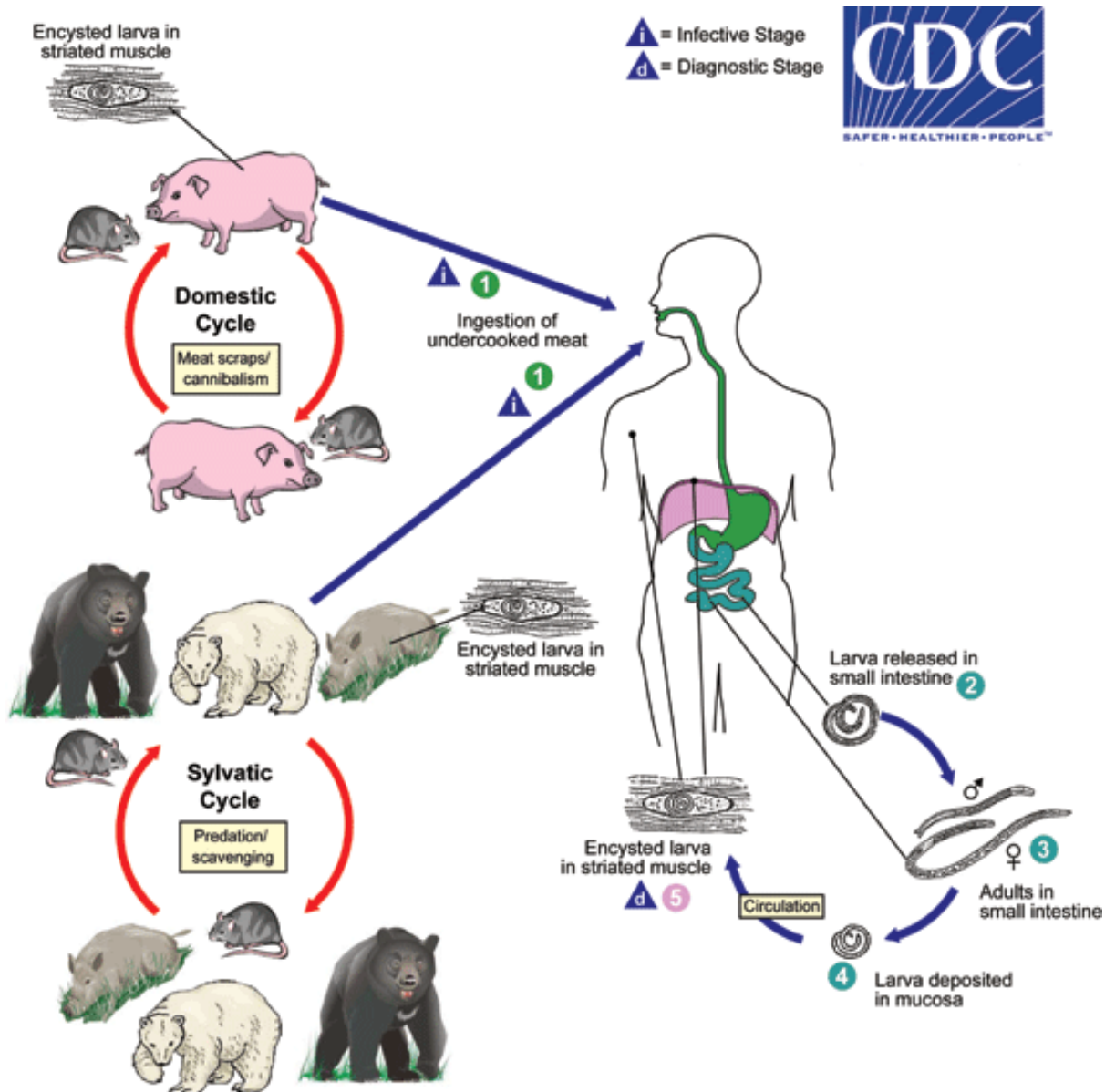
Životni ciklus trihinele sastoji se od tri faze: enteralna faza, parenteralna faza i mišićna faza ili faza ciste (8).

Trihinelozu u čovjeka uzrokovana je ingestijom sirovog ili nedovoljno kuhanog mesa koje sadrži žive infektivne encistirane ličinke. Zasad nije poznata minimalna infektivna doza, ali se ona procjenjuje na oko 100 do 300 ličinki. U želucu djelovanje želučane kiseline i pepsina na encistirane ličinke oslobađa ličinke koje tada nazivamo IIL (*Intestinal infective larvae*) i tako započinje takozvana enteralna faza životnog ciklusa. One zatim invadiraju sluznicu tankog crijeva gdje tijekom 48 sati sazrijevaju u odrasle jedinke.

Prosječna duljina odraslog mužjaka iznosi 1,2 milimetra, a ženke 2,2 milimetra, što ovog oblika čini jednom od najmanje vrste nematoda. Prosječni životni vijek odrasle jedinke iznosi od 4 do 6 tjedana.

Do parenja mužjaka i ženke dolazi u sluznici tankog crijeva, a već nakon petog dana infekcije ženke počinju leći žive ličinke. Jedna ženka može izleći do 1500 ličinki koje zatim prodiru u krvne žile i limfni sustav tankog crijeva i cirkulacijom budu prenesene u tkiva domaćina (parenteralna faza životnog ciklusa). Takve cirkulirajuće ličinke mogu se naći u bilo kojem tkivu, ali svoj razvoj mogu nastaviti samo u poprečno-prugastim mišićima gdje započinje treća, mišićna faza životnog ciklusa. To može uključivati i miokard te ekstraokularne mišiće, ali ličinke se ipak pretežito encistiraju (s izuzetom *T. pseudospiralis*, *T. papuae* i *T. zimbabwensis* koje ne stvaraju ciste) u većim, aktivnim i dobro vaskulariziranim poprečno-prugastim mišićima kao što su dijafragma, jezik, biceps i slično (2,8).

Mišićna je faza složena te započinje prodiranjem ličinki u stanice poprečno-prugastih skeletnih mišića. Taj proces rezultira trima značajnim promjenama: bazofilnom transformacijom mišićnih stanica, encistiranjem ličinke i razvojem guste kapilarne mreže oko zahvaćene stanice. U zahvaćenoj mišićnoj stanici dolazi do nestanka sarkomera, sarkoplazma postaje bazofilna, dolazi do promjena u jezgri stanice, povećava se broj ribosoma te dolazi do proliferacije glatkog i hrapavog endoplazmatskog retikuluma. Takva promjena mišićne stanice naziva se bazofilna transformacija, no do nje dolazi samo u dijelu zahvaćenih stanica te se smatra da potiče razvoj i naknadno preživljavanje ličinke. Stvaranje vezivne čahure oko ličinke kreće od četvrtog dana nakon invazije mišićne stanice kad se formira unutarnji sloj kapsule od glikoproteina, proteoglikana, laminina, fibronektina i kolagena. Vanjski sloj može se vidjeti kasnije, oko tridesetog dana od invazije u stanicu te se većinski sastoji od fibronektina i kolagena tip III i IV (13). Tako encistirane ličinke zaštićene su od imunološkog odgovora domaćina, kao i od niskih temperatura zahvaljujući čemu mogu godinama preživjeti u mišiću i ostati infektivne (14).



