

# Primjena serologije mesnog soka u kontroli *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u klaonicama svinja

---

Fuštin, Dunja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:410456>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-05**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Dunja Fuštin

Primjena serologije mesnog soka u kontroli *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia*  
spp. u klaonicama svinja

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane

Predstojnik:

izv.prof.dr.sc. Nevijo Zdolec

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Lidija Kozačinski
2. prof. dr. sc. Vesna Dobranić
3. izv. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. dr. sc. Tomislav Mikuš (zamjena)

## ZAHVALA

*Zahvaljujem se mentoru, izv.prof.dr.sc. Neviju Zdolecu i asistentici Marti Kiš, dr. med. vet. na strpljenju, trudu i neizmjernoj pomoći u izradi ovog rada. Također, želim se zahvaliti svim djelatnicima Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane koji su mi pomogli u istraživačkom dijelu rada. 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).*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, mami Zvezdani, tati Đimiju, bratu Goranu, teti Slađani, baki Izeti i baki Jeleni na beskrajnoj podršci bez koje ne bih ostvarila ovakav uspjeh. Želim se zahvaliti svim prijateljicama i prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli i smijehom uljepšali studentske dane. I na kraju, želim zahvaliti sama sebi što sam vjerovala u sebe, što sam uložila golem trud, što nikad nisam odustala i što sam uvijek bila i ostala svoja.*

## POPIS KRATICA

EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane (engl. European Food Safety Authority)
ELISA	Imunoenzimni test (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
STOP	Otopina za zaustavljanje enzimske reakcije
TMB	Tetrametilbenzidin
Q-S	Kvaliteta i sigurnost (engl. Quality and Safety)

## POPIS PRILOGA

Slike:

1. Slika 1. Mogući načini nastanka infekcije *Toxoplasma gondii*
2. Slika 2. Uzorkovanje ošita u klaonici
3. Slika 3. Priprema mesnog soka za analizu pomoću ELISA metode
4. Slika 4. Komercijalni ELISA kit pigtype® *Toxoplasma* Ab
5. Slika 5. Mikrotitracijska pločica nakon očitavanja rezultata ELISA testiranja

Tablice:

1. Tablica 1. Seroprevalencija *T.gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u svinja koje potječu s velikih svinjogojskih farmi i seoskih domaćinstava u Hrvatskoj
2. Tablica 2. Prikaz rezultata serološke pretrage mesnog soka s obzirom na kategoriju biosigurnosti farme podrijetla

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja.....	3
2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	3
2.1.1. Serologija mesnog soka svinja.....	5
2.2. <i>Salmonella</i> spp. ....	7
2.2.1. Serologija mesnog soka svinja .....	7
2.3. <i>Yersinia</i> spp. ....	9
2.3.1. Serologija mesnog soka svinja .....	9
3. Materijali i metode .....	11
3.1. Uzorkovanje.....	11
3.2. Serološka pretraga mesnog soka.....	12
3.2.1. Priprema mesnog soka za detekciju protutijela komercijalnim ELISA kitovima... 12	
3.2.2. Procedura detekcije protutijela komercijalnim ELISA kitovima.....	12
3.3. Statistička obrada podataka .....	14
4. Rezultati .....	15
6. Rasprava .....	19
6. Zaključci.....	23
7. Literatura .....	24
8. Sažetak .....	29
9. Summary .....	30
10. Životopis.....	31

## 1. Uvod

Modernizacija postojećeg sustava inspekcije mesa neophodna je u Europskoj uniji, kako bi se poboljšala njena opravdanost, izvedivost i isplativost u usporedbi s tradicionalnim načinom. Iako će praktično implementiranje novog predloženog sustava prevencije i kontrolnih metoda baziranih na utvrđivanju javno-zdravstvenih rizika duž čitavog lanca proizvodnje mesa biti dug i izazovan pothvat, EFSA predviđa mnogo mogućnosti i prilika (BLAGOJEVIĆ i sur., 2021.). Trenutno prioritete biološke opasnosti, prema provedenoj analizi rizika Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA), u proizvodnji mesa na razini farme i klaonice su bakterije *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, verotoksična *Escherichia coli* te paraziti *Trichinella* i *Toxoplasma gondii* (PAŽIN, 2021.). Problem kontrole ovih bioloških opasnosti u lancu proizvodnje mesa je njihova prisutnost u latentno inficiranih, asimptomatskih životinja (ZDOLEC i KIŠ, 2021.). Ipak, prisutnost rizika s obzirom na *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u mesu može se neizravno ispitati praćenjem njihove seroprevalencije u svinja i drugih farmskih životinja.

Novi integrirani sustav kontrole sigurnosti mesa kategorizira farme i životinje za klanje prema podacima o lancu prehrane (engl. *Food Chain Information*), koji služe kao glavna misao vodilja kroz čitavu klaoničku obradu. Također, prethodno identificirane opasnosti i rizici na farmi, služe kao temelj prilikom osmišljavanja kontrolnih i intervencijskih mjera u klaonici. Međutim, ne možemo garantirati da će smanjeni rizik od bakterijske kontaminacije postojati u slučaju dobrog upravljanja i preventivnih metoda u primarnoj proizvodnji na farmama, ako se procesi u klaonici ne odvijaju po pravilima dobre higijenske prakse i dobre proizvođačke prakse (ZDOLEC i KIŠ, 2021.).

Sigurnost mesa uvelike ovisi o farmskoj praksi, odnosno provođenju preventivnih mjera sprječavanja uvođenja i širenja uzročnika u populaciji svinja. Primjerice, intenzivna svinjogojska proizvodnja podrazumijeva držanje velikog broja životinja na relativno malom prostoru, što stavlja pred suvremenu veterinarsku znanost i praksu čitav niz novih problema,

a posebni naglasak na zaštitu i primjenu preventivnih biosigurnosnih mjera (VUČEMILO i sur., 2004.). Manje, obiteljske farme s manjim brojem svinja i u pravilu lošijom farmskom praksom također iziskuju provođenje biosigurnosnih mjera i drugih preventivnih postupaka. U Hrvatskoj je kategorizacija svinjogojskih farmi s obzirom na biosigurnost započela u ožujku 2019. godine i prvi su podaci pokazali da je oko 50 % njih u najnižoj kategoriji (ACINGER-ROGIĆ, Ž. 2019.). Potrebno je naglasiti da neki specifični pokazatelji biosigurnosti i općenito upravljanja farmom poput infrastrukture farme, načina hranidbe i korištenja vode (bunarska ili javna), mjera sanitacije, deratizacije i dr. mogu utjecati i na prevalenciju spomenutih bioloških opasnosti u lancu proizvodnje svinjskoga mesa (ZDOLEC i KIŠ, 2021.).

Program praćenja bakterije *Salmonella* spp. u svinja je prisutan u Europskoj uniji i Hrvatskoj već duži niz godina i temelji se na procjeni prevalencije pretraživanjem reprezentativnog broja uzoraka cekuma i obrisaka s trupova svinja. Za bakteriju *Salmonella* spp. također su postavljeni i mikrobiološki kriteriji u europskom zakonodavstvu. S druge strane, *Yersinia enterocolitica* kao i *T. gondii* u svinja nisu obuhvaćene obveznim kontrolnim mjerama ni na farmama ni klaonicama, što predstavlja određeni nedostatak s obzirom na visoku pojavnost tih zoonoza u ljudi. Stoga je cilj ovog istraživanja utvrditi seroprevalenciju *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u svinja primjenom serološke pretrage mesnog soka (ošita uzorkovanog na liniji klanja) čime bi se dobili podaci za kategorizaciju farmi prema riziku, pri čemu će se uspoređivati razlike s obzirom na veličinu farme i biosigurnost.



