

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ



Никола З. Бетић, др вет. мед.

**УТИЦАЈ ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ
Toxoplasma gondii НА БЕЗБЕДНОСТ МЕСА
СВИЊА У СРБИЈИ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Београд, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Nikola Z. Betić, DVM

IMPACT OF *Toxoplasma gondii* INFECTION ON THE SAFETY OF PORK IN SERBIA

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

МЕНТОРИ:

Др Неђељко Карабасил, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

Др Ивана Клун, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања – Институт од
националног значаја

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Драган Василев, редовни професор
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник
Универзитет у Београду, Институт за медицинска истраживања

Др Ивана Бранковић Лазић, виши научни сарадник
Институт за хигијену и технологију меса

Датум одбране: _____

Докторска дисертација је у урађена у Центру изузетних вредности за зоонозе преношене храном и векторима Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, као и Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду. Експериментални део је урађен у оквиру пројекта ИИИ41019 „Контрола инфекције апикомплексним патогенима: од нових места деловања лека до предикције“ (2011-2019, област интердисциплинарних интегративних истраживања, Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије), којим је руководила научни саветник др Олгица Ђурковић-Ђаковић.

Истраживања спроведена у овој тези подржало је Министарство науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије, а по основу Уговора о реализацији и финансирању научноистраживачког рада у 2023. години са Институтом за хигијену и технологију меса (уговор бр. 451-03-47/2023-01/200050), Институтом за медицинска истраживања (451-03-47/2023-01/200015) и Факултетом ветеринарске медицине (451-03-47/2023-01/200143).

Захвалница

Не постоји мала или велика помоћ, свака помоћ је велика када иде онима којима је потребна, зато желим да се захвалим свима који су директно и индиректно учествовали у изради моје докторске дисертације.

Пре свега, желим да се захвалим ментору проф. др Неђељку Карабасилу на указаном поверењу, који ми је пружио прилику да сарађујем са њим и показао ми прави пут у тренуцима када је то било најпотребније, захваљујем се на дугогодишњем усмеравању, ведром духу, стрпљењу, подршци и саветима који су увек долазили у правим тренуцима.

Велику захвалност дугујем менторки др Ивани Клун која је својим несебичним залагањем и вођењем експеримента увек била ту да ми укаже на грешке, али и на праве ствари током трајања експеримента. Велику захвалност јој дугујем на огромној подршци у раду и на огромном пренесеном знању, заиста је било лепо радити на докторату поред такве особе.

Захвалност дугујем др Олгици Ђурковић-Ђаковић која је као руководилац пројекта и Националне референтне лабораторије за токсоплазмозу омогућила извођење експеримента, и била присутна од самог почетка када смо вршили поставку експеримента, преко експерименталног рада, до завршног писања докторске дисертације. Увек је била особа која нас је мотивисала да истрајемо у свом раду, као и неко ко нам је давао огромну подршку у раду, њене добронамерне критике су нас увек додатно мотивисале.

Посебну захвалност дугујем др Весни Ђорђевић, директорки Института за хигијену и технологију меса, на поверењу, разумевању и великој подршци у раду, која је допринела да ова студија буде свеобухватна и комплетна.

Захвалност колегама са Института за медицинска истраживања, Центра изузетне вредности за зоонозе преношене храном и векторима. Нарочито се захваљујем др Александри Узелац, на усмеравању у примени молекуларних метода, као и колеги др Владимиру Ћирковићу, на пријатељској и професионалној помоћи током експерименталног рада; такође сам им захваљан за припрему антигена *T. gondii* за високо осетљиви тест директне аглутинације (HSDA).

Захвалност дугујем и колегама са Института за хигијену и технологију меса за подршку и разумевање.

Захваљујем се на помоћи свим колегама из специјалистичких ветеринарских института, као и републичким ветеринарским инспекторима, а посебну захвалност дугујем колегама ветеринарима и технолозима који раде у индустрији меса, на несебичној помоћи у реализацији узимања узорка.

Захваљујем својим родитељима који су ми пружали безусловну подршку и разумевање, велику захвалност дугујем мојој драгој супрузи на мотивисању да истрајем у свему, на ведром духу и огромној подршци у раду.

Докторску дисертацију посвећујем мојим дечама Душану и Немањи.

КРАТАК САДРЖАЈ

УТИЦАЈ ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ *Toxoplasma gondii* НА БЕЗБЕДНОСТ МЕСА СВИЊА У СРБИЈИ

Паразити су веома значајни патогени који се преносе путем хране. Њихови специфични животни циклуси, путеви преношења и углавном дугачак период између инфекције и првих симптома болести, чине их значајним ризиком по јавно здравље. Такође, постоје изазови у детекцији, дијагностици и терапији. Токсоплазмоза се сматра најраспрострањенијом паразитском инфекцијом на глобалном нивоу. Изазива је протозоа *Toxoplasma gondii*, један од најуспешнијих паразита животиња и људи с обзиром на способност паразитирања у свим ћелијама са једром великог броја домаћина. Због свог значаја како за ветеринарску тако и за хуману медицину, *T. gondii* представља један од највише проучаваних паразита. Постојећи подаци о серопреваленцији варирају између континената, држава, па и унутар самих држава и између појединих заједница. Конзумирање недовољно термички обрађеног (НТО) меса представља један од највећих фактора ризика за инфекцију људи паразитом *T. gondii*, при чему је месо свиња препознато као доминантан извор инфекције.

У Србији је спроведено више истраживања која су имала за циљ испитивање присуства паразита *T. gondii* код свиња. Ово истраживање, спроведено у периоду од маја 2017. до октобра 2019. године, имало је за циљ да на репрезентативном узорку свиња са територије целе земље утврди серопреваленцију и анализира факторе ризика за настанак инфекције код свиња на нивоу фарме одн. домаћинства, као и да се покуша изолација паразита из серопозитивних животиња и изврши генотипизација добијених изолата. На основу испитаних 825 узорак крви свиња помоћу методе теста аглутинације високе осетљивости (HSDA) утврђена је серопреваленција од 16,5%. Методом логистичке регресионе анализе утврђено је да су старост и неадекватна контрола глодара представљали независне факторе ризика за инфекцију. Од укупног броја испитаних свиња, за 581 свињу је урађена комплетна анкета везана за биосигурност на фармама, на основу које је статистички утврђено да поред старости као фактора ризика, већу вероватноћу за инфекцију *T. gondii* имају и јединке пореклом са малих фарми где се врши само тов свиња, затим са фарми где се гаји више различитих врста животиња, као и оне из региона западне и централно-југоисточне Србије.

Директно доказивање паразита вршено је помоћу биолошког огледа на мишевима, приликом чијег постављања је коришћено срце као модел јестивог органа. Од укупно 68 излучених крмача испитаних на присуство антитела, 33 је било серопозитивно, од којих је за 31 финализован биолошки оглед. Чак 13/31 (41,9%) биолошких огледа је имало позитиван исход, од којих су у седам случајева микроскопски детектоване ткивне цисте *T. gondii*, у још четири детектована је ДНК *T. gondii*, а у додатна два случаја мишеви су били серолошки позитивни.

Генотипизацијом помоћу пет стандардних маркера Alt Sag2, BTUB, GRA6, C22-8 и PK-1, деловањем рестрикционих ензима на Мп-PCR продукте, било је могуће одредити генотип шест изолата. Утврђено је да сви ови изолати припадају клонском типу II *T. gondii*.

Резултати ове студије јасно показују ризик по јавно здравље од конзумирања НТО свињског меса и указују на потребу обавезног коришћења професионалних услуга

дератизације на фармама, затим уздржавања од гајења више различитих врста животиња, одржавања дезинфекционих баријера чистим и свеже напуњеним, као и бољег спровођења зоохигијенских мера на малим газдинствима.

Кључне речи: *Toxoplasma gondii*, свиње, серопреваленција, фактори ризика, биосигурност на фармама, биолошки оглед, директна детекција, јавно здравље, Србија

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Хигијена и технологија меса

УДК број: 636.4.033:576.89(043.3)
637.5:636.4]:614.3(043.3)

SUMMARY

IMPACT OF *Toxoplasma gondii* INFECTION ON THE SAFETY OF PORK IN SERBIA

Parasites are very important foodborne pathogens. Their specific life cycles, transmission routes, and a generally long period between infection and the first symptoms of the disease, pose a significant risk to public health. Also, there are challenges in detection, diagnosis and therapy. Toxoplasmosis is considered to be the most prevalent parasitic infection globally. It is caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, one of the most successful parasites of animals and humans, given its ability to parasitize in all nucleated cells of a large number of intermediate and definitive hosts. The data on *T. gondii* infection seroprevalence vary between continents, countries, but also within countries and between individual communities. Consuming undercooked meat presents a major mode of human infection with *T. gondii*, where pork is recognized as a dominant source of infection. Due to its importance in both veterinary and human medicine, *T. gondii* represents one of the most studied parasites.

Several studies were conducted in Serbia with the aim of examining the presence of *T. gondii* in pigs. This research, carried out in the period from May 2017 to October 2019, aimed to determine the seroprevalence and analyse the risk factors for infection in pigs at the farm or household level in a representative number of samples from the territory of the entire country, as well as attempt direct detection of the parasite from the hearts of seropositive pigs and finally, genotype the obtained isolates. The seroprevalence in the whole sample of 825 pigs as determined by the high-sensitivity agglutination test (HSDA) was 16.5%. Using logistic regression, it was determined that age and inadequate rodent control were independent risk factors for infection. In a subset of 581 pigs with complete biosecurity-related data, it was determined that in addition to age as a risk factor, animals originating from smallholders' finishing type farms where only fattening pigs were kept, then from multispecies farms where several different types of animals are raised, as well as those originating from Western and Central and South-Eastern Serbia were also at a greater risk from infection.

Direct detection of the parasite was performed by mouse bioassay of heart tissue as an edible organ model. Of a total of 68 sows tested for the presence of *T. gondii*-specific antibodies, 33 were seropositive, and 31 bioassays were successfully performed. Evidence of viable parasites was obtained in 13 (41.9%) sow hearts, of which by isolation of brain cysts in seven, by detection of *T. gondii* DNA in an additional four, and by serology in another two.

Genotyping analysis was performed by Mn-PCR-RFLP using five standardized markers Alt Sag2, BTUB, GRA6, C22-8 and PK-1, by which it was possible to determine the genotype of six isolates. All these isolates were found to belong to *T. gondii* clonal type II.

The results of this study clearly show the public health risk from the consumption of raw or undercooked pork and indicate the need for mandatory use of professional pest control services on farms, for avoiding multispecies farming, for keeping disinfection barriers clean and filled with disinfectant, as well as for better implementation of animal hygiene measures on small farms.