Slika 2. Prikaz životnog ciklusa parazita *Trichinella*

Preuzeto na: <https://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html>

## **4. KLINIČKI TIJEK TRIHINELOZE**

Nakon faze inkubacije razlikuje se nekoliko faza bolesti koje su povezane uz faze životnog ciklusa parazita. Faza 1 povezana je uz prisutnost parazita u domaćinu prije invazije u mišiće, a faza 2 obuhvaća upalnu i alergijsku reakciju kao posljedica invazije ličinki u mišiće. Te dvije faze predstavljaju akutnu fazu bolesti dok je faza 3, faza kronične bolesti. Klinička slika bolesti može varirati od asimptomatske bolesti do bolesti s teškim komplikacijama i fatalnim ishodom (2).

### **4.1. FAZA 1: INTESTINALNA I PARENTERALNA FAZA**

Trajanje inkubacijskog perioda ovisi o nekoliko važnih čimbenika od kojih su najvažniji infektivna doza (količina pojedjenih ličinki), genotip parazita, način pripreme mesa (sirovo, djelomično obrađeno, sušeno) te imunološki status domaćina. Faza inkubacije prije prve faze bolesti varira od 12 sati do 2 dana nakon konzumacije mesa koje sadrži ličinke. Smatra se da brzina nastupa prvih simptoma ukazuje na težinu kliničke slike koja će se naknadno razviti. Većina pacijenata iskusi relativno iznenadan nastup simptoma koji u ovoj fazi mogu biti mučnina, abdominalni grčevi, proljev i malaksalost što podsjeća na kliničku sliku trovanja hranom. Trajanje proljeva u prosjeku iznosi oko tjedan dana.

S početkom migracije ličinki iz crijevne sluznice u krvotok (parenteralna faza infekcije) javljaju se sljedeći simptomi. Najviše se ističe povišena tjelesna temperatura koja obično raste do oko 39-40°C te najčešće perzistira od 1 do 3 tjedna. Osim povišene temperature, pacijenti mogu imati izražene i druge opće simptome kao što su tresavica, glavobolja, slabost i slično. Diseminacija ličinki može dovesti do bakterijemije uzrokovane crijevnim bakterijama što ponekad rezultira teškim septičkim stanjem (2,15).

## **4.2. FAZA 2: FAZA MIŠIĆNE INVAZIJE**

Jedan od najranijih simptoma tijekom mišićne invazije ličinki je simetrični periorbitalni edem koji je obično popraćen konjuktivitisom, a uzrokovan je reakcijom organizma na ličinke. Primjenom terapije, a posebice glukokortikosteroida dolazi do brzog povlačenja facijalnog edema. Uz periorbitalni edem često se može vidjeti subkonjuktivalno krvarenje koje nastaje kao posljedica vaskulitisa. Vaskulitis, kao jedan od vodećih patoloških procesa u trihinelozu, može se prezentirati i petehijalnim krvarenjima po koži (15).

Simptom koji je najkarakterističniji za ovu fazu bolesti jest bol u mišićima čiji intenzitet ovisi o težini kliničke slike. Najčešće su prvo zahvaćeni ekstraokularni mišići što rezultira intenzivnom boli pri pomicanju očiju. Zatim slijede mišići čeljusti i vrata, mišići fleksori ruke te mišići leđa (2). Ta se bol uglavnom javlja u naporu dok je bol u mirovanju prisutna samo u bolesnika s teškim oblikom bolesti. Bol može biti toliko intenzivna da zbog ograničenih pokreta neki pacijenti razviju kontrakture, osobito u zglobovima koljena i lakta, a mogu razviti i trizmus (15,16).

## **4.3. KOMPLIKACIJE AKUTNE FAZE**

Do komplikacija obično dolazi u ranoj fazi, unutar prvih nekoliko tjedana od početka bolesti. Najteža komplikacija trihineloze jest razvoj miokarditisa do kojeg dolazi u oko 5 do 20% inficiranih. Najčešće se pojavljuje oko 3 do 4 tjedna nakon početka bolesti i očituje se s bolovima u prsima, tahikardijom te abnormalnostima u EKG-u. Zbog značajne učestalosti miokarditisa preporučeno je provoditi probir u svih pacijenata u kojih se sumnja na trihinelozu, a dovoljno je provjeriti vrijednosti serumskih troponina.

Druge kardiovaskularne komplikacije uključuju tromboembolijsku bolest, posebno tromboflebitis te plućnu emboliju (17).

Procjenjuje se da kod 10 do 20% pacijenata dolazi do različitih manifestacija od strane CNS-a što je važno s obzirom na mortalitet do čak 50% u neliječenih pacijenata. Moguća je pojava cijelog niza simptoma kao što su poremećaj svijesti, vrtoglavica, tinitus, glavobolja. Infekcija može rezultirati teškim oštećenjem mozga što se prezentira u obliku poremećaja pamćenja, okulomotorne disfunkcije, afazije i različitih motoričkih poremećaja. Incidencija ovih komplikacija smanjuje se ranim liječenjem bolesti (18).

#### **4.4. FAZA 3: FAZA KRONIČNE BOLESTI**

Stadij rekonvalescencije, a time i faza kronične bolesti započinje oko petog do sedmog tjedna od početka infekcije kada odrasle ženke prestanu leći migrirajuće ličinke, a već postojeće ličinke završe proces enkapsuliranja u mišićnim stanicama. Tada postupno nestaje većina simptoma i znakova bolesti (5). Obično zaostaje kronična mišićna bol koja može potrajati do 6 mjeseci. U nekih pacijenata mogu se uočiti smanjena mišićna snaga i poremećena koordinacija i do 10 godina nakon infekcije (19).

Nakon toga većina pacijenata ostaje asimptomatska unatoč tome što ličinke u mišićima perzistiraju godinama. Prisutnost vijabilnih ličinki potvrđena je kod nekih oboljelih čak 39 godina nakon infekcije (20).



## **5. DIJAGNOSTIKA**

Rano postavljanje dijagnoze trihineloze predstavlja izazov zbog niske incidencije bolesti, velike učestalosti asimptomatskih slučajeva, velikih varijacija u kliničkoj slici te nedostatka patognomoničnih znakova i simptoma infekcije. Laboratorijski pokazatelji u pacijenata s trihinelozom, iako nespecifični, mogu biti od koristi u sužavanju popisa diferencijalnih dijagnoza. Od velike je važnosti što ranije postaviti dijagnozu te odmah početi s liječenjem pošto rano liječenje značajno utječe na tijek i ishod bolesti i smanjuje incidenciju komplikacija (5).

Parazitološka dijagnostika trihineloze može biti direktna i indirektna. Direktnom dijagnostikom izravno se dokazuje uzročnik dok se indirektnom potvrđuje kontakt domaćina s uzročnikom (21).

### **5.1. LABORATORIJSKI POKAZATELJI INFEKCIJE**

U diferencijalnoj krvnoj slici pacijenata oboljelih od trihineloze često se mogu uočiti leukocitoza s povišenim neutrofilima te eozinofilija. Eozinofilija se javlja rano, prije pojave općih simptoma te ostaje prisutna nekoliko mjeseci od početka infekcije. Nagli pad broja eozinofila u krvi tijekom akutne faze infekcije povezuje se s težom kliničkom slikom i lošijim ishodom bolesti. Mehanizam koji dovodi do pada broja eozinofila nije u potpunosti poznat, ali se smatra da se radi o masivnoj ekstravazaciji krvnih eozinofila u tkiva gdje tvore eozinofilne infiltrate.

Među biokemijskim parametrima ističe se povišenje mišićnih enzima u serumu, a koje se nađe u 75-90% pacijenata. Gotovo redovito dolazi do porasta CK, LDH i AST što je posljedica oštećenja i povećane permeabilnosti zahvaćenih mišićnih stanica (5,22).