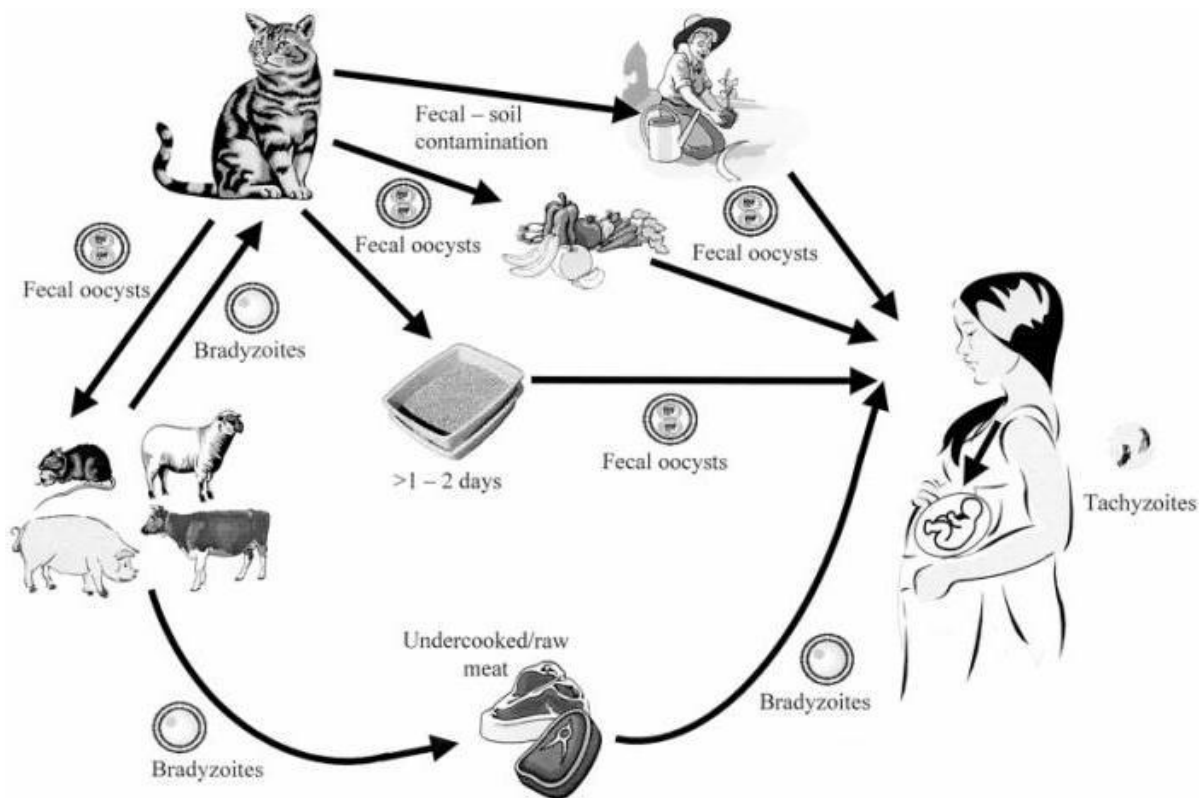
## 2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja

Iako se tijekom godina svrha inspekcije mesa nije promijenila, značajno su se promijenile prioritetne biološke i kemijske opasnosti koje utječu na kvalitetu, higijenu i sigurnost mesa. Današnji načini uzgoja životinja na farmama, postupanje sa životinjama prilikom transporta kao i obrada trupova tijekom klaoničkog procesa predstavljaju nove nedovoljno istražene rizike (ARZOOMAND i sur., 2019.). Najvažnije biološke opasnosti u mesu svinja su bakterije *Salmonella* spp. i *Y. enterocolitica*, te paraziti *Trichinella* spp. i *T. gondii*. Uzimajući u obzir njihovu limitiranu kontrolu u inspekciji mesa, osim za *Trichinella* spp., novi pristup koji se bazira na stvaranju dostatne baze podataka o seroprevalenciji tih patogena kod svinja na farmi, mogao bi pomoći u kontroli i osmišljavanju intervencijskih mjera u klaonicama (KIŠ i sur., 2021.).

Primjena serologije mesnog soka se u istraživanjima prevalencije može koristiti za *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. te se na osnovu dobivenih rezultata serološkog profiliranja životinja mogu izraditi korisni alati za kontrolu navedenih patogena na razini klaonice i/ili se informacije mogu uvrstiti u podatke o lancu prehrane (engl. *Food Chain Information*).

### 2.1. *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* je zoonotoksi parazit čija je visoka prevalencija kod ljudi i životinja zabilježena diljem svijeta. Cjelokupni životni ciklus *T. gondii* odvija se isključivo u konačnim domaćinima: domaćim i divljim mačkama, dok sve toplokrvne životinje mogu biti prijelazni domaćini (EFSA i ECDC, 2021.). To čini *T. gondii* jednim od najuspješnijih parazita na zemlji, koji inficira do trećine svjetske ljudske populacije. Štoviše, tokspolazmoza je visoko rangirana među najopasnijim parazitskim bolestima (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ i sur., 2019.).



Slika 1. Mogući načini nastanka infekcije *Toxoplasma gondii* (Izvor:

<https://hr.birmis.com/toxoplasma-zivotni-ciklus-patogena-toxoplasmagondiiitoksoplazmoza/>)

Ljudi se mogu inficirati ingestijom oocista (prisutnih u mačjem fecesu); direktno preko zemlje ili kontaminirane hrane ili vode; ingestijom tkivnih cista prisutnih u nedovoljno termički obrađenom ili sirovom mesu; transplantacijom organa ili vertikalno tijekom primarne infekcije u trudnoći. Simptomi toksoplazmoze kod imunokompetentnih ljudi najčešće su blagi i samo-limitirajući, dok imunokompromitirani pacijenti mogu imati izrazito teške i smrtonosne simptome te primarna infekcija tijekom trudnoće može dovesti do pobačaja ili nastanka kongenitalnih anomalija ploda (PLAZA i sur., 2020.). Kako bi se smanjio teret koji toksoplazmoza donosi ljudima, potrebno je provesti intervencijske mjere kod životinjskih rezervoara uz neizostavnu kolaboraciju između humanog i veterinarskog medicinskog sektora (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ i sur., 2019.).

### 2.1.1. Serologija mesnog soka svinja

Za razliku od drugih parazitskih zoonoza poput cisticerkoze i trihineloze danas ne postoje pouzdani sustavi kontrole toksoplazmoze u klaonicama. Međutim, *T. gondii* može se otkriti neizravnom metodom ELISA-e koja je brza, osjetljiva i jednostavna za izvođenje. Prisutnost protutijela na određeni patogen ukazuje na to da je životinja bila izložena patogenu u nekoj fazi života, iako seropozitivna životinja možda više nije zarazna (KOSMINA, 2021.).