Key words: *Toxoplasma gondii*, pigs, seroprevalence, risk factors, biosecurity on farms, mouse bioassay, direct detection, public health, Serbia

Scientific field: Veterinary Medicine

Scientific area: Meat Hygiene and Technology

UDC number: 636.4.033:576.89(043.3)

637.5:636.4]:614.3(043.3)

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Животни циклус паразита <i>T. gondii</i>	3
2.2. Пuteви преношења паразита	5
2.3. Инфекција људи паразитом <i>T. gondii</i>	7
2.4. Инфекција свиња паразитом <i>T. gondii</i>	7
2.5. Присуство паразита <i>T. gondii</i> у меду и производима од меду	9
2.6. Генетска разноврсност паразита	10
2.7. Лабораторијске методе дијагностиковања паразита <i>T. gondii</i>	11
2.7.1. Директне методе	11
2.7.2. Индиректне методе	12
3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ	14
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	15
4.1. Узорак	15
4.1.1. Величина узорка	15
4.1.2. Категорије испитиваних животиња	16
4.1.3. Узимање, складиштење и поступак са узорцима	17
4.2. Биосигурност на фармама – прикупљање података	18
4.3. Високо осетљиви тест директне аглутинације	19
4.4. Вештачка дигестија	21
4.5. Биолошки оглед	22
4.6. Молекуларна испитивања	24
4.6.1. Екстракција ДНК	24
4.6.2. Детекција ДНК <i>T. gondii</i> PCR методом у реалном времену	25
4.6.3. Генотипизација сојева паразита <i>T. gondii</i> MпPCR-RFLP методом	25
4.7. Статистичка обрада података	26
5. РЕЗУЛТАТИ	28
5.1. Подаци о животињама	28
5.2. Серопреваленција инфекције паразитом <i>T. gondii</i> и фактори ризика	29
5.3. Инфекција паразитом <i>T. gondii</i> на нивоу фарме	34
5.4. Директна детекција <i>T. gondii</i> и потврда вијабилности	34
5.5. Генотипизација	37
6. ДИСКУСИЈА	40

6.1.	Присуство инфекције паразитом <i>T. gondii</i>	41
6.2.	Фактори ризика за инфекцију свиња паразитом <i>T. gondii</i>	42
6.3.	Успех изолације и генотипизација	46
6.4.	Анализа ризика за јавно здравље у Србији.....	46
6.5.	Превентивне мере против ширења <i>T. gondii</i> – интервенције на у фарме	47
6.6.	Превентивне мере против ширења <i>T. gondii</i> - интервенције на нивоу кланице и прераде меса.....	49
7.	ЗАКЉУЧАК	51
8.	ЛИТЕРАТУРА	53

1. УВОД

Међу патогенима који се преносе путем хране, паразити заузимају веома значајно место. Многе паразитске инфекције представљају велики изазов за јавно здравље, међу којима је као једну од најзначајнијих Европска агенција за безбедност хране препознала ону коју изазива паразит *Toxoplasma gondii* (EFSA, 2018). Различите врсте животиња из фамилије мачака представљају праве домаћине за *T. gondii*; код правих домаћина паразит има могућност размножавања сексуално и асексуално, за разлику од прелазних домаћина код којих се овај паразит размножава само асексуално. Протозоа *T. gondii* има космополитску распрострањеност, чему доприноси велики број прелазних домаћина и њена могућност да паразитира у свим ћелијама које поседују једро, током целог њиховог живота. На основу многих спроведених студија, процењено је да је до једне трећине светске хумане популације инфицирано протозоом *T. gondii*, што је чини најраспрострањенијом паразитском зоонозом на глобалном нивоу (Dubey, 2009a).

Светска здравствена организација (СЗО) процењује да сваке године преко милион нових случаја токсоплазмозе у Европи настане као последица конзумирања контаминиране хране (WHO, 2015). Људи се најчешће инфицирају конзумирањем контаминиране хране и воде који представљају главни извор инфекције, тј., сматра се да је доминантан начин инфекције конзумирање недовољно термички обрађеног (НТО) меса (месо свиња, јагњади, живине, говеда, коња), а да су разлике у преваленцији инфекције у различитим популацијама делом повезане са културом припремања хране (Cook и сар., 2000). Поједина истраживања указују на то да чак 40-60% инфекција људи овим паразитом настаје ингестијом контаминираниог меса, посебно меса свиња. Због одсуства клиничких симптома код инфицираних јединки као и непостојања одговарајућих метода за брзу и поуздану детекцију микроскопских циста *T. gondii* у месу (EFSA, 2018), инфициране свиње остају непрепознате и њихово месо постаје важан извор инфекције за људе. Због свог значаја у ветеринарској и хуманој медицини, *T. gondii* представља један од највише проучаваних паразита у свету.

Традиционално у Републици Србији, месо свиња је најзаступљенија врста меса код домаћег потрошача, што одговара и обиму производње свиња у примарном сектору. Према подацима Завода за статистику Републике Србије, на територији наше земље број свиња у узгоју достиже око 3 милиона грла, док се око 2,2 милина свиња годишње закоље у кланицама (РСЗ, 2020). С обзиром на значај *T. gondii* у ланцу производње меса свиња, потребно је познавање присуства овог паразита код свиња на националном нивоу. Сагледавањем фактора ризика и биосигурносних система на фармама може се утврдити да ли неки параметри утичу и у којој мери на трансмисију паразита на животиње. Преваленција паразита варира и зависи од много фактора као што су услови гајења на фармама, начин гајења, старосне доби животиње (Guo и сар., 2015). На основу мета анализе, која је обухватила резултате из 47 земаља света, глобални просек серопреваленције токсоплазмозе код свиња износи око 19%, док је у Европи овај просек нешто нижи, и износи око 13% (Foroutan и сар., 2019). Прва систематска сероепидемиолошка студија у Србији рађена је 2002-2003. године (Klun и сар., 2006), када је утврђена серопреваленција од 28,9% (40,9% код излучених крмача, 15,2% код товљеника), док је наредно истраживање на територији Београда имало сличну правилност за старосне категорије (30% излучене крмаче; 8,3% товљеници) са укупном преваленцијом од 9,2% (Klun и сар., 2011). Истраживањем Куруце и сар. којим су обухваћене свиње гајене на фармама на

територији Војводине, утврђено је присуство специфичних антитела код 17% свиња (Куруца и сар., 2017).

Имајући у виду културу конзумирања меса у Србији, као и чињеницу да је најчешће конзумирано месо - месо свиња, истраживање у оквиру ове студије је усмерено на присуство паразита код свиња на територији целе земље. Истраживањем су обухваћена серолошка, биолошка и молекуларна испитивања инфекције *T. gondii* код свиња, као и анализа фактора ризика за инфекцију свиња овим паразитом, и то помоћу анкете са низом питања о биосигурносним мерама на фармама. Циљ је био да се заклане свиње, намењене за исхрану људи испитају на присуство антитела на *T. gondii*, као и да се код одређеног броја серопозитивних јединки утврди вијабилност ткивних циста на моделу јестивог органа, и у случају изолације паразита изврши генотипизација.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

Паразити су значајни патогени који се преносе између осталог и храном. Њихови животни циклуси, путеви преношења и углавном дугачак период између инфекције и првих симптома болести, чине их значајним ризиком по јавно здравље. Један од најраспрострањенијих и највише проучаваних је протозоа *Toxoplasma gondii*, од значаја како за хуману тако и за ветеринарску медицину. *T. gondii* може инфицирати све топлокрвне животиње, и у облику ткивних циста перзистирати у организму домаћина током целог његовог живота.

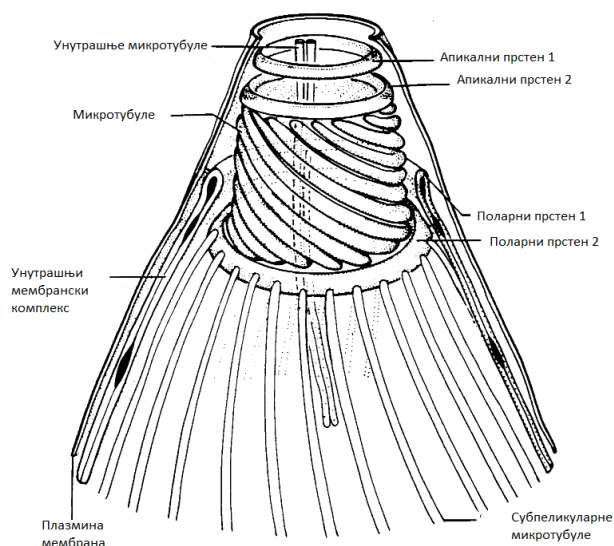
2.1. Животни циклус паразита *T. gondii*

Toxoplasma gondii је једноћелијски убиквитарни микроорганизам из филума Apicomplexa (Levine, 1970). Припада класи Sporozoasida (Leukart, 1879), поткласи Coccidiasina (Leukart, 1879), реду Eimeriorina (Leger, 1911) и породици Toxoplasmatidae (Biocca, 1956). Род *Toxoplasma* има само једну врсту – *Toxoplasma gondii*.

У сложенеом животном циклусу *T. gondii* постоје три основна облика: вегетативни – брзоделећи - **тахизоит**, цистични – спороделећи – **брадизоит** (у ткивним цистама), и **спорозоит** (у ооцистама), као и неколико прелазних, као што су шизонт А до Е, мерозоит, микро и макрогамонт који представљају развојне фазе (Dubey, 1998). Сва три основна облика паразита инфективна су и за сталне и за прелазне домаћине. Дефинитивни или прави домаћин за паразит *T. gondii* представљају само животиње из фамилије мачака (Felidae), у чијем интестиналном епителу се сексуално размножава што доводи до стварања ооциста, док се код прелазних домаћина (као и у екстраинтестиналним ткивима мачака) размножава асексуално, тј. одвија се асексуална фаза животног циклуса која резултира настанком ткивних циста (Dubey, 1977; Dubey, 1997). Прелазни домаћини могу бити све топлокрвне као и неке хладнокрвне животиње. Мачке као прави домаћини излучују ооцисте, након ингестије било ког од три инфективна стадијума *T. gondii* (Dubey, 2009a). Експериментално је показано да инфективна доза за мачке може бити и један једини брадизоит (Cornelissen и сар., 2014), или за мишеве једна ооциста (Dubey, 2010), или чак и један једини тахизоит (Djurković-Djaković и сар. 1996). Међутим, ово вероватно није упоредиво са инфективном дозом за људе у природним условима. Паразит је свакако јединствен и по томе што дефинитивни домаћин није неопходан за дугорочно одржавање животног циклуса *T. gondii*, јер паразит може да се одржава и само асексуалним или клоналним ширењем између прелазних домаћина (Dubey, 1995).

Инфекција код домаћина (и правога и прелазнога) у највећем броју случајева пролази асимптоматски. Код малог броја случајева појављује се клиничка слика болести. Природна инфекција настаје ингестијом ткивних циста у контаминираном месу, или ооцистама из хране и воде контаминираних фецесом инфицираних мачака. Брадизоити из ткивних циста или спорозоити из ооциста пенетрирају цревне епителне ћелије и ту се размножавају. *T. gondii* се може ширити локално у мезентеријалним лимфним чворовима, а до удаљених органа дисеминује се путем лимфног и крвног система.

Тахизоити (грчки, tachos - брзина) су полумесечастог облика, при чему је задњи део увек заобљенији у поређењу са предњим, а величина се креће од 2 μm до 6 μm . То је брзоделећи облик паразита који се путем вишекратних циклуса ендодиогеније размножава у свим ћелијама прелазног домаћина и екстраинтестиналним епителним ћелијама правог домаћина (Frenkel, 1973). Тахизоити се састоје из различитих органела: цитоскелета (спољашњи мембрански комплекс, субпеликуларни микротубули, апикални прстенови, поларни прстенови, коноид), секреторних органела (роптрије, микронеме, густе грануле), микропора, митохондрија, ендоплазматичног ретикулума, Голџијевог комплекса, рибозома и једра (Dubey, 2010). Апикални комплекс (Слика 1), омогућава инвазију домаћинске ћелије. Инвазија домаћинске ћелије од стране тахизоита представља активан процес који траје мање од 30 секунди и има за последицу привремене деформације тахизоита који добија овоидан облик. Тахизоит бива окружен новоформираном мембраном и сачињава паразитофорну вакуолу унутар домаћинске ћелије и на тај начин ствара себи оптималне услове за размножавање. Након више деоба и настанка 64-128 паразита, долази до прскања мембране паразитиране ћелије те тахизоити напуштају ћелију, одакле се путем крвотока дисеминују до удаљенијих ћелија у којима се описани процес понавља (Sibley, 2010). Овај облик паразита *T. gondii* карактерише акутну фазу примарне инфекције или реактивацију латентне инфекције.