## **5.2. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA**

Za postavljanje sumnje na trihinelozu najveću važnost ima dobro uzeta epidemiološka anamneza koja ukazuje na mogući unos sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa svinje ili neke divljači. Na infekciju također ukazuje prisutnost nekih od karakterističnih simptoma i znakova kao što su mijalgija, simetrični periorbitalni edem, konjuktivalna i subungualna petehijalna krvarenja te eozinofilija i povišena vrijednost mišićnih enzima (5). Zbog učestalih općih simptoma u kombinaciji s mijalgijom u ranom tijeku bolesti trihinelozu se najčešće pogrešno dijagnosticira kao gripa dok probavne tegobe, a posebice proljev, slične na trovanje hranom ili neku gastrointestinalnu infekciju. Simptomi uznapredovale bolesti mogu navesti liječnike da sumnjaju na cijeli niz različitih dijagnoza: glomerulonefritis, serumsku bolest, alergiju, dermatomiozitis, nodozni poliarteritis, meningitis, encefalitis te niz drugih parazitoza (2).

## **5.3. DIREKTNE METODE DIJAGNOSTIKE**

Direktna dijagnostika trihineloze obuhvaća sve dijagnostičke metode koje izravno dokazuju prisutnost uzročnika. To se odnosi na trihineloskopiju, umjetnu digestiju, histološki pregled te molekularnu dijagnostiku. Kako bi se navedene metode mogle provesti, potrebno je učiniti biopsiju mišića (21).

### **5.3.1. BIOPSIJA MIŠIĆA**

Biopsija mišića u svrhu postavljanja dijagnoze trihineloze direktnim dijagnostičkim metodama rijetko se preporuča i to većinom u slučajevima kada serološke metode daju nejasne rezultate. Iako su neki drugi mišići više zahvaćeni ličinkama, za biopsiju se ipak koristi deltoidni mišić zbog njegove lokalizacije i lake dostupnosti (22). Prikuplja se komadić mišića manji od zrna graška, oko 0,2 – 0,5 grama mišićnog tkiva bez masnog tkiva i kože. Osjetljivost parazitološke dijagnostike direktno ovisi o količini prikupljenog tkiva. Polovica

uzorka treba se izvagati i pohraniti bez dodavanja fiksativa kako bi se iz iste mogle napraviti trihineloskopija i umjetna probava, dok se druga polovica može koristiti za histološku pretragu trajnim bojenjem preparata (5).

### 5.3.2. TRIHINELOSKOPIJA

Trihineloskopija je korisna metoda u dijagnostici jer osim što se njome direktno vizualiziraju ličinke u uzorku mišića, također služi određivanju intenziteta infekcije (na temelju broja ličinki po gramu pregledanog uzorka) te omogućuje izoliranje ličinki koje se koriste za daljnju identifikaciju vrste ili genotipa parazita.

Izvodi se tako da se mali uzorci mišića pritisnu između dva predmetna stakalca koja se pritegnu vijcima te se pregledavaju trihineloskopom pri povećanju 30 – 40x ili svjetlosnim mikroskopom pri povećanju 50 – 100x. Pritom je potrebno pažljivo pregledati cijeli preparat. Biopsija mišića u kasnijem tijeku infekcije kad su vezivne čahure oko ličinki već stvorene povećava vjerojatnost pronalaska ličinki zbog lakšeg uočavanja (5). Broj ličinki po gramu mišića izravno korelira s intenzitetom infekcije, a teška infekcija karakterizirana je s više od 1000 ličinki po gramu mišića. Rijetko korištenje trihineloskopije u dijagnostici proizlazi prvenstveno iz dugotrajnosti ove metode te dostupnosti brzih i neinvazivnih metoda. Osjetljivost trihineloskopije nešto je manja od metode umjetne probave, a u slučajevima blaže infekcije nisu rijetki ni lažno negativni nalazi. Trihineloskopijom je znatno teže vizualizirati i detektirati ličinke *T. pseudospiralis*, *T. papuae* i *T. zimbabwensis* koje ne stvaraju lako uočljivu debelu kolagenu kapsulu oko sebe (6).

### 5.3.3. UMJETNA DIGESTIJA

Metoda umjetne digestije omogućuje točno određivanje broja ličinki po gramu mišićnog tkiva i izoliranje ličinki za daljnju molekularnu dijagnostiku. Ova je metoda u usporedbi s trihineloskopijom osjetljivija, učinkovitija i isplativija (5,6).

Ovom se pretragom imitira početak infekcije parazitom *Trichinella*: koristi se pripravljena „probavna tekućina“ koja sadrži 1% pepsin i 1% solnu kiselinu. Usitnjeni mišićni bioptat inkubira se u termostatu tijekom 30 minuta na 41°C u posudi zajedno s probavnom tekućinom koja djelovanjem na mišić i kapsule oko ličinki oslobađa ličinke. Koristi se 2ml tekućine na 100mg mišića. Nakon inkubacije pokupi se sediment i mikroskopski pregleda (23).

Ako je biopsija mišića učinjena tijekom rane faze bolesti kad ličinke još nisu enkapsulirane, metoda umjetne digestije može dovesti do uništenja ličinki. Iz tog razloga ovu metodu ne bi trebalo koristiti prije nego što je prošlo barem oko 3 tjedna od infekcije. Osjetljivost ove metode direktno ovisi o količini prikupljenog uzorka mišićnog tkiva (5).



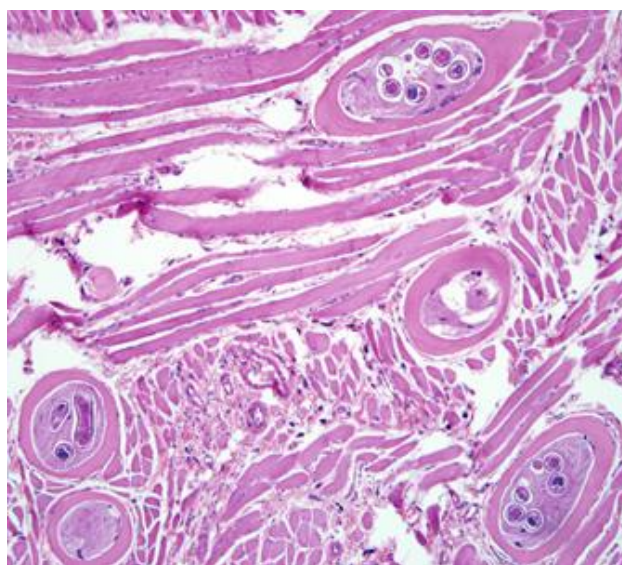
**Slika 3. Prikaz ličinke roda *Trichinella* dobivene umjetnom digestijom. Svjetlosni mikroskop**

Preuzeto na: <https://wellcomecollection.org/works/ymq6fd8h>

#### 5.3.4. HISTOLOŠKI PREGLED UZORKA

Histološka analiza mišićnog tkiva omogućuje vizualizaciju ličinki u različitim fazama razvoja, prisutnost kolagene kapsule, bazofilnu transformaciju stanica te prisutnost i sastav tkivnih infiltrata. Bazofilna transformacija mišićne stanice vrlo je vrijedan dijagnostički kriterij čak i ako same ličinke nisu uočene.

Ukoliko se radi o ranoj fazi bolesti dok su ličinke još vrlo malene i teško se diferenciraju od mišićnih vlakana, zbog bolje vizualizacije histološka analiza mišićnog tkiva bolji je izbor vizualizacije ličinki u tkivu od trihineloskopije (23).