Istraživanje seroprevalencije toksoplazmoze proveli su VILLARI i sur. (2009.) u domaćih sicilijanskih svinja, te nastojali utvrditi rizike povezane sa pojavom seropozitivnih životinja. Uzorci su prikupljeni unutar 7 klaonica i potjecali su sa 274 farme svinja koje su namijenjene klanju. Autori su proveli i analizu važnih čimbenika povezanih sa pojavnosti poput spola, starosti, podrijetla, namjene mesa zaklanih svinja te menadžmenta farme. Također su sakupljeni i podaci o načinu uzgoja, prisutnosti mačaka i pasa, provođenju deratizacije i vrsti rodenticida, metodama čišćenja nastamba i podrijetlu vode za piće. U istraživanju su koristili ELISA test (Institut Pourquier, Francuska), a protutijela su pronašli u 16,3% pregledanih sicilijanskih svinja. Najnižu seroprevalenciju (7%) su zabilježili u dobnoj skupini tovljenika u dobi od pet do sedam mjeseci, a najveću seroprevalenciju su dokazali u 19% rasplodnih životinja starijih od 24 mjeseca. Značajnija seroprevalencija u svinja je dokazana u gospodarstvima s manje od 50 svinja. Veća seroprevalencija u svinja je dokazana u gospodarstvima u kojima se nije redovito provodila deratizacija te kod onih koji koriste vodu iz vlastitih izvora a ne javnog vodovoda (VILLARI i sur., 2009.).

FELIN i sur. (2014.) proveli su istraživanje seroprevalencije *T. gondii* koje je obuhvatilo 1353 uzorka ošita od svinja na liniji klanja u razdoblju od studenog 2012. do travnja 2013. godine. Svinje su potjecale s 259 konvencionalnih farmi koje su podijeljene prema vrsti farme: velike farme tova ( $\geq 1000$  svinja), male farme tova ( $<1000$  svinja) i integrirane farme. Uzorci su prikupljeni metodom nasumičnog odabira iz dvije klaonice koji primaju životinje iz cijele Finske. Otprilike 75 % svinja u Finskoj je zaklano u ove dvije klaonice. Serološka pretraga mesnog soka napravljena je pomoću komercijalnog ELISA kita (Prio-CHECK Toxoplasma Ab Porcine test (Prionics AG, Schlieren-Zurich, Švicarska), prema uputama proizvođača. Protutijela na *Toxoplasma gondii* pronađena su kod 3% svinja i na 9% farmi, s time da je statistički značajna veća seroprevalencija zabilježena na malim farmama tova ( $P < 0.05$ ) (FELIN i sur., 2014.).

Prevalenciju *T. gondii* kod svinja istražili su LUNDEN i sur. (2002.) analizom 807 uzoraka mesnog soka prikupljenih 1999. godine iz 10 klaonica u Švedskoj. Ukupno je 42 (5,2 %) uzoraka bilo pozitivno na ELISA testu. Seroprevalencija kod tovljenika iznosila je 3,3 % te 17,3 % kod odraslih svinja (LUNDEN i sur., 2002.).

Velike razlike vidljive su između rezultata istraživanja provedenih u Italiji (16,3 % seropozitivnih svinja) i u Skandinaviji (3-5,2 % seropozitivnih svinja). Međutim, prisutne su i značajne sličnosti koje pokazuju da su invaziji češće podložne starije jedinke te da je *T. gondii* učestalija na manjim farmama. Zanimljivo je u kojoj mjeri ovi rezultati reflektiraju razinu i važnost primjene biosigurnosnih mjera na farmama.

## 2.2. *Salmonella* spp.

Salmoneloza ljudi uzrokovana različitim serovarovima *Salmonella enterica*, učestala je zoonoza koja se prenosi hranom u cijelom svijetu. Upravo zato, učinkovite kontrolne mjere nužne su kako bi se osiguralo smanjenje incidencije unutar zaraženih stada svinja te premostio socio-ekonomski teret uzrokovan infekcijom (MESCHEDE i sur., 2021.). Prosječna prevalencija *Salmonella* spp. kod zaklanih svinja iznosi 10,3% s velikim varijacijama unutar zemalja Europske unije (0-29 %). Među najčešće izolirane serovarove sa svinjskih farmi spadaju *S. Typhimurium* (90,7 %) i *S. Derby* (5,4 %) (EFSA i ECDC, 2015.). Iako se *Salmonella* spp. najčešće pronalazi u mesu peradi, njenu prevalenciju i poboljšanje strategije kontrole unutar populacije svinja ne treba zanemariti.

### 2.2.1. Serologija mesnog soka svinja

Rezultati istraživanja mesnog soka kojeg su proveli STEGE i sur. (2000.) u okviru danskog nacionalnog Programa kontrole *S. enterica* obuhvatili su 3372 uzorka mesnog soka iz 91 od 96 nasumično odabranih stada svinja i 1195 uzoraka mesnog soka iz 37 od 39 stada svinja visoke seroprevalencije. Od ukupno testiranih 39 visokoprevalentnih stada, *S. enterica* izolirana je u 77 % stada. Cilj istraživanja bio je istaknuti kako je subklinička infekcija *S. enterica* također jednako važna i opasna, jer može dovesti do klinički manifestne infekcije, a njezin visok zoonotski potencijal može ugroziti konzumente svinjskog mesa (STEGE i sur., 2000.).

U istraživanju FELIN i sur. (2014.) protutijela za *Salmonella* spp. analizirana su pomoću SALMOTYPE Pig Screen test (Labor Diagnostik GmbH, Leipzig, Njemačka), a protutijela su pronađena kod 3% svinja na ukupno 14% farmi. Ni na jednoj farmi nije pronađeno da su sve svinje bile seropozitivne, dok je u najvećem broju slučajeva (83 %) samo jedna svinja po farmi bila seropozitivna na *Salmonella* spp. Nadalje, postojala je pozitivna korelacija ( $p < 0,05$ ) između seropozitivnosti svinja za *Salmonella* spp. i *T. gondii* (FELIN i sur., 2014.). Također, rizični faktori u širenju *Salmonella* spp. unutar stada često su povezani s koinfekcijom s drugim patogenima, poput *Lawsonia intracellularis* (STEGE i sur., 2000.).

U istraživanju kojeg su proveli MEEMKEM i sur. (2014.) glavni cilj je bio evaluirati set seroloških testova koji pruža klasifikaciju stada svinja u „zoonotski rizičnu“ kategoriju i

„zdravstveno rizičnu“ kategoriju koristeći mesni sok kao uzorak za ELISA testiranje. Ukupno je analizirano 60 uzoraka mesnog soka iz 49 stada svinja na protutijela za *Salmonella* spp. uzorkovanih u razdoblju od rujna 2010. godine do ožujka 2011. godine. Seroprevalencija stada, u kojem jedan pozitivan uzorak po stadu označava cijelo stado kao pozitivno, bila je veća od 80%. Vrijednosti seroprevalencije unutar jednog stada, iako su sva bila locirana u sjeverozapadnom dijelu Njemačke u radijusu od 250 km, značajno su se razlikovale od stada do stada. Ovi rezultati pokazuju da je serološko profiliranje stada prema riziku uzimajući u obzir zoonoze i proizvodne bolesti smisljeno, te ukoliko se podaci koriste u odlučivanju baziranom na riziku u kontekstu „nove“ inspekcije mesa, mogu uvelike doprinijeti upravljanju zdravljem stada. Stoga bi razvoj isplativog testnog sustava za istovremeno otkrivanje različitih protutijela trebao biti sljedeći korak za opsežnu implementaciju multiserološkog koncepta mesnog soka (MEEMKEM i sur., 2014.).

Analizirajući navedena istraživanja, vidljivo je kako je seroprevalencija *Salmonella enterica* unutar stada vrlo varijabilna, dok je njena prisutnost u cjelokupnoj promatranoj populaciji svinja najčešće zastupljena u otprilike 80 % stada.