Слика 1. Шематски приказ грађе апикалног комплекса *T. gondii* (Dubey и сар., 1989)

Брадизоит (грчки, bradys - споро) представља спороделећи облик паразита, који перзистира у домаћину за време хроничне инфекције унутар ткивних циста. Брадизоити настају трансформацијом из тахизоита из паразитофорне вакуоле под утицајем имунског система домаћина који има улогу у ограничавању инфекције. Структурно и морфолошки су слични тахизоитима с тим што су брадиозоити нешто тањи и еластичнији (Dubey и сар., 1989). Ткивне цисте се могу формирати у висцералним органима (бубрези, јетра, плућа), мада су предилекциона места за њихово формирање централни нервни систем (мозак, ретина) и мишићи (срчани и скелетни мишићи). Брадизоити се ендодиогенијом размножавају унутар ћелије домаћина која се окружује двоструком мембраном и тако постаје ткивна циста, што има за последицу раст циста од 5 μm (два брадизоита) до 100 μm што такође условљава и промену облика ћелије у којој се налазе. Цисте на мозгу су округлог облика, док су цисте формиране у скелетним мишићима вретенасте. Цисте могу садржати више стотина па и хиљада брадизоита (Dubey, 2010). Имунски одговор домаћина и ниска метаболичка активност брадизоита

условљавају дугорочан несметан опстанак ткивних циста (може се рећи доживотан). Међутим, уколико дође до угрожавања имунокомпетенције домаћина одн. до стања имуносупресије, може доћи до пуцања циста и ослобађања бразидиозита и њихове конверзије у тахизоите који поново покрећу процес дисеминације инфекције у новим домаћинским ћелијама, и то је механизам који настаје реактивирана токсоплазмоза као опортунистичка инфекција.

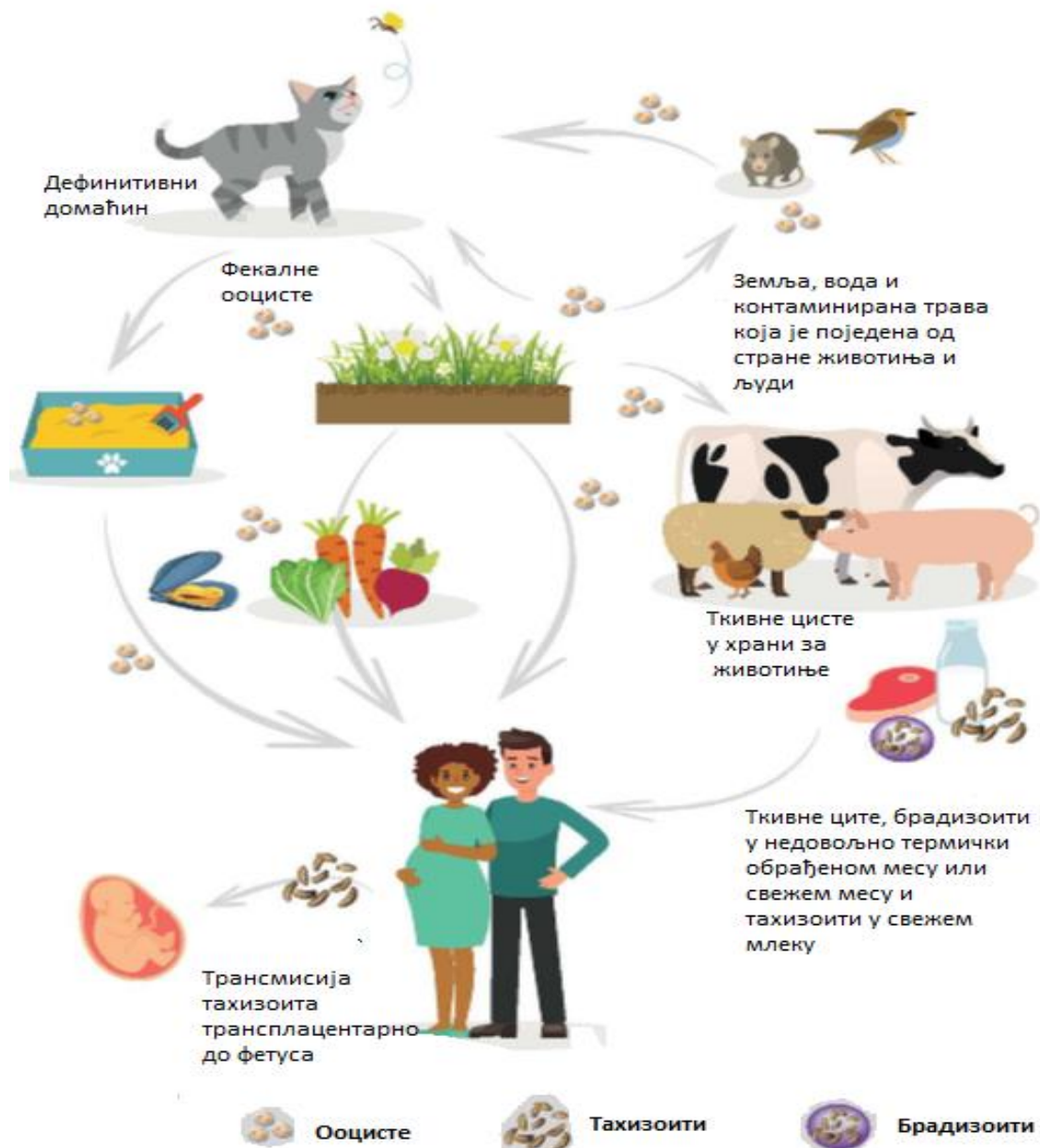
Спорозоит представља развојни облик *T. gondii* који се налази унутар 'зрелих', спорулисаних ооциста. Неспорулисане, незреле форме ооциста се избацују у спољашњу средину путем фецеса правог домаћина (све животињске врсте из фамилије *Felidae*), где се након 1-5 дана (у зависности од услова спољашње средине – одговарајуће температуре и влажности) одвија њихова спорулација након које ооцисте постају инфективне. Спорулисана ооциста садржи две спороцисте са по четири спорозоице, који су инфективни за све праве и прелазне домаћине.

Спорозоит је морфолошки доста сличан тахизоиту, величине од 2 μm до 8 μm и субтерминално постављеним једром. Спорозоит, у поређењу са тахизоитом, нема микронеме, роптрије и амилопектинске грануле (Dubey, 1998).

2.2. Пuteви преношења паразита

Пут преношења паразита на људе је првенствено хоризонтални али може бити и вертикални. Хоризонтални пренос паразита подразумева инфицирање прелазног домаћина ингестијом хране и/или воде контаминираних ооцистама, или ингестијом ткивних циста из меса пореклом од инфицираних животиња (Desmonts и сар., 1965). Вертикални пут преноса *T. gondii* подразумева пренос паразита (тахизоита) са мајке на плод преко постељице, што може довести до конгениталне токсоплазмозе одн. рађања интраутерусно инфицираног детета. Различити путеви преношења приказани су на слици 2.

Инфекција људи путем хране је доминантан пут хоризонталног преноса *T. gondii*, у ком случају инфекција настаје уношењем бразидиозита или спорозоице, док су путеви настанка инфекције тахизоитима или вертикални или путем трансфузије крви и крвних продуката, а изузетно и веома ретко путем непастеризованог млека (Jones and Dubey, 2010). Бразидиозити се преносе путем меса, док спорулисане ооцисте у спољашњој средини могу контаминирати свеже производе и воду (Dubey, 2010; Opsteegh и сар., 2014; EFSA, 2018), и на тај начин после њиховог конзумирања довести до инфекције људи (Слика 2). Конзумирање сировог или НТО меса представља један од најзначајнијих извора инфекције за људе, нарочито у земљама где је конзумирање оваквих намирница у вези са њиховом културом исхране и традицијом (Kijlstra and Jongert, 2008). Поред тога што било која топлокрвна животиња може бити резервоар овог паразита (ткивне цисте у месу), и неки пойкилотермни организми, као што су шкољке, могу бити механички вектор (ооциста) и ризик за потрошаче (Dubey, 2010).



Слика 2. Пuteви преношења паразита *T. gondii* (Адаптирано из EFSA, 2018)

С обзиром на то да је код животиња које се гаје за исхрану људи инфекција често асимптоматска, оне се не могу лако идентификовати и разлучити од неинфицираних јединки, тако да остају у ланцу исхране. И поред високе учесталости хумане инфекције паразитом *T. gondii*, токсоплазмоза је најчешће асимптоматско или субклиничко обољење код имунокомпетентних људи, а само до око 20% особа испољи клиничке симптоме. Међутим, клинички озбиљна инфекција може бити конгенитална токсоплазмоза, као и инфекција код имунолошки ослабљених група људи (Djurković-Djaković, 1998; Montoya и Liesenfeld, 2004). Отуда је инфекција паразитом *T. gondii* важно питање јавног здравља. Код примонфицираних трудница, уколико је до инфекције дошло у првом триместру трудноће, може доћи до тешких оштећења плода и последичног побачаја (Remington и сар, 1995). Инфекције настале касније у трудноћи се углавном манифестују очним и неуролошким оштећењима, јер паразит испољава ткивни тропизам, и то за тзв. имуно-привилегована ткива, па се углавном

насељава у ћелијама нервног и мишићног система; посебно су угрожене очи јер је мрежњача део централног нервног система. Конгенитална инфекција се може манифестовати на рођењу, али још је чешће рођење наизглед клинички здравог детета са ризиком за развој ретинохориоидитиса у детињству или у одраслом добу (Wallon и сар., 2002). Поред трудница као осетљиве групе, инфекција *T. gondii* представља глобални јавноздравствени проблем као опортунистичка инфекција код имунодефицијентних особа, попут особа заражених вирусом хумане имунодефицијенције (ХИВ), или трансплантирани пацијенти који су на дуготрајној терапији имunosупресивним лековима, а истим механизмом настаје клинички тешка инфекција код онколошких болесника или оних са хроничним системским болестима (Djurković-Djaković, 1998).

2.3. Инфекција људи паразитом *T. gondii*

Токсоплазмоза се сматра најраспрострањенијом паразитском инфекцијом на глобалном нивоу (EFSA, 2018). Процењује се да је више од 30% светске популације инфицирано овим паразитом (Dubey, 2009a), при чему постојећи подаци о серопреваленцији варирају између континената, држава, па и унутар самих држава и између појединих заједница (Bobić и сар., 1998, McLeod и сар., 2013). Преваленција инфекције *T. gondii* варира од нпр 6,1% у Мексику до 77,5% у Бразилу; односно у Европи од 8,2%, у Швајцарској до 57,6%, у Румунији (Juan и сар, 2014). Разлог за овако неравномерну просторну дистрибуцију није потпуно јасан, међутим више фактора утиче на преваленцију унутар одређених популација (климатски фактори, навике у исхрани, култура и социо-економски статус). На територији Балканског полуострва недавна упоредна анализа показала је да у последње три деценије у већини земаља серопреваленција константно опада (Bobić и сар., 2011). То се односи и на Србију, где су најновија истраживања показала серопреваленцију од 20,5% (Stopić и сар., 2022).