**Slika 4. Encistirane ličinke parazita *Trichinella* u poprečno-prugastom mišiću. Bojenje hemalaun-eozinom. Povećanje 200x**

Preuzeto na: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html>

### 5.3.5. MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

Molekularna analiza omogućuje tipizaciju izoliranih ličinki, pošto njihove morfološke karakteristike nisu dovoljne za točnu identifikaciju. Određivanje vrste/genotipa parazita od velike je važnosti za pronalaženja izvora infekcije, predviđanje kliničkog tijeka bolesti te bolje razumijevanje epidemiologije trihineloze (24).

Korištenje molekularne dijagnostike omogućuje identifikaciju vrste na temelju samo jedne ličinke što je važno jer je nerijetko da se iz uzorka biopsije mišića uspješno izolira mali broj ličinki (25).

Najraširenije su tehnike koje se temelje na DNA amplifikaciji različitih gena pomoću PCR metode. PCR je molekularna metoda razvijena prije više od 30 godina, a služi brzom povećavanju broja kopija cijele DNA ili neke njene sekvence specifične za određeni gen mikroorganizma, što onda omogućuje daljnju analizu (26). Za provedbu PCR-a potrebne su početnice (primeri): kratke DNA sekvence koje su dizajnirane kako bi se nakon denaturacijom uzrokovanog odvajanja lanaca DNA uparile sa specifičnom traženom sekvencom unutar ciljne DNA. Svojim vezanjem na sekvence označavaju segment koji se treba umnožiti daljnjim postupkom.

Općenito govoreći, za uspješno otkrivanje infekcije trihinelom (ili bilo kojim drugim uzročnikom) potrebno je odrediti genomsku determinantu koja je prisutna u uzročniku, ali odsutna u genomu domaćina. U studijama su za detekciju trihinele korišteni različiti primeri koji su usmjereni na različite regije genoma, kao što su mitohondrijska DNA, ribosomska RNA ili neki drugi specifični geni. Neki primeri koji se često koriste su ITS primeri (Internal Transcription Spacer na rRNA), COX (citokrom C oksidaza u mitohondrijima) primeri, ND5 (podjedinica 5 gena za NADH-dehidrogenazu u mitohondrijskoj DNA) primeri i mnogi drugi (27).

Kao bolja verzija standardnog PCR-a rabi se primjerice multiplex PCR (mPCR). Prednosti mPCR-a u odnosu na PCR su visoka osjetljivost, visoka specifičnost i mogućnost otkrivanja različitih vrsta patogenih organizama istovremeno. Razlika je u tome što je u reakcijskoj smjesi prisutno više parova početnica koji onda istovremeno mogu pospješivati amplifikaciju različitih sekvenci (26).

Još neke češće korištene metode su RFLP, RLB, PCR-SSCP, itd. Radi se o „specijaliziranim“ tehnikama koje pružaju dodatne informacije u odnosu na standardni PCR. Svima im prethodi PCR, a zatim slijede dodatni koraci, kao što je uporaba restrikcijskih enzima (RFLP), hibridizacija sa specifičnim probama (RLB) ili elektroforeza u nednaturirajućem gelu (PCR-SSCP) (28–30).

#### **5.4. INDIREKTNE METODE DIJAGNOSTIKE**

Indirektne (serološke) metode odnose se na one dijagnostičke metode koje potvrđuju kontakt domaćina s uzročnikom, odnosno potvrđuju prisutnost specifičnih protutijela u pacijenta. To su ujedno i najčešće rabljene metode za dijagnostiku trihineloze u ljudi. Pošto uspješnost liječenja i incidencija teških komplikacija bolesti ovise o što ranijoj primjeni terapije, od velike je važnosti u dijagnostici koristiti metodu koja je najuspješnija u ranom otkrivanju bolesti. Serološke su metode, s obzirom na njihovu efikasnost, osjetljivost i specifičnost povoljan izbor dijagnostičke metode u tu svrhu, iako postoji prostor za unaprjeđenje u ovome polju. Njihovo je glavno ograničenje izostanak prisutnosti specifičnih protutijela na početku klinički simptomatske bolesti što nerijetko rezultira lažno negativnim nalazima i poteškoćama u pravovremenom postavljanju dijagnoze. Zbog toga se u slučaju kliničke sumnje na trihinelozu, a dobivenih negativnih nalaza serologije, preporuča ponoviti test za 1-2 tjedna.

Danas su najčešće korištene metode serološke dijagnostike ELISA (imunoenzimski test; *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), IFA (indirektni imunofluorescentni test; *Indirect Immunofluorescence Assay*) i western blot čija je svrha potvrda pozitivnih nalaza dobivenih pomoću ELISA i IFA metode (31,32).

#### **5.4.1. UZORAK ZA SEROLOGIJU**

Krvni serum poželjan je uzorak za neizravnu detekciju infekcije trihinelom pomoću neke od seroloških metoda. Nakon venepunkcije i prikupljanja uzorka krvi u epruvetu bez antikoagulansa, krv se ostavi da se koagulira. Izdvojeni serum se prikupi i spreman je za izvođenje pretraga. Ukoliko se ne koristi odmah, potrebno je uzorak zamrznuti na  $-20^{\circ}\text{C}$  i na taj se način može čuvati do oko 3 mjeseca. Ukoliko se uzorak treba čuvati tijekom dužeg vremenskog perioda, preporučeno je zamrznuti ga na  $-80^{\circ}\text{C}$  ili liofilizirati.

Alternativa zamrzavanju u svrhu čuvanja uzorka je dodavanje 1%-og mertiolata u razrjeđenju 1:10 000 ili nekog drugog odgovarajućeg konzervansa. Važno je izbjegavati odmrzavanje i ponovno zamrzavanje jer to može rezultirati raspadanjem protutijela i padom njihovog titra. U slučaju nemogućnosti zamrzavanja uzorka ili njegove pohrane, moguće je koristiti metodu suhe kapi na filter papiru. U ovom se slučaju uzorak čuva zatvoren u plastičnoj vrećici na sobnoj temperaturi (32).

#### **5.4.2. DINAMIKA SEROKONVERZIJE**

Tijekom infekcije prva se pojavljuju za trihinelu specifična IgE protutijela koja su tipična za akutnu fazu bolesti, no ona se skoro nikad ne uspiju detektirati s obzirom na njihovo relativno kratko vrijeme poluživota u serumu zbog čega se ne koriste u rutinskoj dijagnostici. Ubrzo slijedi rast titra protutijela klase IgM, pa IgG (33).



Do serokonverzije najčešće dolazi između trećeg i petog tjedna od infekcije, što označava vremenski okvir od početka infekcije do mogućnosti otkrivanja specifičnih protutijela. Brzina nastupa serokonverzije ovisi ponajprije o infektivnoj dozi, genotipu mikroorganizma te o individualnom imunološkom odgovoru domaćina. IgG protutijela najvišu razinu postižu u trećem mjesecu od infekcije, a u krvi domaćina mogu perzistirati godinama. Dokumentirana je njihova prisutnost čak 30 godina nakon infekcije (32).

Važno je naglasiti da titar protutijela ne korelira s težinom bolesti niti njenim kliničkim tijekom (15).

### **5.4.3. ELISA**

ELISA je najčešće korištena serološka metoda za dijagnostiku trihineloze i u čovjeka i u životinja. Razlog tome su jednostavnost njene provedbe, pouzdanost, relativno niska cijena, laka standardizacija te mogućnost automatiziranja u slučaju testiranja velikog broja uzoraka (31).