### **2.3. *Yersinia* spp.**

*Yersinia enterocolitica* je enteropatogena bakterija koji se prenosi hranom te kod ljudi uzrokuje akutni gastroenteritis popraćen simptomima groznice, proljeva i povraćanja (PENG i sur., 2018.). Jersinioza ljudi, većinom uzrokovana s *Y. enterocolitica* bila je četvrta najučestalije prijavljena zoonoza koja se prenosi hranom u Europskoj Uniji 2019.godine (EFSA i ECDC, 2021.). Nekarakteristično za enterobakterije, odlikuje je psihrotrofnost, odnosno sposobnost neometanog rasta i preživljavanja na temperaturama hlađenja (PAŽIN, 2021.). Najvažnije zoonoze koje se prenose svinjskim mesom poput salmoneloze i jersinioze uzrokuju jedino latentnu infekciju kod svinja. Posljedično, infekcija tim patogenima kod svinja ne uzrokuje vidljive ili palpabilne promjene na svinjskom trupu, što predstavlja najvažniji razlog zašto tradicionalna inspekcija mesa koja obuhvaća inspekciju, palpaciju i inciziju nije u mogućnosti detektirati današnje rizike u sigurnosti hrane (MEEMKEN i sur., 2014.). Primjenom serologije mesnog soka može se dokazati stvaran broj inficiranih svinja čiji je imunološki sustav prepoznao i reagirao na antigen za razliku od mikrobiološkog pretraživanja limfnog tkiva na liniji klanja gdje ishod pretrage ovisi o brojnim čimbenicima poput, trenutka nastanka infekcije (na farmi, tijekom transporta, u oboru klaonice) i postupcima prilikom klaoničke obrade (križno onečišćenje) (PAŽIN, 2021.).

#### **2.3.1. Serologija mesnog soka svinja**

U istraživanju seroprevalencije svinja u sjevernoj Italiji BONARDI i sur. (2016.) testirali su uzorke ošita na protutijela za *Yersinia* spp. pomoću komercijalnog ELISA kita. Ukupno je testiran 201 uzorak iz 67 serija klanja u razdoblju od lipnja 2013. do listopada 2014. godine. Rezultati testiranja pokazali su da je 56,1 % uzoraka mesnog soka bilo pozitivno na *Yersinia* spp. protutijela (BONARDI i sur., 2016.).

VANANTWERPEN i sur. (2014.) istraživali su sezonalnu varijabilnost seroprevalencije *Yersinia* spp. tijekom 2012. godine u Belgiji. Nasumično su uzorkovali 100 serija svinja na liniji klanja te rezultate promatrali na razini pojedine svinje i skupine svinja. Iako su istraživane farme rasprostranjene na području cijele Belgije, većina ih se nalazila u zapadnom dijelu države. Ukupno je uzorkovano 7074 svinjska ošita iz kojeg se pripremao mesni sok za pretragu ELISA testom Pigtype Yopscreen (Labor Diagnostik Leipzig, Qiagen,

Leipzig, Njemačka). Serija je klasificirana kao pozitivna ako je jedna svinja unutar serije imala aktivnu vrijednost iznad granične vrijednosti (OD=0.3). Prosječna seroprevalencija unutar serija svinja iznosila je 66,4 %. Istraživanjem predikcije infekcioznog statusa svinja baziranom na serološkim podacima, bakteriološkom pretragom *Yersinia* spp. bila je pronađena kod 2009 svinja, od kojih je 1872 imalo također prisutna protutijela za *Yersinia* spp. Autori su na temelju ovih rezultat zaključili kako je poznavanje infekcioznog statusa svinja prije klanja izrazito važno, te predstavlja temelj određivanja redoslijeda klanja (tzv. logističko klanje) koje se pokazalo kao vrlo koristan alat u sprečavanju širenja *Yersinia* spp. i križnog onečišćenja svinjskih trupova prilikom klanja (VANANTWERPEN, 2014.).

Zabilježena je vrlo snažna pozitivna korelacija između seropozitivnih svinja na *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. Ukupan broj svinja u istraživanju FELIN i sur. (2014.) koje su bile i *Salmonella* seropozitivne i *Yersinia* seropozitivne iznosio je gotovo 84%. Također, na farmama na kojima je bila prisutna *Salmonella* spp., postotak *Yersinia* seropozitivnih svinja bio je statistički značajno veći ( $P < 0.05$ ) u odnosu na one farme gdje *Salmonella* spp. nije pronađena (FELIN i sur., 2014.).



### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje ošita svinja obavljeno je probabilističkom metodom jednostavnog nasumičnog odabira u regionalnim klaonicama (klaonica I i II) i seoskim domaćinstvima 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 svinjogojskih farmi te 37 s 18 seoskih domaćinstava. Uzorci su pohranjivani u sterilne vrećice te transportirani u prijenosnom hladnjaku u Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 2. Uzorkovanje ošita u klaonici

## 3.2. Serološka pretraga mesnog soka

### 3.2.1. Priprema mesnog soka za detekciju protutijela komercijalnim ELISA kitovima

Nakon primitka svježih uzoraka ošita s linije klanja, uzorci su se zamrzavali u Zavodu za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane. Potom su se prebacivali, sterilnim priborom, u vrećice za homogenizaciju i odmrzavali pri 4°C tijekom 24 h ± 4 h. Nakon prikupljanja 1 ml mesnog soka iz svakog uzorka, mesni sok se prebacivao u plastične kivete od 1,5 ml te ponovno zamrzavao na -20 °C do početka analize.



Slika 3. Priprema mesnog soka za analizu pomoću ELISA metode

### 3.2.2. Procedura detekcije protutijela komercijalnim ELISA kitovima

Prisutnost IgG protutijela na *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. određena je komercijalnim ELISA kitovima s inaktiviranim antigenom (Indical Bioscience GmbH, Germany). Uzorci mesnog soka su se razrjeđivali u omjeru 1:10 prema uputi proizvođača. Svaki protokol sadržavao je 2 pozitivne i 2 negativne kontrole iz ELISA kita. U jažice mikrotitracijske pločice koje su obložene specifičnim antigenom dodavalo se 100 µl uzorka te se potom sve inkubiralo na sobnoj temperaturi 1 sat. Nakon inkubacije, jažice su se ispirale 3 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 je dodano u svaku jažicu te je potom uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi bez izlaganja svjetlosti. Reakcija je zaustavljena nakon 10 minuta dodavanjem 100 µl STOP otopine. Nakon cjelokupne procedure, očitana je absorbancija pomoću čitača mikropločica (BioTek ELx800) i analizirana pomoću Gen5™ softvera (BioTek Instruments, Inc.). Izračunat je S/P omjer za svaki uzorak te su oni uzorci sa S/P omjerom  $\geq 0.3$  smatrani pozitivnim.



Slika 4. Komercijalni ELISA kit pigtype® Toxoplasma Ab  
(<https://shop.indical.com/en/assays-and-reagents/pigtype-toxoplasma-ab-5-elisa-plates.html>)

### 3.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata provedena je pomoću računalnog programa TIBCO Statistica 13.5. Statistički značajne razlike u seroprevalenciji *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. obzirom na veličinu farme i njezinu kategoriju biosigurnosti utvrđivane su Fisher egzaktnim testom na razini  $p=0.05$ .

#### 4. 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 8 svinja na gospodarstvu. Svinja se smatra seropozitivnom ukoliko je S/P omjer uzorka bio veći ili jednak 0.3, dok se farma smatra pozitivnom ukoliko je barem jedan uzorak na farmi bio seropozitivan. Rezultati serološke pretrage prikazani su u tablici 1 i tablici 2 sukladno tipu farme podrijetla i kategoriji biosigurnosti.