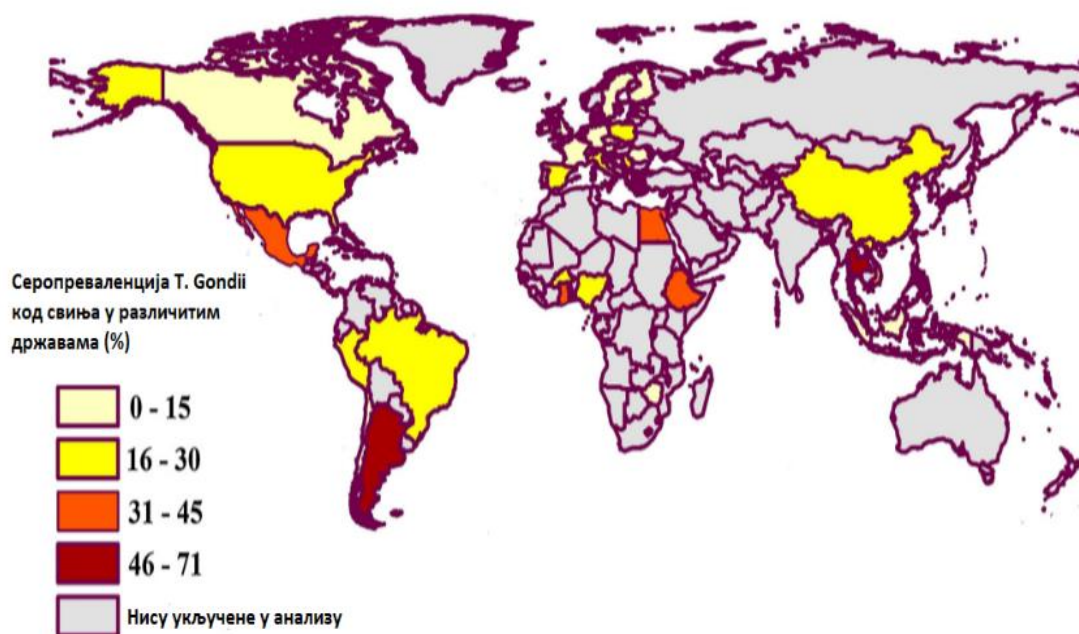
Од свих паразитских инфекција које се преносе храном конгенитална токсоплазмоза има највеће тзв. „оптерећење болешћу“ (“*burden of disease*”) (Havelaar и сар., 2015). Током 2016. године, пријављено је и потврђено 47 случајева конгениталне токсоплазмозе у 19 земаља чланица Европске Уније, што представља 1,57 случајева на 100.000 новорођених (EFSA, 2017). Међутим, није могуће добро проценити инциденцију конгениталне токсоплазмозе, јер само три земље чланице имају систем активног надзора за ову болест (EFSA, 2017), због чега се сви постојећи подаци морају сматрати нижим од реалних.

2.4. Инфекција свиња паразитом *T. gondii*

Иако инфекција паразитом *T. gondii* код домаћих животиња углавном није значајан клинички проблем, јесте озбиљан економски проблем услед великих губитака који настају као последица спонтаних побачаја, као и проблем са аспекта јавног здравља, јер постоји озбиљан зоонотски ризик. Као што је већ раније наведено, конзумирање НТО меса које води порекло од асимптоматски инфицираних животиња представља најзначајнији фактор ризика за инфекцију људи. Присуство паразита *T. gondii* је доказано код свих домаћих животиња које се

користе за исхрану људи, па и код свиња (Dubey, 2010). Свиње су једна од најчешће узгајаних животињских врста на свету. Месо свиња представља примарни извор протеина милионима људи различитих култура, у различитим географским подручјима широм света. У јануару месецу 2020. године широм света се гајило 677,6 милиона свиња, док је исте године у Европској Унији произведено 148,5 милиона тона свињског меса (www.statista.rs, 2020). У Србији је 2020. произведено око 300 хиљада тона меса свиња (РЗС, 2021).

Студије засноване на детекцији специфичних антитела у серуму свиња указују да је паразит *T. gondii* присутан код свиња широм света, са преваленцијом која варира између континената, од државе до државе, па и између региона у истој држави. Поред наведеног, преваленција се разликује у зависности од категорије испитиваних свиња, нпр. између крмача и товних свиња, као и између свиња гајених на фармама које поседују биосигурносне системе у односу на свиње које се чувају на отвореном (*free-range*) (Dubey, 2009b; Roqueplo и сар., 2011). На основу спороведене мета анализе која је обухватила 47 држава са 5 континената и укупно 148.092 узорака, преваленција токсоплазме код свиња на глобалном нивоу износи 19% (Слика 3). Преваленција између континената се разликује и највиша је у Африци и Северној Америци (25%), затим Јужној Америци (23%), Азији (21%), а најнижа је у Европи где износи 13% (Foroutan и сар., 2019).



Слика 3. Преваленција *T. gondii* на глобалном нивоу (адаптирано из Foroutan и сар., 2019)

Варирање серопреваленције у различитим географским регионима може бити последица различитих климатских фактора, као и система гајења домаћих животиња и степена примене биосигурносних мера у примарној производњи. Нижа серопреваленција на територији европског континента може се објаснити чињеницом да се већином примењује интензивни начин гајења свиња, што за резултат има мању изложеност инфекцији у поређењу са животињама на другим континентима (Herrero и сар., 2016). Више студија је показало да примена биосигурносних мера на фармама, као што су ефективни програми за контролу глодара, ограничење приступа мачкама, одржавање хигијене у производним погонима,

употреба неконтаминираних воде и хране, може довести до смањења распрострањености *T. gondii* код свиња у таквим условима у односу на свиње узгајане у екстензивним и слободним (*free range*) системима гајења (Куруца, 2017). Животиње које се гаје у слободним системима држања имају већу вероватноћу да се инфицирају паразитом *T. gondii* (Dubey, 2009b); такође ова вероватноћа у директној је корелацији са системом управљања и нивоом биосигурности на фармама (Papatsiros и сар., 2016).

Међутим, како се повећава свест потрошача о добробити животиња, затим органској и одрживој производњи као и о очувању животне средине, месо свиња гајених у слободним системима држања све више се цени на тржишту и овакви системи су све заступљенији на територији целе Европе (Zander и сар., 2013). Истраживања су показала да свиње гајене у оваквим системима у односу на интензивну производњу, представљају већи ризик за пренос одређених патогених микроорганизама на људе, пошто су овакви системи мање контролисани у односу на системе интензивне производње у затвореном простору (Davies, 2011; Куруца, 2017).

2.5. Присуство паразита *T. gondii* у месу и производима од меса

Индустрија меса свиња у 2018. години у Европској унији је достигла релативан врхунац у производњи. У земљама Европске уније је произведено 23,8 милиона тона свињског меса, што је 1,5 милиона тона више у односу на 2010. годину (Eurostat, 2019). Ако се зна колико су свиње значајан извор за преношење овог паразита због присуства бројних ткивних циста у скоро свим јестивим деловима (Dubey, 1986), не чуди податак да је у недавном истраживању спроведеном у САД, економско оптерећење на свињско месо изазвано само паразитом *T. gondii* процењено на скоро две милијарде долара (Scharff, 2020).

Преваленција *T. gondii* код животиња које се гаје за исхрану људи главни је индикатор за процену јавноздравственог ризика од токсоплазмозе. Најчешће се у сврху процењивања стопе инфекције животиња користе индиректне методе детекције (серолошки тестови), али се њима утврђује само серопреваленција, која колико год била корисна за епизоотиолошка испитивања, углавном не корелира директно са присуством ткивних циста у месу, тј. налазом директних метода детекције. Opsteegh и сар. (2016) су испитивали корелацију налаза директних и индиректних метода код различитих врста животиња које се користе за исхрану људи, и показали да је вероватноћа детекције паразита код серопозитивних јединки највећа код свиња (58,8%), а прате их живина (53,4%), овце и козе (39,4% и 35%), док је најмања код великих врста, тј. коња и крава. Ови подаци нам указују да је корелација између детекције антитела специфичних за *T. gondii* и директне детекције паразита релативно висока код свиња и живине, и донекле код малих преживара. За ове врсте животиња, коришћење серологије може бити од помоћи у идентификацији и квантификацији биолошког ризика за потрошаче. Поред позитивних страна серолошких испитивања, негативна се огледају у детекцији паразита и код одређеног броја серонегативних свиња (4,9%), оваца и коза (1,8% и 2,0%), што указује на то да ни негативан серолошки резултат не мора да значи да је месо слободно од паразита. *T. gondii* је тако у једном истраживању у Србији пронађена и у месу 4 од 26 серонегативних свиња, и то у 3 случаја детекцијом ДНК, али су у једном узорку нађене и инфективне цисте (Куруца, 2017). Дакле, серологија се не може користити за индивидуалну контролу трупова свиња, живине и малих преживара.

Од коликог је значаја месо свиња као резервоар инфекције људи показује и истраживање у коме је вршено рангирање ризика од различитих патогена у комбинацији са храном, где је паразит *T. gondii* у комбинацији са месом свиња заузео високо друго место (Batz и сар., 2012). На основу студије спроведене у Америци, у поређењу са месом говеда и живине, месо свиња има већу вероватноћу контаминације паразитом *T. gondii* (Dubey, 2005). Пошто само НТО месо представља ризик за инфекцију, адекватна температура приликом припреме меса представља главни фактор у спречавању инфекције паразитом. Међутим, истраживањем из 2007. године је утврђено да је око 9% потрошача спремало месо свиња на температури нижој од 48 °C, што је недовољно за инактивисање циста *T. gondii* (Ecolab-Ecosure, 2007). По препорукама Европске агенције за безбедност хране, месо пре употребе треба третирати тако да достигне унутрашњу температуру од најмање 67 °C (EFSA, 2007).

За добијање производа од меса користе се различите методе конзервисања попут димљења, сољења, смрзавања, загревања, зрачења или деловањем високог притиска, који доприносе да је у тим производима у поређењу са свежим месом углавном мања контаминација паразитом *T. gondii* (Mie и сар., 2008). Међутим, постоје примери где је код прерађеног меса свиња доказано присуство паразита, нпр. у сувим узорцима шунке и кобасица (1,5%) у Великој Британији (Warnekulasuriya и сар., 1998). Будући да се неки производи од свињског меса конзумирају сирови (шунка, ферментисане кобасице, сухомеснати производи), такви производи могу представљати извор инфекције паразитом.

2.6. Генетска разноврсност паразита

Популационо-генетичка истраживања *T. gondii* су последњих година веома напредовала. Популациона структура паразита *Toxoplasma gondii* почиње детаљније да се проучава у деведесетим годинама 20-ог века, са продором молекуларно-генетичких метода у клиничка истраживања. 1992. године испитивањем нуклеотидног полиморфизма, укључујући SAG 1 и ROP1 локусе, и коришћењем РФЛП-а дошло се до прве класификације *T. gondii* на два соја са различитом вируленцијом код мишева (Sibley and Boothroyd, 1992), а недуго затим, после РФЛП анализе 6 локуса код 106 изолата у Европи и Северној Америци дошло је до рекласификације у три клонска генотипа (тип I, II и III) (Howe и сар., 1995). Ова класификација је потврђена у многим студијама и дуго се веровало у „хипотезу три соја“ која је у том тренутку одговарала за узорке пореклом из Европе и Северне Америке. Међутим, пронађени су сојеви прво у Јужној Америци (Lehmann и сар.; Khan и сар., 2006) који се разликују од већ познатих сојева (тип I, II и III), па затим су и у Северној Америци изоловани нови сојеви код дивљих животиња (хаплотип 12), као и поједини атипични сојеви (Dubey и сар., 2011; Khan и сар., 2011; Shwab и сар., 2014). У овим истраживањима пронађени су многи не-клонски тј. рекомбинантни и атипични сојеви, што је повезано са бројним врстама дивљих фелида, сталних домаћина. У организму сталног домаћина је једино могућа сексуална репродукција паразита и тако се отвара могућност за генетске рекомбинације (Su и сар., 2012; Shwab и сар., 2014). У Јужној Америци је утврђена велика разноликост без доминантног генотипа (Shwab и сар., 2014), док генетички диверзитет на Афричком континенту још увек није довољно истражен.

На територији Републике Србије, као и у Европи, код људи је предоминантан тип II (Djurković-Djaković и сар., 2006; Вујанић, 2012; Štajner и сар., 2013). Србија може да се похвали да је међу ретким европским земљама (а једина у југоисточној Европи) у којој је генетички

диверзитет *T. gondii* испитиван осим код људи и у низу животињских врста и то код свиња, коња, голубова, оваца и дивљих месоједа, укључујући црвену лисицу, златног шакала и сивог вука, а поред типа II показано је и присуство типа III. Прецизније, код свиња су од девет изолата седам били клонски типови лозе II, док су два била клонски генотипови лозе III (Куруца, 2017); код оба изолата од коња су потврђени генотипови лозе III (Klun и сар., 2017); од три голубија изолата, два су припадала генотипу лозе II, док је један генотип лозе III; једини типизирани изолат из овце такође је идентификован као генотип лозе II (Marković и сар., 2014); код дивљих месоједа су идентификовани генотипови лоза II и III, где је клонски генотип II имао доминантније присуство у односу на тип III (Uzelac и сар., 2019). Генотипови лозе I, II и III показују различиту вируленцију код сисара, односно могу изазвати обољење са клиничком сликом различите тежине, што представља и практичан разлог за њихово одређивање.