Osjetljivost i specifičnost ovog testa uvelike ovisi o odabiru antigena. Do sad je korišten niz različitih antigena, a neprestano se traga za novim antigenima koji bi se mogli koristiti kako bi se omogućila što ranija detekcija bolesti (33–35). Antigeni se razlikuju među različitim razvojnim stadijima trihinele. Kao što je već opisano, razlikujemo odrasle jedinke, novorođene ličinke i mišićne ličinke.

Antigeni trihinele se mogu podijeliti na one koji izazivaju brži imunološki odgovor i na one koji izazivaju sporiji imunološki odgovor. Prvoj skupini pripadaju somatski antigeni koji su prisutni u mnogim unutarnjim strukturama mišićnih larvi, kao i odraslih jedinki. Protutijela na ove antigene mogu se detektirati već 2 tjedna od infekcije. Prednosti korištenja somatskih antigena su jednostavnost i niska cijena njihove pripreme. Osnovni je problem u njihovoj uporabi taj da prisutnost fosforilkolina uzrokuje čestu križnu reaktivnost s protutijelima

protiv drugih parazita (*Ascaris spp.*, *Toxocara canis*, *Trichuris spp.*), s obzirom na to da je on prisutan i u njihovim antigenima. Iz tog razloga više se ne preporučuje njihovo korištenje za serodijagnostiku (31).

Drugo skupini pripadaju ekskretorno-sekretorni (ES) te kutikularni antigeni. Protutijela usmjerena prema njima detektiraju se tek oko trećeg do petog tjedna od početka infekcije zbog čega je u ranoj fazi infekcije značajan problem lažno negativnih rezultata. Jačina antigenosti i sastav ES antigena variraju ovisno o razvojnem stadiju. Njih sintetiziraju odrasle jedinke i mišićne larve, dok ih novorođene larve ne mogu sintetizirati. Obično se za detekciju infekcije rabe antitijela usmjerena protiv ES antigena mišićnih larvi jer većina ES antigena odraslih jedinki uzrokuje nešto slabiji imunološki odgovor (31). ES antigeni se rutinski pripremaju pomoću *in vitro* kultiviranih mišićnih ličinki *T. spiralis* jer su njihovi antigeni prepoznati od domaćina inficiranih svim drugim genotipovima trihinele. Početak korištenja ES antigena mišićnih larvi značajno je povećao učinkovitost ELISA-e; različita istraživanja govore da specifičnost i osjetljivost iznose 90,6-99,4% i 93,1-99,2% (36).

Jedni od novije korištenih antigena su TSL (tivelozni) antigeni koji su specifični za mišićnu fazu bolesti s obzirom na to da ih luče samo ličinke u mišićima, ali se nalaze i na njihovoj kutikuli. Mogu se podijeliti u osam grupa (TSL-1 do TSL-8), a najčešće se koristi TSL-1 (31,37). Oni su specifični za trihinelu i zajednički svim vrstama i genotipovima što omogućuje detekciju infekcije bilo kojim od njih, ali onemogućuje njihovu diferencijaciju. Za dijagnostičku se uporabu proizvode *in vitro* kultivacijom ličinki ili se sintetiziraju (21).

Pokazalo se za se uporabom TSL-1 postižu još veća specifičnost i osjetljivost ELISA testa u mišićnoj fazi infekcije što ovu metodu prema nekim autorima čini najučinkovitijom metodom za serodijagnostiku trihineloze u ljudi. Međutim, i prilikom uporabe ovog antigena zaostaje problem nemogućnosti detekcije protutijela u vremenskom okviru od oko 3-5 tjedana od početka infekcije (38).

#### **5.4.4. MOGUĆNOST KORIŠTENJA NOVIH ANTIGENA**

Iako su prethodno navedeni antigeni pokazali odlične rezultate u serološkoj dijagnostici trihineloze, u novijim se istraživanjima pokušava pronaći antigen čija bi uporaba smanjila incidenciju lažno negativnih testova u ranoj fazi bolesti. Osim toga, trenutno najčešće korišteni ES antigeni mišićnih larvi mogu dovesti i do lažno pozitivnih rezultata zbog križne reaktivnosti u pacijenata koji boluju od nekih drugih parazitoza (paragonimijaza, shistosomoza, klonorhioza, cisticerkoza, anisakioza).

Noviji se radovi okreću prema istraživanju mogućnosti korištenja ES antigena IIL i odraslih jedinki vodeći se činjenicom da su oni najranije izloženi imunološkom sustavu s obzirom na to da IIL te nakon njih odrasle jedinke predstavljaju najraniju invazivnu fazu trihineloze, a time i prvu interakciju između parazita i domaćina (33,34). Rezultati ovih istraživanja ukazuju na potencijalnu mogućnost korištenja novih antigena u svrhu ranijeg postavljanja dijagnoze. Primjerice, istraživanje koje su 2015. godine proveli Sun i suradnici pokazalo je da su serumi inficiranih miševa bili pozitivni na protutijela protiv ES antigena odraslih jedinki trihinele već 8-12 dana nakon početka infekcije. U istom je istraživanju osjetljivost ELISA-e s ES antigenima odraslih jedinki 19. dan infekcije bila 100% u odnosu na ELISA-u s ES antigenima mišićnih larvi koja na isti dan infekcije imala osjetljivost od 75%. Osim toga, pokazalo se da nije bilo križne reaktivnosti s drugim parazitozama. Ovakvi rezultati ukazuju na potrebu za provođenjem detaljnijih i većih istraživanja na pacijentima s trihinelozom i drugim parazitozama (39).

#### **5.4.5. IFA**

IFA predstavlja drugu najčešće korištenu serološku metodu. Kao antigeni mogu se koristiti rezovi inficiranog mišićnog tkiva eksperimentalno zaraženih miševa ili čitave ličinke

fiksirane formalinom. (21) Ti se antigeni inkubiraju sa serumom kako bi se omogućilo vezanje serumskih specifičnih protutijela (primarna protutijela). Nakon ispiranja nevezanih nespecifičnih protutijela, dodaju se sekundarna, fluoresceinom obilježena protutijela koja prepoznaju i vežu se na primarna protutijela. Nakon ponovne inkubacije te zatim ispiranja nevezanih obilježenih protutijela pristupa se vizualizaciji uzorka pod fluorescentnim mikroskopom.

Važno je naglasiti da se test ne smije proglašiti pozitivnim ukoliko ličinka ne svijetli cijelom kutikulom. Iako je tehnika osjetljiva, njena je primjena prilično ograničena zbog mogućnosti križne reaktivnosti u pacijenata koji boluju od nekih drugih parazitoza. Lažno pozitivan rezultat također se može javiti zbog antitijela pacijenata s autoimunim bolestima. Iz navedenih se razloga svaki pozitivan rezultat dobiven IFA-om treba potvrditi ELISA-om ili western blot metodom (31).

#### **5.4.6. WESTERN BLOT**

Pri izvođenju western blot testa koriste se ES antigeni ili somatski antigeni mišićnih larvi koji se pomoću gel elektroforeze razdvajaju na temelju veličine te prenose na čvrsti nosač. On se zatim inkubira zajedno sa serumom kako bi se omogućilo vezanje specifičnih (primarnih) protutijela. Nakon ispiranja nevezanih protutijela dodaju se supstrat i sekundarna protutijela na koja su vezani enzimi; ona prepoznaju i vežu se za primarna protutijela što se može vizualizirati zbog interakcije enzima i supstrata.