Slika 5. Mikrotitracijska pločica nakon očitavanja rezultata ELISA testiranja

Tablica 1. Seroprevalencija *T.gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u svinja koje potječu s velikih svinjogojskih farmi i seoskih domaćinstava u Hrvatskoj

Patogen	Svinje		Farme	
	N*	%	N*	%
<i>Toxoplasma gondii</i>				
Velike farme	0	0	0	0
Seoska domaćinstva	12	13,18 %	6	33,3 %
Ukupno	12	13,18 %	6	16,67 %
<i>Salmonella</i> spp.				
Velike farme	26	48,14 %	14	77,7 %
Seoska domaćinstva	18	48,64 %	9	50 %
Ukupno	44	48,35 %	23	63,8 %
<i>Yersinia</i> spp.				
Velike farme	6	11,1 %	5	27,7 %
Seoska domaćinstva	6	16,21 %	5	27,7 %
Ukupno	12	13,18 %	10	27,7 %

\* Svinja se smatra seropozitivnom ukoliko je S/P omjer uzorka bio veći ili jednak 0.3.

\* Farma se smatra seropozitivnom ukoliko je barem jedan uzorak na farmi seropozitivan.

Od ukupno pretraženog 91 uzorka mesnog soka svinja, 13,18 % je bilo pozitivno na protutijela prema *Yersinia* spp. i *T. gondii*, dok je 48,35 % svinja posjedovalo protutijela prema *Salmonella* spp. Sumiranjem rezultata po tipu farme podrijetla ukupno je zabilježena neznatno veća seroprevalencija *Yersinia* spp i *Salmonella* spp. na seoskim domaćinstvima u odnosu na velike farme, no bez statistički značajne razlike ( $p>0.05$ ). Za razliku od njih, sve *T. gondii* seropozitivne svinje potjecale su sa seoskih domaćinstava ( $p<0.05$ ).

Protutijela prema *Salmonella* spp. su pronađena u 48,35 % svinja na ukupno 63,8 % farmi od kojih su na 27 % farmi sve uzorkovane svinje bile seropozitivne. Protutijela prema *Yersinia* spp su pronađena kod 13,18 % svinja na ukupno 27,7 % farmi. Ukupno su na 16,67% farmi pronađena protutijela za *T. gondii* u 13,18 % testiranih svinja.

Ukupan udio svinja u istraživanju koje su bile i *Salmonella* seropozitivne i *Yersinia* seropozitivne iznosio je 10,98 %. Od ukupnog broja uzoraka, 5,49% sadržavalo je protutijela i za *Salmonella* spp. i *T. gondii*. Ukupno je 1,09 % testiranih svinja bilo serološki pozitivno na sva tri patogena.

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

Kategorija biosigurnosti (broj testiranih uzoraka)	Pozitivni uzorci		
	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.
1 (10)	N=1	N=6	0
	8,3%	13,6%	0
2 (43)	N=11	N=22	N=9
	91,6%	50%	75%
3 (36)	0	N=14	N=1
	0	31,8%	8,3%
4 (2)	0	N=2	N=2
	0	4,5%	16,67%
UKUPNO	N=12	N=44	N=12
	13,18%	48,35%	13,18%

Seroprevalencija *T. gondii* razlikuje se između kategorija biosigurnosti farme: dok u kategoriji 3 i 4 nisu pronađene pozitivne jedinice, u kategoriji 2 zamijećena je značajno veća seroprevalencija u odnosu na kategoriju 3 ( $p < 0.05$ ).

Za razliku od *T. gondii* razlike u seroprevalenciji *Salmonella* spp. između pojedinih kategorija farmi nisu bile statistički značajne ( $p > 0.05$ ). Ipak, ukupna seroprevalencija u sve četiri kategorije bila je veća od 50%.

Seroprevalencija *Yersinia* spp. također se razlikuje između pojedinih kategorija farmi, a statistički značajno veća seroprevalencija je utvrđena kod jedinki s farmi biosigurnosne kategorije 4 ( $p < 0.05$ ). Za razliku od *T. gondii* i *Salmonella* spp., kod uzoraka s farme biosigurnosne kategorije 1 nisu utvrđena protutijela na *Yersinia* spp.



## 6. Rasprava

Kvalitativna procjena rizika identificirala je *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, *T. gondii* i *Trichinella* spp. kao najčešće biološke opasnosti u inspekciji mesa svinja (EFSA, 2011.). Najveći problem kontrole ovih patogena je njihova prisutnost u latentno inficiranih životinja koje makroskopski *post-mortem* pregled mesa ne može otkriti, osim kontrole *Trichinella* spp. koja se provodi pomoću laboratorijskih analiza (FELIN i sur., 2014.). Ipak, prisutnost rizika s obzirom na *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u mesu može se neizravno ispitati praćenjem njihove seroprevalencije pomoću serološke pretrage mesnog soka. U ovom radu korišteni su uzorci mesnog soka svinja za određivanje seroprevalencije *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. kod domaćih svinja koje potječu s velikih svinjogojskih farmi i seoskih domaćinstava iz Hrvatske.

Protutijela za *T. gondii* pronađena su kod 13,18% svinja i na 16,67 % farmi. Farma se smatra pozitivnom ukoliko je barem jedan uzorak na farmi bio seropozitivan. Ukupna seroprevalencija (13,18 %) bila je visoka, s prisutnim velikim varijacijama s obzirom na veličinu farme podrijetla, gdje je 100 % pozitivnih svinja potjecalo sa seoskih domaćinstava. Ovi rezultati sukladni su pojedinim provedenim istraživanjima (DUBEY, J. P. 2009.; VILLARI i sur., 2009.; FOROUTAN i sur., 2019.) Iako bi uzgoj svinja u zatvorenim objektima trebao značajno doprinijeti smanjenju infekcije svinja sa *T. gondii* (DUBEY, J. P. 2009.), zabilježena veća seroprevalencija na seoskim domaćinstvima u ovom istraživanju, koja većinom uzgajaju svinje u zatvorenim objektima bez pristupa ispustu, može se povezati s prisutnosti mačaka i glodavaca te neadekvatnim postupcima provođenja deratizacije (KIJLSTRA i sur., 2008.; VILLARI i sur., 2009.). Prema ovom istraživanju, svako treće seosko domaćinstvo je seropozitivno na *T. gondii*. Većina pozitivnih uzoraka potjecala je s farma biosigurnosti 2, što znači da mjere biosigurnosti nisu uspjele na ovim farmama, te bi prikladna reklasifikacija kategorije biosigurnosti dodijeljene farmama trebala biti razmatrana (KIŠ i sur., 2021.). Ovi podaci mogu pomoći postojećim i predloženim budućim aktivnostima koje adresiraju toksoplazmozu u kontekstu Jednog zdravlja (DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ i sur., 2019.). U istraživanju intervencijskih strategija za smanjenje prijetnji koji uzrokuju toksoplazmoza ljudi, OPSTEEGH i sur. (2015.) predlažu između ostalog, dekontaminacijske metode tretiranja mesa koje najčešće uključuju zamrzavanje ili dostatnu termičku obradu mesa za konzumaciju.