2.7. Лабораторијске методе дијагностиковања паразита *T. gondii*

За доказивање и детекцију инфекције паразитом *T. gondii* користи се већи број лабораторијских метода. Имајући у виду чињеницу да клиничка слика углавном изостаје код имунокомпетентних јединки, како код људи тако и код животиња, постављање дијагнозе односно дијагностика инфекције се ослања на лабораторијска испитивања директним или индиректним методама.

2.7.1. Директне методе

Директне методе се заснивају на доказивању самог паразита или његове ДНК, које је могуће детектовати у крви домаћина током краткотрајног периода паразитемије (тахизоити), или у ткивима током хроничне инфекције (ткивне цисте). Највише се користе следеће директне методе:

• Изолација паразита помоћу биолошког огледа на лабораторијским животињама

Детекција специфичног серолошког одговора или идентификација морфолошки препознатљивих циста *T. gondii* на „squash“ препарату и у хомогенату мозга миша, недељама након интраперитонеалне инокулације клиничког материјала сумњивог на присуство паразита је представљало револуцију у дијагностици токсоплазмозе. Биолошки оглед се показао као успешан у изоловању паразита узорака плодове воде (специфичност 98%) и из феталне крви (специфичност 100%) (Foulon и сар., 1999), због чега је служио као златни стандард у дијагностици КТ све до увођења молекуларних метода детекције паразита (Desmonts и сар., 1985).

• Изолација паразита у културама ћелија и ткива

Иако је изолација паразита могућа и у култивисаним ћелијама, чиме би се избегла потреба за употребом лабораторијских мишева, примена ћелијских линија (култура хуманих фибробласта) се показала као недовољно осетљива, јер је успешност изолације паразита из плодове воде износила свега од 13,3% до 15% (Robert-Gangneux и сар., 1999; Foulon и сар., 1999)

- **Методе молекуларне детекције, засноване углавном на PCR-у (ланчаној реакцији полимеризације)**

Једна од главних прекретница у истраживању овог паразита као и у његовој дијагностици био је развој молекуларних техника детекције (Burg и сар., 1989). Коришћењем реакције ланчане полимеризације (PCR) може се детектовати ДНК паразита из различитих биолошких узорака. Детекција *T. gondii* овом методом се заснива на високо специфичном препознавању, умножавању и анализирању одређене ДНК секвенце која се у геному понавља одређени број пута. У циљу успешне детекције паразита, бирају се секвенце које нису подложне променама у редоследу нуклеотида (мутацијама), односно оне секвенце које припадају високо конзервисаном делу генома паразита (529 bp, B1, 18S rRNA, ITS-1).

2.7.2. Индиректне методе

Индиректне, серолошке методе, обухватају испитивања која се заснивају на процени нивоа хуморалног имунског одговора на биолошки агенс. Серолошким методама се доказује присуство антитела специфичних за паразит *T. gondii* у серуму испитиване јединке. Детектују се специфична антитела, и то у детекцији инфекције домаћих животиња, имуноглобулини класе G (IgG) а веома ретко и класе M (IgM). IgM антитела указују на присуство акутне инфекције, јер се могу детектовати већ у првим данима инфекције, и потпуно нестају након неколико месеци. С друге стране, IgG антитела могу да се детектују од друге или треће недеље инфекције, па све до краја живота јединке, те се тако њима доказује контакт јединке са паразитом било када у животу. Управо зато су тестови за детекцију специфичних IgG антитела незаменљиви у епизоотиолошким студијама.

До данас су развијени бројни серолошки тестови који се заснивају на принципу реакције везивања антигена са антителом, и за дијагностику код домаћих животиња најзначајнији су:

- **Високо осетљиви тест директне аглутинације – HSDA**, модификација теста директне аглутинације коју су увели Desmonts и Remington (1980), која се огледала у новом начину добијања антигена и увођењу 2-меркаптоетанола (2ME), чиме су побољшане осетљивост и специфичност до тада коришћеног теста (Fulton, 1965; Fulton и Turk, 1959; Ardoin и сар., 1967). Пошто му резултати корелирају са резултатима Sabin-Feldman-овог теста као признатог теста златног стандарда за серологију препоручује се као скрининг тест у клиничким лабораторијама (Djurković-Djaković, 2004). Овај тест није специфичан за врсту, јер је заснован на директној реакцији антигена са антителом (без присуства коњугата), те је применљив на све животињске врсте. Тест је репродуцибилан, и лак за извођење. Једну од његових модификација представља и **модификовани тест аглутинације - MAT** (Dubey и Desmonts, 1987), а модификација је минимална, и огледа се само у времену додавања 2ME (на самом крају, после уклапавања антигена). Интересантно је да се у многим литературним наводима MAT користи као синоним за HSDA.

- **Индиректни флуоресцентни тест - IFAT** (Kellen и сар., 1962; Remington и сар., 1968);
- **Ензимски имуносорбентни тест - ELISA**, принцип теста се заснива на промени боје

супстрата у присуству антитела у серуму, која се читава на фотометру као одређена оптичка густина раствора. Предност овога теста је што се може изводити аутоматизовано и на тај начин омогућити испитивање великог броја узорак (Voller и сар., 1976).

3. ЦИЉЕВИ И ЗАДАЦИ

Општи циљ ове докторске дисертације је процена ризика за безбедност меса свиња услед инфекције паразитом *T. gondii*. Овај циљ се реализује кроз истраживање раширености инфекције *T. gondii* на репрезентативном узорку свиња са читаве територије Србије кроз комбинацију серолошких, биолошких и молекуларних испитивања као и анализу фактора ризика за инфекцију.

Како би се реализовао постављени циљ постављени су следећи задаци:

- Одређивање репрезентативног узорка на основу примарне производње свиња на територији наше земље;
- Испитивање серопреваленције паразита *T. gondii* код свиња на територији Републике Србије;
- Испитивање присуства вијабилних ткивних циста (путем биолошког огледа) у срцима серопозитивних животиња као моделу јестивог органа;
- Молекуларна идентификација соја изолованих паразита као допринос популационо-генетичком мапирању овог паразита у нашој земљи;
- Анализа фактора ризика за настанак инфекције на фармама свиња у Србији;
- Процена ризика на безбедност меса свиња.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Узорак

4.1.1. Величина узорка

Приликом постављања истраживања, планиран број животиња које ће се испитати у студији је најмањи број животиња потребан за процену преваленције антитета против *T. gondii* код свиња на територији Републике Србије.

Број узорака за епизоотиолошку студију је иницијално одређен према формули за одређивање величине узорка за велике популације, са интервалом поузданости од 95% (Thrusfield, 2005):

$$n = \left(\frac{1.96}{d} \right)^2 \times \frac{[(Se \times Pexp) + (1 - Sp)(1 - Pexp)][(1 - Se \times Pexp) - (1 - Sp)(1 - Pexp)]}{(Se + Sp - 1)^2}$$

где је n број узорака, Se осетљивост (0,829), Sp специфичност (0,903), $Pexp$ очекивана преваленција (0,30), d прецизност (0,05).

Потребна величина узорка је израчуната на основу резултата претходних студија из Србије (Klun и сар., 2011) које су укључивале и узорковање свиња за клање у неколико кланица, где је у једној највиша серопреваленција инфекције *T. gondii* износила 15,9%. За ову серопреваленцију, минимална потребна величина узорка са апсолутном прецизношћу од 5% и са интервалом поверења од 95% износи 206 узорака. За укупан број свиња смо користили саопштење за 2017. годину Републичког завода за статистику (РЗС, 2018) по коме је број свиња на територији Републике Србије у тој години износио 2 910 778. РЗС од 1999. године не располаже подацима за Регион Косова и Метохије, тако да смо територију Косова и Метохије изоставили из нашег испитивања.

С обзиром на то да је варијанса међу кланицама за ову студију непозната, а у случају веће варијабилности израчунате величине узорака морају бити веће, минималан број потребних узорака је повећан четири пута.

У сврху формалног епизоотиолошког надзора, територија Републике Србије подељена је на 12 подручја под епизоотиолошким надзором два научна и 10 специјалистичких ветеринарских института (у даљем тексту: *епизоотиолошка подручја*). Да би се обезбедило да узорак одговара реалној расподели броја свиња на територији Србије, узорковање је вршено тако да се са сваког епизоотиолошког подручја обухвати онолики број свиња који одговара пропорционалном уделу броја гајених свиња у том подручју у односу на пропорционалан укупан број гајених свиња на територији целе земље (Табела 1).

Ради прегледнијих резултата и статистичке обраде, свих 12 подручја груписано је у четири региона на основу климатско географске припадности: северна Србија, западна Србија, централна и југоисточна Србија и подручје Београда. Србија се простире од 41° до 47° северне географске ширине и од 18° до 23° источне географске дужине. Северна Србија (СС) – којој припада Војводина, простире се у Панонској низији и чине је Банат, Бачка и Срем, као и мали, северни део Мачве. Рељеф овог дела Србије је претежно равничарски, док је клима у овом

делу Србије континентална. Западна Србија (ЗС) – Релјефом на овом делу земље простиру се Динарске планине. Централна и југоисточна Србија (ЦС) – Релјеф централног дела земље, углавном брдовит са богатом водном мрежом. Планински релјеф доминира на јужној трећини Србије. Град Београд (БГ) – Град Београд се састоји из две географски доста различите целине, северно од реке Саве и Дунава се простире равничарски део који је у склопу Панонске низије, док се јужно од Саве и Дунава налази брежуљкасто и брдовито подручје.

Табела 1. Број узетих узоракa према уделу гајених свиња по епизоотиолошким подручјима

Регион	Подручје надзора	Број гајених свиња	Удео (%) гајених свиња на подручју у односу на укупну производњу	Број узорака по подручју
Северна Србија	ВСИ Суботица	206124	7,1	70
	ВСИ Сомбор	474499	16,3	130
	ВСИ Зрењанин	237999	8,2	89
	НИВ Нови Сад	744470	25,6	189
	ВСИ Панчево	111326	3,8	42
Град Београд	НИВ Србија	100713	3,5	40
Западна Србија	ВСИ Шабац	449465	15,5	131
	ВСИ Краљево	185445	6,4	20
Централна и југоисточна Србија	ВСИ Пожаревац	161127	5,6	30
	ВСИ Јагодина	84696	2,9	49
	ВСИ Зајечар	52262	1,8	5
	ВСИ Ниш	96652	3,3	30
Укупно		2904778	100%	825

4.1.2. Категорије испитиваних животиња

Узорци су сакупљани од свиња кланичног узраста млађих од 8 месеци (товљеници) и од свиња излучених из репродукције, старијих од 8 месеци. Подаци о пореклу свиња су уношени у базу података после сваког узорковања. Прикупљани подаци су обухватали порекло свиња са епизоотиолошког подручја, фарме, капацитет фарме (мале < 150, средње 150-500, велике > 500 свиња), тип фарме (само за тов или за репродукцију и тов). Такође, обухваћена је и категорија свиња из откупа, за које је претпостављено да су свиње из домаћинства која поседују породично имање на којима се гаји до 10-ак свиња, које се чувају у екстензивним условима гајења, а које купују закупци и даље продају кланицама. Након узимања основних

података, рађена је и детаљна анкета са питањима усмереним на спровођење биосигурносних мера на фармама и домаћинствима. Анкета је рађена личним обиласком фарми и домаћинства као и средствима електронске комуникације.