Prema nekim istraživanjima osjetljivost western blota pri detekciji za trihinelu specifičnih protutijela iznosi 98,1% dok je specifičnost čak 100% (40). Unatoč tim brojkama, western blot se danas koristi u samo svrhu potvrde pozitivnih rezultata dobivenih ELISA i IFA testom poglavito jer je izrazito dugotrajan i skup što ga čini nepraktičnim za rutinsku uporabu (31).

## 6. TERAPIJA

Liječenje trihineloze zasniva se na antihelmintskoj terapiji koju čine albendazol i mebendazol. Ova dva lijeka djeluju na sličan način uz male razlike u farmakokinetici i farmakodinamici (41). Njihov mehanizam rada temelji se na selektivnom vezanju za  $\beta$ -tubulin čime onemogućuju polimerizaciju mikrotubula u stanicama parazita te na taj način remete stanični transport tvari, unos glukoze, neke metaboličke procese te reproduktivnu funkciju. To na kraju rezultira imobilizacijom i onemogućavanjem razvoja ličinki te naposljetku smrću parazita (42,43).

Uspješnost liječenja poglavito ovisi o brzini primjene lijeka. Ukoliko se terapija započne unutar 48 sati od ingestije inficiranog mesa, moguće je u potpunosti onemogućiti razvoj ličinki u stijenci crijeva, a time i zaustaviti infekciju. U praksi se najčešće zbog kasnog postavljanja dijagnoze terapija ipak počinje primjenjivati kasnije, kad su ličinke već invadirale mišiće što značajno utječe na efikasnost liječenja (23). Cilj je terapije u intestinalnoj fazi infekcije smanjiti broj ličinki koje će invadirati mišiće ili čak u potpunosti zaustaviti infekciju. Ukoliko je već došlo do invazije mišića, lijekovi se primjenjuju kako bi se reduciralo oštećenje mišića (2).

Korištenje antihelmintika u kroničnoj fazi je diskutabilno. Neki autori navode da liječenje nema nikakav utjecaj na encistirane mišićne larve (44). Pozio i suradnici u svom su istraživanju na temelju višestrukih biopsija mišića u pacijenata liječenih mebendazolom zaključili da terapija nije imala nikakav utjecaj na morfologiju i vijabilnost encistiranih ličinki (45). S druge strane, postoje istraživanja koja govore u korist primjene terapije u kroničnoj fazi infekcije. Primjerice, Watt je u svojoj prospektivnoj kontroliranoj kliničkoj studiji dokazao da je korištenje mebendazola imalo značajan utjecaj na smanjivanje mišićne boli i slabosti u odnosu na placebo (46).

Preporučena doza albendazola iznosi 400mg dva puta dnevno tijekom 8 do 14 dana.

Mebendazol se primjenjuje u dozi od 200 do 400 grama tri puta dnevno tijekom prva tri dana, nakon čega se povisuje na 400 do 500 miligrama tri puta dnevno idućih 10 dana (15). Na ovaj način mogu se primjenjivati oba lijeka i u odraslih i u djece, ali su kontraindicirani u trudnica te u djece mlađe od 2 godine (41).

Uporaba ovih lijekova ponekad je ograničena njihovim nuspojavama. Najčešće su prijavljene gubitak apetita, abdominalna bol, proljev, mučnina, povraćanje, glavobolja, tinitus te povišene vrijednosti jetrenih enzima. Neke značajnije nuspojave uključuju konvulzije, alergijske reakcije, neutropeniju i trombocitopeniju (42,43).

Zabilježena je mogućnost razvoja rezistencije na mebendazol, čiji je mehanizam promjena strukture  $\beta$ -tubulina što smanjuje ili onemogućuje vezanje lijeka (42).

Za liječenje trudnica i djece mlađe od 2 godine preporučuje se korištenje pirantela koji inhibicijom kolinesteraze dovodi do spazma i paralize odraslih jedinki. Posljedično tome, one gube mogućnost adhezije u gastrointestinalnom sustavu te budu izbačene iz njega. Pirantel se primjenjuje u dozi od 10 do 20mg/kg tjelesne mase tijekom 2 do 3 dana te djeluje samo na odrasle jedinke zbog čega njegova primjena ima smisla samo u ranoj fazi infekcije. S obzirom na to da odrasle jedinke preživljavaju i legu ličinke do 6 tjedana od početka infekcije, preporučeno je da se pirantel primjeni u svih pacijenata u kojih je infekcija započela unazad 6 tjedana ili manje (41).

Kao adjunktivna terapija antihelminthicima pogotovo u akutnoj fazi infekcija s težom kliničkom slikom preporučuje se primjena kortikosteroida čiji je osnovni učinak smanjivanje intenziteta upale i skraćivanje simptomatskog perioda infekcije. Daju se do nestanka simptoma akutne faze (2).

## 7. PREVENCIJA

Dva najbolja načina za prevenciju trihineloze su edukacija opće populacije o važnosti adekvatnog zamrzavanja mesa i njegove pravilne pripreme te poduzimanje mjera koje će onemogućiti da inficirano meso uopće dođe do potrošača (15).

Zamrzavanje mesa efikasan je način ubijanja ličinki. Kako bi se to postiglo, meso svinjetine debljine 15 centimetara potrebno je zamrznuti na  $-15^{\circ}\text{C}$  barem 21 dan. Ovaj je postupak efikasan u ubijanju ličinki *T. spiralis*, ali ličinke nekih drugih vrsta (*T. britovi*, *T. nativa*) mogu biti otporne na niske temperature. Iz tog je razloga najefikasniji način ubijanja ličinki pravilna priprema mesa, a najsigurnije je kuhanje.

Prilikom kuhanja preporučuje se postizanje unutarnje temperature mesa  $71-75^{\circ}\text{C}$  (47).

Nikako se kao metode ubijanja ličinki trihinele ne preporučuju korištenje mikrovalne pećnice, dimljenje i sušenje mesa, kao ni soljenje, pošto navedene metode nisu efikasne (48). Osim navedenog, preporučuje se i provođenje higijenskih mjera; poglavito pranje ruku nakon pripreme sirovog mesa, kao i detaljno pranje noževa i površina koji su bili u kontaktu s istim (8).

U Republici Hrvatskoj u sklopu Nacionalnog programa za kontrolu trihineloze u domaćih i divljih svinja (dalje u tekstu: Nacionalni program) obavezno se kontinuirano provodi kontrola trihineloze. Osnovni ciljevi Nacionalnog programa su pregled na trihinelu mesa domaćih i divljih svinja koji će se koristiti za ljudsku prehranu te sprječavanje daljnjeg širenja bolesti među životinjama provedbom odgovarajućih mjera kontrole. Također je zakonom propisana i kontrola trihineloze u mesu ostale divljači (49).

Za pretragu je potrebno uzeti minimalno 100 grama korijena ošita na području gdje mišićni dio prelazi u tetive, i to na način da uzorak obuhvaća jednaki dio mišića od svake polovice trupa. Pravilno uzet uzorak pakira se u čistu PVC vrećicu te se dostavlja u nadležnu

veterinarsku ambulantu. Meso se najčešće pregleda trihineloskopijom ili metodom umjetne digestije. Meso domaćih i divljih svinja od kojih je uzet uzorak za pretragu na trihinelu ne smije se podvrgavati nikakvoj daljnjoj obradi ni uporabi dok se ne dobije nalaz kojim je potvrđeno da je uzorak negativan na trihinelozu. Ukoliko se utvrdi pozitivan nalaz, veterinarska organizacija dužna je uzorak mesa poslati u Nacionalni referentni laboratorij za parazite u svrhu potvrde i identifikacije vrste. Osim toga, nadležna veterinarska ambulanta dužna je odmah izvijestiti i nadležnog veterinarskog inspektora te voditi evidenciju o svakom preuzetom uzorku mesa koji je bio podvrgnut pretrazi. Meso za koje se pretragom utvrdilo da je pozitivno na trihinelozu ne smije se prerađivati ni odbacivati već se neškodljivo uklanja prema rješenju veterinarskog inspektora (50).