Seroprevalencija *Salmonella* spp. u promatranoj populaciji svinja iznosila je 48,35 % dok je neznajno veća seroprevalencija zabilježena na malim farmama što je dosljedno istraživanjima koje su proveli VIANA i sur. (2020.) i GRADASSI i sur. (2015.). Ukupna seroprevalencija farma, u kojem jedan pozitivan uzorak po farmi klasificira cijelu farmu kao pozitivnu, iznosi 63,8 %, što je bilo očekivano s obzirom na slična provedena istraživanja (STEGE i sur. 2000.; MEEMKEM i sur., 2014.). Također, seroprevalencija *Salmonella* spp. je u sve četiri kategorije biosigurnosti bila veća od 50 %. Serološka pretraga mesnog soka koristi se kao metoda klasifikacije stada svinja prema riziku za *Salmonella* spp. u okviru brojnih nacionalnih programa kontrole u Europskoj Uniji poput danskog programa kontrole *Salmonella enterica*, njemačkog Q-S (Quality and Safety) sistema i finskog programa kontrole *Salmonella* spp., koji je gotovo uspio eliminirati infekciju (ANONYMOUS, 2010.). Također, unatoč brojnim debatama o analizi troškova i koristi provođenja strogih nacionalnih Programa kontrole diljem Europske unije, finški program kontrole *Salmonella* spp. u hrani za svinje, pokazao se kao financijski koristan i ekonomski isplativ (NIEMI i sur., 2019.). Serološka pretraga mesnog soka prepoznata je kao pouzdana, brza, lako izvediva i isplativa metoda monitoringa i kontrole *Salmonella* spp. u stadima svinja. Rezultati evaluacije setova seroloških testova koje su zabilježili MEEMKEN i sur. (2014.) pokazuju da serološko profiliranje i klasifikacija stada svinja u „zoonotski rizičnu“ kategoriju i „zdravstveno rizičnu“ kategoriju može uvelike pomoći u odlučivanju baziranom na riziku. Detekcija protutijela pokazala se korisnom ukoliko je cilj verificirati jesu li stada svinja bila prethodno izložena bakteriji *Salmonella* spp. Ipak, otkrivanje infekcijskog statusa svinja za vrijeme klanja i utvrđivanje povezanog rizika za diseminacijom *Salmonella* spp. može se jedino procijeniti bakteriološkom pretragom različitih uzoraka, a najbolje kombinacijom više njih (METHNER i sur., 2011.). Podaci o seroprevalenciji *Salmonella* spp. mogu uvelike pomoći u provedbi logističkog klanja i doprinijeti izbjegavanju križnog onečišćenja trupova unutar klaonice (SWANENBURG i sur., 2001.). U istraživanju efekta logističkog klanja na prevalenciju *Salmonella* spp. kod svinja, rezultati su pokazali kako je kontaminacija trupova nakon klanja djelomično prisutna zbog pozitivnih stada svinja koji su bili prethodno zaklani na istoj liniji klanja, ali i zbog stalno prisutne bakteriološke mikrobiote klaonice. Kako bi povećali higijenski standardi i izbjegla križna kontaminacija trupova sa stalno prisutnom bakteriološkom florom iz kamiona, obora ili linije klanja, čišćenje i metode dezinfekcije trebaju biti poboljšani (SWANENBURG i sur., 2001.). Također, u istraživanju nesukladnosti između izolacije *Salmonella* spp. iz mezenterijalnih limfnih čvorova i rezultata serološkog

profiliranja svinja na liniji klanja, NOLLET i sur. (2005.) demonstrirali su kako bi analiziranjem pet uzoraka po stadu svinja, vjerojatnost klasificiranja *Salmonella* pozitivnog stada kao seropozitivnog iznosila 98,8% sa graničnom vrijednošću od 0.2. Bez obzira na ove rezultate, važnost primjene načela dobre higijenske prakse kroz cijeli lanac proizvodnje mesa ne treba biti zanemarena.

Korištenjem komercijalnih ELISA kitova za detekciju protutijela na *Yersinia* spp. s inaktiviranim antigenom (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Njemačka), ustanovljena je seroprevalencija od 13,18 %. Ovi rezultati bili su očekivani s obzirom na slično istraživanje kojeg su proveli KIŠ i sur. (2021.) u Hrvatskoj, ali su za 5 % veći od europskog prosjeka (EFSA i ECDC, 2021.). Neočekivano, značajno veća seroprevalencija zabilježena je na farmama najveće biosigurnosne kategorije 4. Ukupna seroprevalencija farmi, u kojem jedan pozitivan uzorak po farmi klasificira cijelu farmu kao pozitivnu, iznosi 27,7 %. Velik broj *Yersinia* pozitivnih farmi nije bio iznenađujući s obzirom na provedena istraživanja gdje je zabilježena seroprevalencija farmi i do 80 % (MEEMKEN i sur., 2014.). Brojna istraživanja, poput istraživanja VAN DAMME i sur. (2014.), zabilježila su snažnu pozitivnu korelaciju između serologije i prisutnosti enteropatogene *Yersinia* spp. u tonzilama, zbog čega se tijekom posljednjih godina, primjena serologije mesnog soka preporuča kao metoda monitoringa, kontrole i kategorizacije farmi prema riziku za *Yersinia* spp. (BONARDI i sur., 2016.). Podaci o seroprevalenciji mogu uvelike pomoći u kontroli i osmišljavanju intervencijskih mjera u klaonicama i/ili se mogu uvrstiti u podatke o lancu prehrane (KIŠ i sur., 2021.). Rezultati utvrđivanja seroprevalencije u ovom istraživanju, ukazuju na nedostatnu razinu i uspješnost primjene biosigurnosnih mjera na farmama.. S obzirom da je prisutnost patogene *Yersinia* spp. na tonzilama svinja jedan od glavnih rizičnih faktora za nastanak križnog onečišćenja u klaonicama (VILAR i sur., 2015.), trupovi seropozitivnih svinja trebali bi biti podvrgnuti procesima dekontaminacije (vodenom parom ili vrućom vodom) na kraju linije klanja kako bi se smanjila incidencija *Yersinia* spp. i reducirao potencijalni rizik (ZDOLEC i KIŠ, 2021.). Također, dostatne baze podataka o seroprevalenciji predstavljaju temelj određivanja redosljeda prilikom logističkog klanja koje se pokazalo kao vrlo koristan alat u sprečavanju širenja *Yersinia* spp. i križnog onečišćenja svinjskih trupova prilikom klanja (VANANTWERPEN, 2014.).

S obzirom da je *Y. enterocolitica* često zaboravljeni patogeni mikroorganizam u veterinarskom javnom zdravstvu i kontroli mesa (ZDOLEC i KIŠ, 2021.) i da pogodna

praktična metoda za direktnu detekciju *T. gondii* ne postoji (BASSO i sur., 2013.), ovim istraživanjem prikazane su brojne prednosti serologije mesnog soka kao brzog, jednostavnog, lako izvedivog i isplativog sustava monitoringa i kontrole ovih patogena. Kako bi se brojne pružene prednosti iskoristile, preporuča se uvrštavanje podataka o serološkom profiliranju životinja u podatke o lancu prehranu (engl. *Food Chain Information*). Također, rezultati serološkog testiranja reflektiraju razinu primjene biosigurnosnih mjera na farmama te pokazuju gdje bi se one mogle poboljšati. Na kraju, serologija mesnog soka izvrsna je metoda monitoringa zoonoza koje se prenose putem svinjskog mesa na nacionalnoj razini, koja neminovno može pomoći u poboljšanju sigurnosti mesa te prevenciji bolesti koje se prenose hranom u kontekstu Jednog zdravlja. Uz to, stvaranje sigurnog prehrambenog okruženja pridonijet će poboljšanju zdravlja i kvalitete života potrošača te pomoći društvu da smanji troškove povezane sa zdravljem i uspješno implementira europsku strategiju „Od polja do stola“.

## 6. Zaključci

1. Rezultati serološkog testiranja reflektiraju razinu primjene biosigurnostih mjera na farmama te se preporuča uvrštavanje podataka o serološkom profiliranju životinja u podatke o lancu prehranu (engl. *Food Chain Information*).
2. Serologija mesnog soka je brza, jednostavna i lako izvediva metoda te moguć alat u monitoringu i kontroli *T. gondii*, *Salmonella* spp. i *Y. enterocolitica* u lancu mesa.