4.1.3. Узимање, складиштење и поступак са узорцима

Прикупљање узорака је трајало од маја 2017. до октобра 2019. године. Сви узорци који су обрађени у нашој студији су узети на линијама клања у 15 кланица распрострањених широм територије Републике Србије. Удео кланица у којим смо вршили узорковање учествује у укупном уделу клања свиња у Србији са око 850 000 закланих свиња годишње, односно са око 40%. Због великих капацитета кланица као и добре логистике у њима је било могуће узети узорке који су унапред одређени у циљевима истраживања, а који се тичу броја и порекла узорака са различитих епизоотиолошких подручја. Приликом узимања узорака коришћена је неопходна опрема за узорковање, која је подразумевала мантил, капу, стерилне рукавице, налепнице, маркер, вакутејнере без антикоагуланса и ручни фрижидер.

Узорковање се вршило на линији клања током фазе искрварења (Слика 4). Приликом искрварења, узимају су узорци у другом млазу крви директно у вакутејнер, након чега се вакутејнер обележава и ставља у сталак наредних сат времена, затим после тога премешта на температурни режим испод 4 °C у ручном фрижидеру. Након узорковања се узимају сви подаци о пореклу свиња од којих потичу узорци и уносе се у базу података. Узорци су углавном истог дана транспортовани у Националну референтну лабораторију за токсоплазмозу Института за медицинска истраживања УБ, поштујући хладни ланац транспорта узорка на температури до + 4 °C где је вршена даља обрада. У случајевима одложеног транспорта због даљине места на ком је вршено узорковање, узорци су чувани на температури фрижидера (4-8 °C) и сутрадан су по протоколу обрађивани. Обрада је обухватала центрифугирање у трајању од 17 минута на 2400 обртаја у минуту при температури од 4 °C. Након центрифугирања серум је издвајан у епендорф епрувете, при чему је свака добијала свој јединствени лабораторијски број, и складиштена на температури замрзивача (-18 °C) до серолошког испитивања.

Истовремено са узимањем узорака крви, вршено је и узорковање органа, тј. узимани су и узорци срца као модела јестивог органа ради покушаја изолације *T. gondii*. Узорци срца су чувани на температури фрижидера (4 - 8 °C) од момента узорковања до момента читавања резултата серолошког тестирања, не дуже од 3 дана. У случају позитивног серолошког налаза, узорак срца пореклом од исте јединке је подвргавао вештачкој дигестији и добијени дигест је постављан у биолошки оглед.

Узорци крви и срца су узимани од излучених крмача пошто је на основу литературних података познато да је преваленција инфекције *T. gondii* виша код излучених крмача у односу на свиње кланичног узраста.



Слика 4. Узорковање на линији клања током фазе искрварења. Узоркован је други млаз крви директно у вакутејнер.

4.2. Биосигурност на фармама – прикупљање података

Животиње од којих су узети узорци су путем здравствених уверења праћене до фарме порекла. Затим је вршена анкета о имплементирању биосигурносних мера како на фармама, тако и у домаћинствима. За поједине фарме које нису могле бити предмет осведочења на локацији, вршено је анкетирање путем електронске комуникације.

Коришћен је стандардни упитник за оцену биосигурности на фармама (*Australian Pork Industry Biosecurity Code Audit Checklist*) који је прилагођен специфичностима узгоја и хигијенске праксе на фармама свиња у нашој земљи. Упитник са понуђеним одговорима који се односи на податке од интереса као фактора ризика за инфекцију паразитом *T. gondii* дат је у Прилогу 1. Након прикупљања података, сви подаци су кодирани и унети у јединствену базу података ради статистичке обраде. Унапред дефинисани одговори према категоријама

података од значаја за инфекцију паразитом *T. gondii* на фармама свиња у Србији, представљени су у Табели 2.

Осим података из анкета, коришћени су и подаци прибављени из базе података кланица као и Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде (МПШВ).

Табела 2. Категорије прикупљених података о епизоотиолошким факторима ризика за инфекцију свиња паразитом *T. gondii* у Србији.

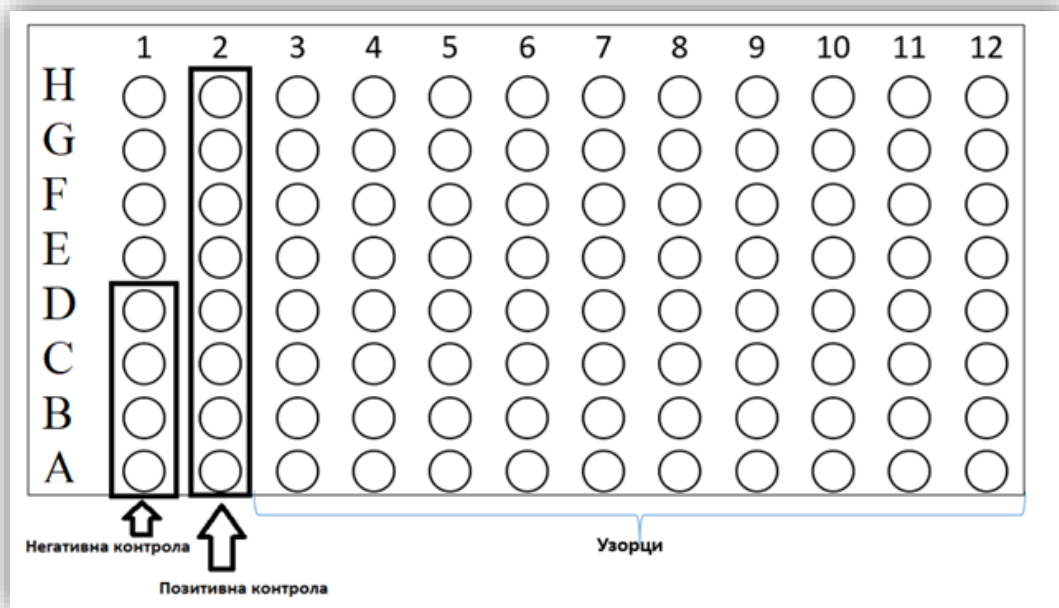
Фактор	Категорија/одговор
Старосна категорија	Товљеници (< 8 месеци); Излучене крмаче (> 8 месеци)
Врста узгоја	Фарма; Домаћинство
Капацитет фарме	Велика (>500); Средња (150-500); Мала (<150)
Систем производње	Затворен систем; Систем завршног това
Обуке радника	Да / Не
Радна униформа	Да / Не
Гајење и других животиња	Да / Не
Присуство мачака	Да / Не
Присуство паса	Да / Не
Присуство глодара	Да / Не
Порекло воде на фарми	Бунарска; Водовод; Водовод/бунарска
Контрола и третирање воде	Да / Не
Затворени систем за храњење	Да / Не
Дезинфекциона баријера на улазу у фарму	Да / Не
Дезинфекциона баријера на улазу у објекте	Да / Не
Контрола глодара	Професионална; Професионална/самостална; Самостална; Не спроводи се
Регион	Северна Србија; Западна Србија; Централна и југоисточна Србија; Град Београд

4.3. Високо осетљиви тест директне аглутинације

Сви прикупљени узорци крви пореклом од свиња, као и крв пореклом од мишева након завршетка биолошког огледа, испитивани су на присуство IgG антитела специфичних за *T. gondii* тестом директне аглутинације високе осетљивости (High Sensitivity Direct Agglutination, HSDA) који представља модификацију теста директне аглутинације по методу *Desmonts* и *Remington* из 1980. године (*Desmonts* и *Remington*, 1980). Овај тест није специфичан за врсту јер у њему долази до директне реакције антиген-антитело, без учешћа коњугата, и зато се може

користити за доказивање специфичних IgG антитела за *T. gondii* како код људи, тако и код различитих врста животиња.

Серолошко испитивање, као и сва остала лабораторијска испитивања у оквиру ове докторске дисертације, извршено је у Националној референтној лабораторији за токсоплазмозу (НРЛТ) у Институту за медицинска истраживања (ИМИ) Универзитета у Београду. Примењени тест није комерцијално доступан већ се припрема директно у лабораторији, а као антиген се користе цели, интактни тахизоити RH соја *T. gondii* фиксирани помоћу формалина. RH сој *T. gondii* који се користи је одржаван серијском пасажом на лабораторијским мишевима у НРЛТ.



Слика 5. Микротитарска плоча са „U“ дном за постављање модификованог теста директне аглутинације-HSDA тест

Приликом извођења серолошких тестова, коришћене су стерилне микротитарске плоче (Слика 5) са 96 бунарчића са заобљеним дном (Thermo Fisher Scientific, САД). Сваки узорак је испитиван у два разблажења (1:25 и 1:50 за свиње, 1:20 и 1:40 за мишеве из биолошких огледа). Разблажења серума су прављена у радном раствору 2-меркаптоетанола (2-МЕ), чија је улога разградња IgM антитела која могу довести до појаве лажно позитивних реакција. Разблажење 1:25 добија се тако што се 4 μL свињског серума меша са 96 μL радног 2-МЕ раствора, док се разблажење 1:20 прави додавањем 5 μL мишијег серума у 100 μL радног раствора 2-МЕ. Приликом извођења серолошког теста, на микротитарској плочи испред испитиваних серума врши се наношење позитивне и негативне контроле. Као позитивна контрола служе серуми пацијената са потврђеним високим налазом *T. gondii*-специфичних антитела, док негативну контролу представља само радни раствор 2-МЕ. У овако припремљене плоче укапавано је по 50 μL разблаженог антигена *T. gondii* у боратном пуферу (БАБС). Након што је додат антиген микротитарска плоча се поклапа поклопцем и лагано меша на шејкеру (EV-301 Tehnica, Железници, Словенија) 5 минута, а затим оставља на собној температури преко ноћи, да би се сутрадан ујутру читавали резултати. Присуство аглутинације на више од 50% површине дна једног бунарчића тумачи се као позитиван налаз, док таложење антигена у облику дугмета на дну бунарчића представља негативан резултат.

Испитивани серуми код којих је утврђена аглутинација у разблажењу 1:25 (односно 1:20 за мишеве), сматрани су позитивним на присуство антитела против *T. gondii*. Серуми у којима је аглутинација била присутна у оба разблажења (1:25, 1:50 код серума свиња, као и 1:20, 1:40 код серума мишева), титрирани су до последњег позитивног разблажења.

4.4. Вештачка дигестија

Вештачка дигестија је рађена по протоколу НРЛТ за изолацију *T. gondii* из срца животиња. Прво су са срца уклоњене све видљиве масноће, и то на PVC дасци која се прала и дезинфиковала препаратима на бази хлора пре сваке употребе. Затим се срце секло у мање комаде величине око 5 x 5 x 5 cm, па се одмеравала тежина од 200 g у великим Петри шољама на тарираној дигиталној ваги. Затим се вршило уситњавање у кухињском апарату за сецкање хране (MMR0801 - Bosch, Словенија), до постизања гранулације величине зрна пиринча. Потом је овако уситњено ткиво пребацивано у ерленмајер посуду запремине 500 mL, где је вршено додавање 0,25% раствора трипсина (*Trypsin solution from porcine pancreas*, T4674 - Sigma Aldrich, St. Louis, Мизури, САД) и стерилног физиолошког раствора до финалне запремине од 300 mL, уз додавање антибиотика - 200 × раствора пеницилин-стрептомицина (РАА Laboratories GmbH, Pasching, Аустрија), и раствора 27 µg/mL амоксицилина (Хемофарм, Вршац, Србија), у количинама израчунатим по следећим формулама:

$$\begin{aligned}\text{трипсин (mL)} &= M \text{ (g)} \times 1,5 \\ \text{пеницилин-стрептомицин (mL)} &= M \text{ (g)} \times 0,03 \\ \text{амоксицилин (mL)} &= M \text{ (g)} \times 0,008\end{aligned}$$

где М представља масу узорка срца који се подвргава дигестији, изражену у грамима.