Još jedan potencijalni način prevencije širenja trihineloze predstavlja razvoj učinkovitog cjepiva protiv parazita iz roda *Trichinella*. Pošto je konzumiranje svinjskog mesa još uvijek najčešći način zaraze ljudi trihinelozom, uglavnom se radi na razvoju cjepiva za svinje. Osnovni je cilj cijepljenja svinja protiv trihineloze sprječavanje razvoja infektivnih larvi u odrasle jedinke u crijevu što bi rezultiralo onemogućavanjem stvaranja ličinki i njihovog prodora u krvotok i ostala tkiva (51). Istraživanja na ovu problematiku provode se već tri puna desetljeća no unatoč tome još uvijek ne postoji dovoljno učinkovito cjepivo. Razlog tome prvenstveno jesu kompleksnost životnog ciklusa i varijabilnost antigena u pojedinim fazama životnog ciklusa. Ujedno, većina se istraživanja cjepiva provodila na mišjim modelima dok je nekolicina studija koristila svinjske modele što se pokazalo dodatnim izazovom jer su neke studije pokazale da se imunološki odgovor induciran istim antigenom nerijetko bitno razlikuje u miševa i svinja. Mnogi autori smatraju da razvoj učinkovitog cjepiva predstavlja budućnost kontrole širenja trihineloze s životinja na ljude zbog čega se potiče više istraživanja na svinjskim modelima u tom području prevencije ove parazitoze (51,52).



## **8. ZAKLJUČAK**

Unatoč značajnom padu incidencije trihineloze u svijetu zahvaljujući strožim sanitarnim propisima i zakonskim regulativama, trihineloza ostaje bitan globalni javnozdravstveni problem. Iz tog je razloga neizmjereno važno nastaviti tragati za boljim i učinkovitijim načinima prevencije razvoja ove bolesti kako u životinja, tako i u ljudi te nastaviti unaprjeđivati metode rane i pouzdane dijagnostike kako bi se adekvatno i specifično liječenje u slučaju potrebe moglo što ranije primijeniti.

## 9. ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem mentoru izv.prof.dr.sc. Mariu Svibenu, prim.dr.med. na razumijevanju, usmjeravanju i pomoći prilikom pisanja i oblikovanja ovoga rada te na strpljenju i vremenu za moje upite.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima Sanji i Mladenu, bratu Filipu i široj obitelji jer su bili uz mene tijekom posljednjih 6 godina te mi pružali potporu, utjehu i riječi ohrabrenja.

Također se zahvaljujem Antoniji i Ani te dragim prijateljima koji su neumorno slušali moje isprike zbog nedostatka vremena te sa mnom slavili sve moje sretno trenutke.

## 10. LITERATURA

1. Pozio E, Darwin Murrell K. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. In: Baker JR, Muller R, Rollinson D, editors. *Advances in Parasitology* [Internet]. Academic Press; 2006 [pristupljeno 3.5.2023.]. Str. 367–439. doi: 10.1016/S0065-308X(06)63005-4
2. Shore Garcia L. *Diagnostic Medical Parasitology: Tissue Nematodes*. 6. izd. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015. Str. 336–46.
3. Pozio E, Zarlenga DS. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int J Parasitol*. 2013;43(12):983–97. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.05.010
4. Lo YC, Hung CC, Lai CS, Wu Z, Nagano I, Maeda T, et al. Human trichinosis after consumption of soft-shelled turtles, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(12):2056–8. doi: 10.3201/eid1512.090619
5. Bruschi F, Dupouy-Camet J, Kociecka W, Pozio E, Bolas-Fernandez F. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2002;3(8):1117–30. doi: 10.1517/14656566.3.8.1117
6. Gajadhar AA, Pozio E, Ray Gamble H, Nöckler K, Maddox-Hyttel C, Forbes LB, et al. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet Parasitol*. 2009;159(3–4):197–205. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.063
7. Cuperlovic K, Djordjevic M, Pavlovic S. Re-emergence of trichinellosis in southeastern Europe due to political and economic changes. *Vet Parasitol*. 2005;132(1–2):159–66. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.047
8. Diaz JH, Warren RJ, Oster MJ. The Disease Ecology, Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Trichinellosis Linked to Consumption of Wild Animal Meat. *Wilderness Environ Med*. 2020;31(2):235–44. doi: 10.1016/j.wem.2019.12.003
9. Golubić D, Kolarek Lj. Eradikacija novog endemskog žarišta trihineloze u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. *Infektološki glasnik*. 2009;29(1):19–23.
10. Beck R, Beck A, Kusak J, Mihaljević Ž, Lučinger S, Živičnjak T, et al. Trichinellosis in wolves from Croatia. *Vet Parasitol*. 2009;159(3–4):308–11. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.10.068
11. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Godišnje izvješće o zoonozama u Hrvatskoj za 2015./16. godinu [Internet]. [pristupljeno 24.5.2023.]. Dostupno na: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/11/Godi%C5%A1nje-izvje%C5%A1%C4%87e-o-zoonozama-2015\\_16.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2017/11/Godi%C5%A1nje-izvje%C5%A1%C4%87e-o-zoonozama-2015_16.pdf)
12. Rostami A, Gamble HR, Dupouy-Camet J, Khazan H, Bruschi F. Meat sources of infection for outbreaks of human trichinellosis. *Food Microbiol*. 2017;64:65–71. doi: 10.1016/j.fm.2016.12.012
13. Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*. 2000;93(3–4):365–83. doi: 10.1016/s0304-4017(00)00352-6
14. Capó VA, Despommier DD, Polvere RI. *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J Parasitol*. 1998;84(2):209–14.
15. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):127–45. doi: 10.1128/CMR.00026-08