## 7. Literatura

1. ACINGER- ROGIĆ, Ž. (2019.): Rezultati kategorizacije gospodarstava na kojima se drže svinje u odnosu na rizik od afričke svinjske kuge – prethodno priopćenje. Zbornik radova Veterinarski dani, 23.-26. listopad. Primošten, Hrvatska.
2. ANONYMOUS (2010.): Analysis of the costs and benefits of setting a target for the reduction of Salmonella in slaughter pigs - Final report.
3. ARZOOMAND, N., I. VAGSHOLM, R. NISKANEN, A. JOHANSSON, A. COMIN (2019.): Flexible distribution of tasks in meat inspection- A pilot study. Food control 102, 166-172.  
[DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.03.010](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.010)
4. BASSO, W., S. HARTNACK, L. PARDINI, P. MAKSIMOV, B. KOUDELA, M. C. VENTURINI, G. SCHARES, X. SIDLER, F. I. LEWIS, P. DEPLAZES (2013.): Assessment of diagnostic accuracy of a commercial ELISA for the detection of Toxoplasma gondii infection in pigs compared with IFAT, TgSAG1-ELISA and Western blot, using a Bayesian latent class approach. Int. J. Parasitol 43(7), 565-570.  
[DOI: 10.1016/j.ijpara.2013.02.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.02.003)
5. 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.  
[DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.107870](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107870)
6. BONARDI, S., I. BRUINI, M. D' INCAU, I. VAN DAMME, E. CARNIEL, S. BRÉMONT, P. CAVALINI, S. TAGLIABUE, F. BRINDANI (2016.): Detection, seroprevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in pig tonsils in Northern Italy. Int. J. Food Microbiol., 235, 125-132.  
[DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.033](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.033)
7. DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O., J. DUPOUY-CAMET, J. VAN DER GIESSEN, J. P. DUBEY (2019.): Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective. Food Waterborne Parasitol., 15, e00054.

- [DOI: 10.1016/j.fawpar.2019.e00054](https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00054)
8. DUBEY, J. P. (2009.): Toxoplasmosis in pigs - The last 20 years. *Vet. Parasitol.* 164, 89-103.  
[DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.05.018](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.018)
  9. EFSA (2011.). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from swine. *EFSA J.*, 9, 2351.  
[DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2351](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2351)
  10. EFSA i ECDC (2015.): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA J.* 2015 13(12), 4329.  
[DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4329)
  11. EFSA i ECDC (2021.): The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J.*, 19, 2, e06406.  
[DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6406](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406)
  12. FELIN, E., E. JUKOLA, S. RAULO, M. FREDRIKSSON-AHOMAA (2014.): Meat juice serology and improved food chain information as control tools for pork-related public health hazards. *Zoonoses Public Health*, 62, 456-464.  
[DOI: 10.1111/zph.12174](https://doi.org/10.1111/zph.12174)
  13. 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.  
[DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.04.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.012)
  14. GRADASSI, M., A. CAMINITI, G. GALLETI, A. SANTI, G. PATERNOSTER, M. TAMBA, M. ZANONI, S. TAGLIABUE, G. L. ALBORALI, M. TREVISANI (2015.): Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. *Res. Vet. Sci.* 101, 154-160.  
[DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.06.015](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.015).
  15. 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 (3–4), 183-190.  
[DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.05.030](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.030).

16. KIŠ, M., N. ZDOLEC, V. BADOVINAC, L. LOVRIC (2021.): The use of meat juice serological surveillance for the control of important zoonotic agents in pigs at slaughter. Proceedings of lectures and posters HYGIENA ALIMENTORUM XLI, Štrbske Pleso, Slovačka, 2021., str. 244-251.
17. KOSMINA, T. A. (2021.): Primjena serologije mesnog soka u inspekciji mesa. Diplomski rad. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
18. LUNDEN, A., P. LIND, E.O. ENGVALL, K. GUSTAVSSON, A. UGGLA, I. VAGSHOLM (2002.): Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.*, 34, 362-365.  
[DOI:10.1080/00365540110080205](https://doi.org/10.1080/00365540110080205)
19. MEEMKEN. D., A., H. TANGEMANN, D.MEERMEIER, S. GUNDLACH, D. MISCHOK, M. GREINERA, 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.  
[DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.12.006](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.12.006)
20. MESCHEDE, J., S. HOLTRUP, R. DEITMER, A.P.MESU, C. KRAFT (2021.): Reduction of *Salmonella* prevalence at slaughter in *Lawsonia intracellularis* co-infected swine herds by Enterisol® Ileitis vaccination. *Heliyon J.*, 7, e06714.  
[DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06714](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06714)
21. METHNER, U., N. RAMMLER, K. FEHLHABER, U. RÖSLER (2011.): *Salmonella* status of pigs at slaughter — Bacteriological and serological analysis. *Int. J. Food Microbiol.*, 151 (1), 15-20.  
[DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.028](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.028).
22. NIEMI, J. K., K. HEINOLA, M. SIMOLA, P. TUOMINEN (2019.): *Salmonella* Control Programme of Pig Feeds Is Financially Beneficial in Finland. *Front. Vet. Sci.*, 6, 200.  
[DOI: 10.3389/fvets.2019.00200](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00200)
23. NOLLET, N., D. MAES, L. DUCHATEAU, V. HAUTEKIET, K. HOUF, J. VAN HOOF, L. DE ZUTTERA, A. DE KRUIF, R. GEERS (2005.): Discrepancies between the isolation of *Salmonella* from mesenteric lymph nodes and the results of serological screening in slaughter pigs. *Vet. Res.*, 36 (4), 545-555.  
[DOI: 10.1051/vetres:2005014](https://doi.org/10.1051/vetres:2005014)



24. OPSTEEGH, M., T. M. KORTBEEK, A. H. HAVELAAR, J. W. B. VAN DER GIESSEN (2015.): Intervention Strategies to Reduce Human *Toxoplasma gondii* Disease Burden. *Clin. Infect. Dis.*, 60 (1), 101–107  
[DOI: 10.1093/cid/ciu721](https://doi.org/10.1093/cid/ciu721)
25. PAŽIN, V. (2021.): Fenotipske i genske značajke izolata *Yersinia enterocolitica* izdvojenih u lancu proizvodnje svinjskog mesa. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
26. PENG, Z., M. ZOU, M. LI, D. LIU, W. GUAN, Q. HAO, J. XU, S. ZHANG, H. JING, Y. LI, X. LIU, D. YU, S. YAN, W. WANG, F. LI (2018.): Prevalence, antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of *Yersinia enterocolitica* in retail poultry and swine feces in parts of China. *Food Control* 93, 121-128.  
[DOI:10.1016/j.foodcont.2018.05.048](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.048)
27. PLAZA, J., FILIP D., ISABELLE V., ELISABETH A. I., FRANK K., CLARE M. H. (2020.): Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland. *Food Waterborne Parasitol.*, 20, e00086.  
[DOI: 10.1016/j.fawpar.2020.e00086](https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00086)
28. STEGE, H., J. CHRISTENSEN, J. P. NIELSEN, D. L. BAGGESEN, C. ENOE, P. WILLEBERG (2000.): Prevalence of subclinical *Salmonella enterica* infection in Danish finishing pig herds. *Prev. Vet. Med.*, 44, 175-188.  
[DOI: 10.1016/S0167-5877\(00\)00103-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00103-3)
29. SWANENBURG, M., P. J. VAN DER WOLF, H. A. URLINGS, J.M. SNIJDERS, F. VAN KNAPEN (2001.): *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *Int. J. Food Microbiol.*, 70 (3), 231-242.  
[DOI: 10.1016/S0168-1605\(01\)00546-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00546-3)
30. VAN DAMME, I., G. VANANTWERPEN, D. BERKVENS, L. DE ZUTTER (2014.): Relation Between Serology of Meat Juice and Bacteriology of Tonsils and Feces for the Detection of Enteropathogenic *Yersinia* spp. in Pigs at Slaughter. *Foodborne Pathog. Dis.* 11, 8.  
[DOI: 10.1089/fpd.2014.1743](https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1743)
31. VANANTWERPEN, G. (2014.): Prevalence and risk factors of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at slaughter age. Disertacija. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Ghentu, Ghent, Belgija.