Даљи поступак вештачке дигестије вршен је на два начина. Када је било више од два узорка за вештачку дигестију, коришћена је мешалица која је стављана у термоцентар подешен на температуру од 42,5 °C, при брзини мућкања од 320 обртаја у минуту. Ова фаза трипсинизације траје 90 минута, уз обавезно проверавање процеса на 45. минуту. У случајевима када смо имали до два узорка дневно, коришћене су магнетне мешалице (Слика 6) са грејачима (ИКА С-MAG HS7; ИКА RH – KT/C, Немачка), које поседују термосонде које су унапред подешене на температуру од 37 °C и уроњене у раствор служе за подешавање температуре раствора. Ерленмајер са хомогенатом је стављан на грејну плочу подешену на температуру од 37 °C, и у њега је убациван магнет, па је праћена дигестија наредних 90 минута. Након завршетка фазе трипсинизације, добијени хомогенат је филтриран кроз 3 слоја памучне газе у нови ерленмајер, одакле је пресипан у градуисане пластичне епрувете од 50 mL. Потом су епрувете са филтратом центрифугиране (Heraeus Megafuge 1.0 R, Немачка) 10 минута на 3000 обртаја при температури од 4 °C, и након центрифугирања одливен супернатант. Добијени талог је ресуспендован физиолошким раствором (до 50 mL) и испиран 10 минута на 3000 обртаја при температури од 4 °C, након чега је опет одливан супернатант, и овакав поступак испирања физиолошким раствором понављан је још 2 пута. Потом је 2 x 300 µL талоба одвајано за PCR и чувано на температури од -20 °C до момента екстракције, а 1 x 300 µL остављано као резервни узорак. Преостали талог је мешан са радним раствором гентамицина (100 µL антибиотика на 1 mL талоба) и одмах се приступало постављању биолошког огледа.



Слика 6. Фаза трипсинизације биолошког огледа у НРЛТ

4.5. Биолошки оглед

Сви узорци срца који су подвргнути дигестији помоћу трипсина, коришћени су за постављање биолошких огледа на мишевима, по протоколу који су описали Djurković-Djaković и сар. (2005). За постављање биолошког огледа коришћена су по два лабораторијска миша соја *Swiss-Webster*, тежине ≥ 18 g, који су набављани за сврхе биолошких огледа са Војномедицинске академије у Београду (ИМИ - одељење за експерименталну хирургију и узгој лабораторијских животиња). На количину инокулата утицало је више фактора: од величине мишева до количине и изгледа самог дигеста (уколико би дигест имао видљиве примесе крви, или ако би миш био мањи, количина инокулата би се смањивала). Углавном је

коришћена запремина од 1,2 mL дигеста са гентамицином за интраперитонеалну инокулацију. Од момента инокулације вршена је свакодневна опсервација мишева, у циљу праћења здравственог стања током свих шест недеља колико траје биолошки оглед (Слика 7). Све време трајања огледа храна и вода за пиће су били доступни сваком мишу *ad libitum*. Мишеви се повремено пре коришћења проверавају на евентуално присуство паразита *T. gondii*, и никад до сада се ни за једног наивног миша није показало да је већ био инфициран пре укључивања у оглед.



Слика 7. Опсервација лабораторијских животиња током трајања експеримента (на картонима се бележи дневни *decursus*)

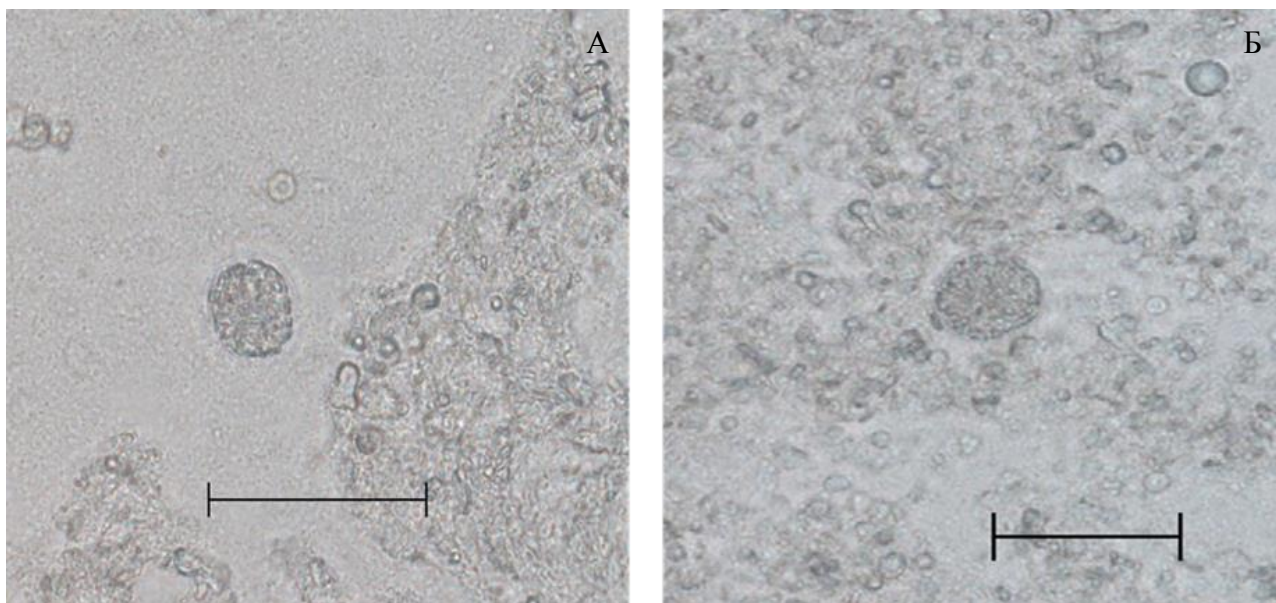
Након истека периода од шест недеља од дана постављања биолошког огледа, приступало се жртвовању животиња, при чему су поштовани сви принципи добробити огледних животиња, и од сваког жртвованог миша је узима узорак крви и издвајан мозак. Крв је пунктирана директно из срца, а затим издвајан серум ради серолошког испитивања описаним HSDA тестом. Од сваког мозга је узет узорак чеоног режња, од којег је притиском између предметног стакла и покровне луспице прављен тзв. „squash“ препарат, који је затим гледан под светлосним микроскопом, на увећању $\times 20$. Остатак мозга је хомогенизован форсираном пасажом кроз иглу 21G (15-20 пута) и подузорак од 100 μL прегледан под светлосним контраст фазним микроскопом на истом увећању (Слика 8 а/б).

У случају позитивног налаза, приступало се бројању циста у направљеном подузорку (100 μL), и то у 4 капи, након чега је рачунат просечан број циста у 1 mL хомогената, по следећој формули:

$$\text{Број циста/mL} = \frac{(\text{број циста избројаних у } 100 \mu\text{L})}{4} \times 40$$

Резултат биолошког огледа сматран је позитивним ако је у хомогенату мозга детектована макар једна ткивна циста, или ако је детектована ДНК *T. gondii*, или ако су у серуму доказана специфична IgG антитела, код једног или оба миша из постављеног биолошког огледа.

Извођење биолошког огледа према наведеном протоколу је одобрено од стране Етичког савета, Министарство пољопривреде и заштите животне средине, Управа за ветерину, одлука бр. 323-07-02446/2014-05/1.



Слика 8 (а/б). Цисте *Toxoplasma gondii* у хомогенату мозга миша, репрезентативни примери (размерник = 50 μm)

4.6. Молекуларна испитивања

Дигести срца свиња из којих је постављан биолошки оглед, испитани су на присуство генетског материјала *T. gondii*. За узорке у којима је паразитска ДНК пронађена у довољној количини, урађена је генотипизација да би се утврдила припадност генотипу одређене лозе *T. gondii*.

4.6.1. Екстракција ДНК

За екстракцију ДНК из дигеста и мозга коришћени су комерцијални китови GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, САД), којима се нуклеинске киселине издвајају у колоницама са силика гел мембраном. Екстракција је вршена према протоколу произвођача за изоловање ДНК из крви сисара, без измена.

4.6.2. Детекција ДНК *T. gondii* PCR методом у реалном времену

Детекција ДНК *T. gondii* PCR методом се заснива на амплификацији секвенци од 80 бп унутар 529 бп репетитивног елемента који се понавља у 200 до 300 копија по геному, што зависи од соја паразита. Реакциона смеша за методу је садржала 10 μ L Master Mix-a (Applied Biosystems, Foster City, Калифорнија, САД), 7,5 μ M прајмера HO1 (3'-AGAGACACCGGAATGCGATCT-5') и HO2 (3'-CCCTCTTCTCCACTCTTCAATTCT-5'), 3,5 μ M Taqman probe 3'-FAM-ACGCTTTCCTCGTGGTGATGGCG-TAMRA-5', 3 μ L екстраховане гДНК као и одговарајућа запремина Ultrapure воде (ThermoFisher Scientific, Waltham, Масачусетс, САД) до укупне запремине од 20 μ L. Амплификација секвенци је спроведена у два корака: прво је ради активирања урацил ДНК гликозилазе вршена инкубација у трајању од 2 минута на 50 °C, и иницијална денатурација на 95 °C у трајању од 5 минута, а затим 45 циклуса од 95 °C у трајању од 15 секунди, и 60°C у трајању од 60 секунди. Детектовање је вршено након сваког циклуса амплификације, а праг позитивности је одређен аутоматским алгоритмом након амплификације 15 циклуса. За амплификацију је коришћен уређај StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Калифорнија, САД).

4.6.3. Генотипизација сојева паразита *T. gondii* M_nPCR-RFLP методом

За утврђивање генотипова је коришћена метода златног стандарда за генотипизацију и сар. (2010), користећи следеће стандардизоване локусе: altSAG2, BTUB, GRA6, C-22, C-29, L358, PK1, Apico, CS3 (Khan и сар., 2005; Pena и сар., 2008) (Табела 3). Генотипизација се састоји из два корака. У првом кораку у ком се сви локуси умножавају истовремено, реакциона смеша садржи PCR MasterMix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Масачусетс, САД) концентрације 1x, 0,15 mM свих екстерних прајмера за наведених девет локуса, 2 μ L узорка екстраховане гДНК и воду без ДНК-азе/РНК-азе (Ultrapure). Укупна запремина реакционе смеше је 20 μ L, а термални профил се састојао од три корака: иницијална денатурација од 3 минута на 95 °C, затим 30 циклуса од 30 секунди на 95 °C, 60 секунди на 55°C и 60 секунди на 72°C и коначно 5 минута на 72°C. Реакционе смеше за други корак, у којем се умножава сваки локус појединачно, садржале су PCR MasterMix концентрације 1x, 0,3 mM интерних прајмера за сваки појединачни локус, 2 μ L реакционе смеше добијене у првом кораку и воду без ДНК-азе/РНК-азе (Ultrapure). Укупна запремина је износила 20 μ L као и у првом кораку, термални профил се такође састојао од три корака: иницијалне денатурације идентичне као у првом кораку, затим 35 циклуса од 30 секунди на 95 °C, 60 секунди на 60°C и 60 секунди на температури од 72 °C и коначно 5 минута на 72°C. Једини изузетак је термални профил за Apico маркер за који је температура жарења износила 58 °C. Амплификација је вршена у Veriti апарату (Applied Biosystems, Foster City, Калифорнија, САД). За добијање фрагмената различитих дужина ензимском рестрикцијом, продукти амплификације из другог корака третирани су одговарајућим рестрикционим ензимима. Реакциона смеша запремине 25 μ L је садржала Fast Digest Buffer (ThermoFisher Scientific, Waltham, Масачусетс, САД) концентрације 1x, 1 до 2 јединице одговарајућег ензима, 5 μ L PCR реакције као и воду без ДНК-азе/РНК-азе (Ultrapure). Раздвајање и анализа продуката који су добијени коришћењем методе M_nPCR-RFLP вршени су електрофорезом на 2,5% агарозном гелу са додатим раствором етидијум бромида у концентрацији од 0,4 μ g/mL (ThermoFisher Scientific, Waltham, Масачусетс, САД). Узорци су укапавани у бунарчиће на агарозном гелу, а резултати су читавани након завршене електрофорезе постављањем гела у УВ трансилуминатор (Gel

Documentation system/CCD, Biometra, Гетинген, Немачка), фотографисањем и анализирањем. Како бисмо идентификовали генотип, добијени фрагменти упоређивани су са профилем алела референтних архетипова. Као контролни узорак за тип I *T. gondii* служио је RH сој, за тип II сој ME49 док је сој NED био контролни за тип III.