16. Astudillo LM, Arlet PM. Images in clinical medicine. The chemosis of trichinosis. *N Engl J Med*. 2004;351(5):487. doi: 10.1056/NEJMicm990318
17. Lachkar S, Abboud P, Gargala G, Etienne M, Gauliard E, Tron C, et al. [Troponin dosage in a patient with asymptomatic myocarditis due to trichinellosis]. *Rev Med Interne*. 2008;29(3):246–8. doi: 10.1016/j.revmed.2007.07.011
18. Ellrodt A, Halfon P, Le Bras P, Halimi P, Bourée P, Dési M, et al. Multifocal central nervous system lesions in three patients with trichinosis. *Arch Neurol*. 1987;44(4):432–4. doi: 10.1001/archneur.1987.00520160064016
19. Harms G, Binz P, Feldmeier H, Zwingenberger K, Schleeauf D, Dewes W, et al. Trichinosis: a prospective controlled study of patients ten years after acute infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1993;17(4):637–43. doi: 10.1093/clinids/17.4.637
20. Fröscher W, Gullotta F, Saathoff M, Tackmann W. Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur Neurol*. 1988;28(4):221–6. doi: 10.1159/000116271
21. Sviben M. Mikrobiološka dijagnostika trihineleze. 2009; *Liječ Vjesn* 2009;131:265–8
22. Bruschi F, Murrell KD. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J*. 2002;78(915):15–22. doi: 10.1136/pmj.78.915.15
23. Dupouy-Camet J, Weltgesundheitsorganisation, OIE - World Organisation for Animal Health, editors. *FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Paris: OIE; 2007. 108 p.
24. Bruschi F, Dupouy-Camet J. Trichinellosis. In: Bruschi F, editor. *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health [Internet]*. Vienna: Springer Vienna; 2014 [pristupljeno 11.5.2023]. p. 229–73. Dostupno na: [https://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1782-8\\_8](https://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1782-8_8)
25. Pozio E, Rosa GL. *PCR Detection of Microbial Pathogens: PCR-Derived Methods for the Identification of Trichinella Parasites from Animal and Human Samples*. New Jersey: Humana Press; 2002. Str. 299–310.
26. Zhang M, Wu J, Shi Z, Cao A, Fang W, Yan D, et al. Molecular Methods for Identification and Quantification of Foodborne Pathogens. *Molecules*. 2022;27(23):8262. doi: 10.3390/molecules27238262
27. Zolfaghari Emameh R, Kuuslahti M, Näreaho A, Sukura A, Parkkila S. Innovative molecular diagnosis of *Trichinella* species based on  $\beta$ -carbonic anhydrase genomic sequence. *Microb Biotechnol*. 2015;9(2):172–9. doi: 10.1111/1751-7915.12327
28. Dai S, Long Y. *Plant Genotyping: Genotyping Analysis Using an RFLP Assay*. [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [pristupljeno 12.5.2023.]. Str. 91–9. (Methods in Molecular Biology; vol. 1245). Dostupno na: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1966-6\\_7](https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1966-6_7)
29. Wu Z, Nakada T, Nagano I, Takahashi Y. DNA fingerprints of *Trichinella* as revealed by restriction fragment length polymorphism and single-strand conformational polymorphism (RFLP-SSCP). *Mol Cell Probes*. 2000;14(5):291–7. doi: 10.1006/mcpr.2000.0316
30. Rombout YB, Bosch S, Van Der Giessen JW. Detection and identification of eight *Trichinella* genotypes by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):642–6. doi: 10.1128/JCM.39.2.642-646.2001

31. Yang Y, Cai YN, Tong MW, Sun N, Xuan YH, Kang YJ, et al. Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health*. 2016;2:25–30. doi: 10.1016/j.onehlt.2015.11.005
32. Bruschi F, Gómez-Morales MA, Hill DE. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *Food Waterborne Parasitol*. 2019;14:e00032. doi: 10.1016/j.fawpar.2018.e00032
33. Wang ZQ, Shi YL, Liu RD, Jiang P, Guan YY, Chen YD, et al. New insights on serodiagnosis of trichinellosis during window period: early diagnostic antigens from *Trichinella spiralis* intestinal worms. *Infect Dis Poverty*. 2017;6(1):41. doi: 10.1186/s40249-017-0252-z
34. Sun GG, Liu RD, Wang ZQ, Jiang P, Wang L, Liu XL, et al. New diagnostic antigens for early trichinellosis: the excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* intestinal infective larvae. *Parasitol Res*. 2015;114(12):4637–44. doi: 10.1007/s00436-015-4709-3
35. Hu CX, Jiang P, Yue X, Zeng J, Zhang XZ, Song YY, et al. Molecular characterization of a *Trichinella spiralis* elastase-1 and its potential as a diagnostic antigen for trichinellosis. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):97. doi: 10.1186/s13071-020-3981-y
36. Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel CM, Gajadhar AA. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite Paris Fr*. 2004;11(1):3–13. doi: 10.1051/parasite/20041113
37. Bolás-Fernandez F, Corral Bezara LD. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci*. 2006;81(3):297–303. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.01.002
38. Escalante M, Romarís F, Rodríguez M, Rodríguez E, Leiro J, Gárate MT, et al. Evaluation of *Trichinella spiralis* larva group 1 antigens for serodiagnosis of human trichinellosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(9):4060–6. doi: 10.1128/JCM.42.9.4060-4066.2004
39. Sun GG, Wang ZQ, Liu CY, Jiang P, Liu RD, Wen H, et al. Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory–secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms. *Parasit Vectors*. 2015;8(1):484. doi: 10.1186/s13071-015-1094-9
40. Nöckler K, Reckinger S, Broglia A, Mayer-Scholl A, Bahn P. Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Vet Parasitol*. 2009;163(4):341–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.04.034
41. Yr Y, Yf Q. Progress in Treatment and Prevention of Trichinellosis. *J Infect Dis Ther* [Internet]. 2015 [pristupljeno 21.5.2023.];03(06). Dostupno na: <http://www.esciencecentral.org/journals/progress-in-treatment-and-prevention-of-trichinellosis-2090-7214-1000251.php?aid=65895>
42. Thakur RK, Patel SP. Mebendazole. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [pristupljeno 22.5.2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557705/>
43. Malik K, Dua A. Albendazole. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [pristupljeno 22.5.2023.]. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553082/>

44. Pozio E, Gomez Morales MA, Dupouy-Camet J. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003;1(3):471–82. doi: 10.1586/14787210.1.3.471
45. Pozio E, Sacchini D, Sacchi L, Tamburrini A, Alberici F. Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2001;32(4):638–42. doi: 10.1086/318707
46. Watt G, Saisorn S, Jongsakul K, Sakolvaree Y, Chaicumpa W. Blinded, placebo-controlled trial of antiparasitic drugs for trichinosis myositis. *J Infect Dis.* 2000;182(1):371–4. doi: 10.1086/315645
47. Shimoni Z, Fromm P. Uncertainties in diagnosis, treatment and prevention of trichinellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(10):1279–88. doi: 10.1586/14787210.2015.1075394
48. Noeckler K, Pozio E, van der Giessen J, Hill DE, Gamble HR. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals. *Food Waterborne Parasitol.* 2019;14:e00041. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00041
49. Pravilnik o načinu obavljanja pretrage na prisutnost *Trichinella* u mesu. Pravilnik, Narodne novine, NN br. 62/2008 [Internet], 1.7.2008. [pristupljeno 16.6.2023.] (Hrvatska). Dostupno na: [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008\\_05\\_62\\_2109.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_05_62_2109.html)
50. Uprava Veterinarstva. Nacionalni program kontrole trihineloze u domaćih i divljih svinja. [Internet], 13.1.2023. [pristupljeno 16.6.2023.] (Hrvatska). Dostupno na: <http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=4877>
51. Tang B, Li J, Li T, Xie Y, Guan W, Zhao Y, et al. Vaccines as a Strategy to Control Trichinellosis. *Front Microbiol.* 2022;13:857786. doi: 10.3389/fmicb.2022.857786
52. Zhang N, Li W, Fu B. Vaccines against *Trichinella spiralis* : Progress, challenges and future prospects. *Transbound Emerg Dis.* 2018;65(6):1447–58. doi: 10.1111/tbed.12917

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI**

Ime i prezime: Gabrijela Buljan

Datum rođenja: 9.10.1998.

Adresa: Antuna Gustava Matoša 5, 10410 Velika Gorica

E-mail: [gabuljan@gmail.com](mailto:gabuljan@gmail.com)

### **OBRAZOVANJE**

2017. - 2023. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2013. - 2017. Gimnazija Velika Gorica, Velika Gorica

2005. - 2013. Osnovna škola Eugena Kumičića, Velika Gorica

### **AKTIVNOSTI**

2021. – 2023. članica Studentske sekcije dobrovoljnih darivatelja krvi i transfuzijske medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

2011. – 2013. članica Dramskog studija Pučkog otvorenog učilišta Velika Gorica