32. VANANTWERPEN, G., I. VAN DAMME, L. DE ZUTTER, K. HOUF (2014.): Seroprevalence of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pig batches at slaughter. *Prev. Vet. Med.*, 116 (1-2), 193-196.  
[DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.05.011](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.05.011)
33. VIANA, C., M. J. SERENO, L. D. S. BERSOT, J. D. KICH, L. A. NERO (2020.): Comparison of Meat Juice Serology and Bacteriology for Surveillance of *Salmonella* in the Brazilian Pork Production Chain. *Foodborne Pathog. Dis.* 17 (3).  
[DOI:10.1089/fpd.2019.2712](https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2712)
34. VILAR, M. J., S. VIRTANEN, R. LAUKKANEN-NINIOS, H. KORKEALA (2015.): Bayesian modelling to identify the risk factors for *Yersinia enterocolitica* contamination of pork carcasses and pluck sets in slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.*, 197, 53-57.  
[DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.020](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.020)
35. 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 (1-2).  
[DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.01.019](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.019)
36. VUČEMILO, M., B. VINKOVIĆ, A. TOFANT, Ž. PAVIČIĆ, S. HAĐINA (2004.): Veterinarska zaštita okoliša i animalna higijena danas. Zbornik radova 3. Hrvatskog veterinarskog kongresa, 17. - 21. studenog. Opatija, Hrvatska. str. 315-322.
37. ZDOLEC, N., M. KIŠ (2021.): Meat Safety from Farm to Slaughter—Risk-Based Control of *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*. *Processes* 2021, 9, 815.  
[DOI: 10.3390/pr9050815](https://doi.org/10.3390/pr9050815)

## 8. Sažetak

### Primjena serologije mesnog soka u kontroli *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp. u klaonicama svinja

Dunja Fuštin

Trenutno obavezna makroskopska vizualna inspekcija mesa ne može detektirati najčešće patogene koje se prenose svinjskim mesom (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i *Toxoplasma gondii*). Uzevši u obzir zahtjevnost, dugotrajnost i kompliciranost izvođenja konvencionalnih laboratorijskih mikrobioloških pretraga na *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* spp., te nedostatak pogodne praktične metode za direktnu detekciju *Toxoplasma gondii*, brojne mogućnosti i prilike predviđaju se u primjeni serologije mesnog soka kao neizravne metode praćenja prisutnosti rizika s obzirom na navedene patogene. Cilj ovog istraživanja je utvrditi seroprevalenciju navedenih patogena u promatranoj populaciji svinja u Hrvatskoj te analizirati opravdanost primjene serologije mesnog soka unutar klaonica svinja. Ukupno je pretražen 91 uzorak mesnog soka domaćih svinja od kojih 54 uzorka mesnog soka potječu s 18 velikih svinjogojskih farmi na kojima je prosječno tovljeno 3793 svinje godišnje, te 37 uzoraka mesnog soka koji potječu s 18 seoskih domaćinstava koja prosječno drže 8 svinja na gospodarstvu. Prisutnost IgG protutijela na *Toxoplasma gondii*, *Yersinia* spp. i *Salmonella* spp. određena je komercijalnim ELISA kitovima s inaktiviranim antigenom (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Njemačka). Protutijela za *Toxoplasma gondii* pronađena su u 13,18% svinja i na 16,67% farmi, dok su *Salmonella* spp. protutijela pronađena kod 48,35 % svinja i na 63,8 % farmi. Ukupno je 13,18 % svinja na 27,7 % farmi bilo seropozitivno na *Yersinia* spp. Serologija mesnog soka prepoznata je kao brza, jednostavna i lako izvediva metoda te isplativi sustav monitoringa i kontrole *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. i *Yersinia enterocolitica* unutar klaonica svinja koja bi povećala sigurnost u cijelom lancu mesa.

**Ključne riječi:** serologija, mesni sok, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*

## 9. Summary

### **The use of meat juice serology for the control of *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp. in pig slaughterhouses**

Dunja Fuštin

Currently, the mandatory macroscopic visual inspection of meat cannot detect the most common pathogens transmitted by pork (*Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Toxoplasma gondii*). Taking into account the high demanding, long and complicated performance of conventional laboratory microbiological tests for *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp., and the lack of a suitable practical method for the direct detection of *Toxoplasma gondii*, numerous possibilities and opportunities are foreseen in the application of meat juice serology as an indirect method of monitoring the presence of risks for mentioned pathogens. The aim of this research is to determine the seroprevalence of the mentioned pathogens in the observed pig population in Croatia and to analyze the justification for the use of meat juice in pig slaughterhouses. A total of 91 samples of meat juice from domestic pigs were analyzed, of which 54 samples of meat juice come from 18 large pig farms where an average of 3793 pigs are fattened per year, and 37 samples of meat juice come from 18 rural households that keep an average of 8 pigs on the farm. The presence of IgG antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Yersinia* spp., and *Salmonella* spp. was determined by commercial ELISA kits with inactivated antigen (Indical Bioscience GmbH, Leipzig, Germany). Antibodies to *Toxoplasma gondii* were found in 13,18 % of pigs and in 16,67 % of farms, while *Salmonella* spp. antibodies were found in 48,35 % of pigs and in 63,8 % of farms. In total, 13,18 % of pigs on 27,7 % of farms were seropositive for *Yersinia* spp. Meat juice serology is recognized as a quick, simple and easy-to-implement method and a cost-effective monitoring and control system for *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp., and *Yersinia enterocolitica* in pig slaughterhouses that can increase safety throughout the meat chain.

**Key words:** serology, meat juice, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*

## 10. Životopis

Rođena sam 29. rujna 1996. godine u Osijeku gdje sam završila svoje osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje ( III. gimnazija Osijek). Upisujem integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2015. godine. Među brojnim studentskim poslovima koje sam radila tijekom studija, voljela bih istaknuti posao promotorice u Bayeru i u Farmini gdje sam u međuvremenu napredovala u supervizora. Osim toga, bivša sam potpredsjednica udruge IVSA Croatia. Uz to, aktivno sam sudjelovala ili pomogla u organizaciji nekoliko kongresa i seminara, većinom svjetskih i europskih (IVSA Symposium, VetEd, EVSS, IVSA Congress, XVth European Poultry Conference, 7th International Congress of Veterinary Sciences and Profession). Stipendistica sam Genere d.d. te dobitnica dvije CEEPUS stipendije. Također, autorica sam dva publicistička članka u znanstveno-stručno časopisu studenata veterine Veterinar. Stažirala sam u Odboru za okoliš, javno zdravstvo i sigurnost hrane i Odboru za unutarnje tržište i zaštitu potrošača u Europskom parlamentu u Bruxellesu.