Табела 3. Секвенце прајмера (3' → 5'), величина ампликона и ензими коришћени за генотипизацију

Локус	Секвенце екстерних прајмера	Секвенце интерних прајмера	Дужина интерних ампликона	Рестри-кциони ензими
altSAG2	GGAACGCGAACAATGAGTTT GCACTGTGTCCAGGGTTT	ACCCATCTGCGAAGAAAACG ATTTGACACCAGCGGGAGCAC	546bp	Mbo I
GRA6	ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT GCACCTTCGCTTGTGGTT	TTTCCGAGCAGGTGACCT TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344bp	SaqA I
BTUB	TCCAAAATGAGAGAAATCGT AAATTGAAATGACGGAAGAA	GAGGTCATCTCGGACGAACA TTGTAGGAACACCCGGACGC	411bp	BshI1285 I Taq I
L358	TCTCTCGACTTCGCCTCTTC GCAATTTCTCGAAGACAGG	AGGAGGCGTAGCGCAAGT CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418bp	BsuR I Hin1 II
C22-8	TGATGCATCCATGCGTTTAT CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	TCTCTCTACGTGGACGCC AGGTGCTTGGATATTTCGC	521bp	Alw26 I Mbo II
C29-2	ACCCACTGAGCGAAAAGAAA AGGGTCTCTTGCGCATACAT	AGTTCTGCAGAGTGTCGC TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446bp	HpyCH4IV Rsa I
PK1	GAAAGCTGTCCACCCTGAAA AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	CGCAAAGGGAGACAATCAGT TCATCGCTGAATCTCATTCG	903bp	(ECO 88) RsaI
CS3	GTGTATCTCCGAGGGGGTCT TGTGACTTCTTCGCATCGAC	AGCGGATTTCCAACACTGTC CTGCTGCATTACAAACTCC	557bp	Hin1 II Mbo I
Apico	TGGTTTTAACCCCTAGATTGTGG AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	GCAAAATCTTGAATTCTCAGTT GGGATTCTGAACCCTTGATA	640bp	BspT I Hpy F3I

4.7. Статистичка обрада података

Преваленција инфекције паразитом *T. gondii* код свиња на територији Србије је представљена са интервалом поверења од 95%, и нивоом значајности од 5%. Разлике у серопреваленцији између категорија независних варијабли утврђене су Хи-квадрат тестом. Утицај независних варијабли (старосна категорија, врста узгоја, капацитет фарме, систем производње, обука радника, радна униформа, гајење других животиња, присуство мачака, присуство паса, присуство глодара, порекло воде на фарми, контрола и третирање воде, затворени систем за храњење, дезинфекциона баријера на улазу у фарму, дезинфекциона баријера на улазу у објекте, контрола глодара, регион) на присуство инфекције код свиња, изражене као дихотомне (да/не) зависне варијабле испитан је методом униваријантне и мултиваријантне логистичке регресије. За независне варијабле, дихотомне као и за оне са више категорија, референтна категорија је била она са највећом учесталošћу посматрања. Једини изузетак је била варијабла „контрола глодара“, код које су категорије распоређене према

очекиваним ефектима примењене методе. Независне варијабле које су у униваријантној анализи биле значајно повезане са инфекцијом на нивоу $P \leq 0,15$ тестиране су на евентуалну колинеарност и укључене су у мултиваријантне моделе, чија је исправност проверена помоћу Hosmer-Lemeshow теста.

Ниво значајности за све анализе је био 5%. Статистичка обрада података обављена је помоћу статистичког пакета SPSS, верзија 11.5 (SPSS Inc., Chicago, Илиноис, САД).

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Подаци о животињама

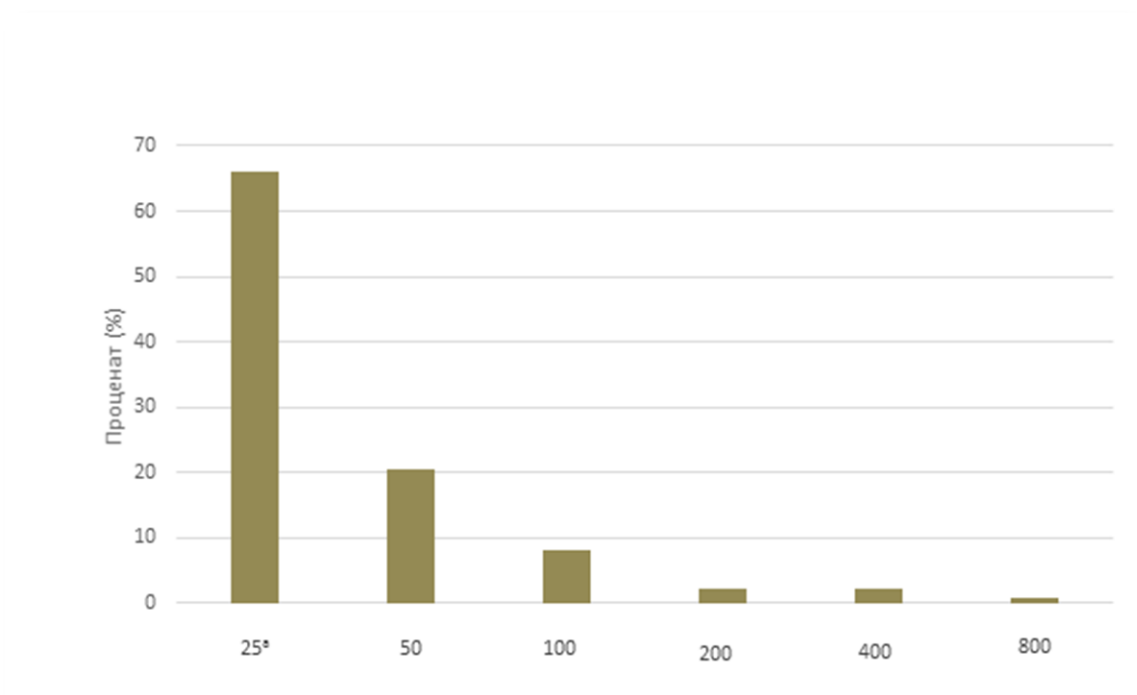
Узорковање крви свиња спроведено је у периоду мај 2017. - октобар 2019. године. Узорковано је 825 јединки са линије клања у 15 кланица, а свиње су потицале са целокупне територије Републике Србије (Слика 9). За све животиње подаци о пореклу прикупљени су у кланици. Детаљан упитник о биосигурносним системима у потпуности је попуњен за фарме са којих је потицао 581 узорак и ови подаци анализирани су посебно. Упоредо је вршено узорковање крви и срца као модела јестивог органа од укупно 68 излучених крмача (код којих је из срца серопозитивних јединки постављан биолошки оглед), чије је узорковање вршено у три кланице.



Слика 9. Места узорковања и места порекла свиња од којих су узети узорци (Мапа је преузета од Републичког завода за статистику и прилагођена нашој студији)

5.2. Серопреваленција инфекције паразитом *T. gondii* и фактори ризика

Укупна преваленција инфекције код испитаних свиња била је 16,5% (136/825), са титром специфичних антитела који се кретао у опсегу од 1:25 до 1:800 (Графикон 1). Више од 80% испитиваних свиња је било позитивно у титру 1:50, а само једна свиња у титру од 1:800.



Графикон 1. Дистрибуција нивоа антитела специфичних за *Toxoplasma gondii* код серопозитивних свиња у Србији; ^a реципрочни титар

Табела 4. Серопреваленција инфекције паразитом *Toxoplasma gondii* код свих узоркованих свиња (n=825) у зависности од испитиваних фактора, и резултати униваријантне логистичке регресионе анализе. Као јединица анализе посматране су појединачне свиње (n - број испитаних, ИП - интервал поверења, OR - однос вероватноћа; * свиње из откупа).

Фактор	n	Преваленца (%)	95% ИП	OR	95% ИП	P
Врста узгоја						0,794
Фарма	616	16,4	13,6-19,6			
Домаћинство	124	15,3	9,5-22,9	0,923	0,541-1,573	
Откуп*	85	18,8	11,2-28,8	1,182	0,659-2,121	
Регион						0,189
Северна Србија	520	16,3	13,3-19,8			
Западна Србија	151	15,2	9,9-22,0	0,920	0,557-1,518	
Централна и југоисточна Србија	114	21,9	14,7-30,6	1,438	0,871-2,372	
Град Београд	40	7,5	1,6-20,4	0,415	0,125-1,377	
Старосна категорија						<0,0001
Товљеници (< 8 месеци)	786	15,1	12,7-17,8			
Излучене крмаче (≥ 8 месеци)	39	43,6	27,8-60,4	4,331	2,233-8,399	
Капацитет фарме						0,756
Велика (>500)	511	16,6	13,5-20,1			
Средња (150-500)	110	17,3	10,7-25,6	1,046	0,606-1,807	
Мала (<150)	119	13,4	7,9-20,9	0,779	0,438-1,385	
Откуп*	85	18,8	11,2-28,8	1,162	0,643-2,100	
Систем производње						0,478
Затворен систем	576	15,5	13,6-18,7			
Систем завршног това	164	18,9	13,2-25,7	1,275	0,812-2,003	
Откуп*	85	18,8	11,2-28,8	1,269	0,704-2,286	
Да ли се врши обука радника						0,337
Не	597	17,3	14,3-20,5			
Да	228	14,3	10,2-19,7	0,822	0,530-1,242	
Контрола и третирање воде						0,555
Не	577	17,0	14,0-20,3			
Да	248	15,3	11,1-20,4	0,884	0,588-1,330	
Дезобаријера на улазу фарме						0,971
Да	472	16,5	13,3-20,2			
Не	353	16,4	12,7-20,7	1,007	0,694-1,460	
Контрола глодара						0,029
Професионална дератизација	82	4,9	1,3-12,0			
Професионална и самостална	190	20,5	15,0-27,0	5,036	1,737-14,605	
Самостална	284	17,3	13,0-22,2	4,066	1,422-11,629	
Не спроводи се дератизација	269	16,4	12,1-21,3	3,813	1,327-10,957	
Укупно	825	16,5	14,0-19,0			

У униваријантној анализи инфекција свиња била је повезана само са старошћу животиња и са приступом контроли глодара. Серопреваленција је била статистички значајно виша (<0,0001) код излучених крмача (43,6%) у односу на товљенике (15,1%). Такође, била је значајно нижа код свиња пореклом са фарме са професионално имплементираним програмом дератизације (4,9%), у односу на све остале видове контроле глодара (комбинација самосталне

и професионалне дератизације – 20,5%, самостално спроведен поступак дератизације – 17,3%, дератизација се уопште не спроводи – 16,4%).

Табела 5. Фактори ризика за инфекцију паразитом *T. gondii* код свиња (n=825) у Србији. Финални мултиваријантни модел; као јединица анализе посматране су појединачне животиње.

Фактор	Кориговани OR	95% ИП	P
Старосна категорија			<0,0001
Товљеници (< 8 месеци)			
Излучене крмаче (≥ 8 месеци)	4,197	2,104-8,374	
Вршење контроле глодара			0,040
Професионална дератизација			
Професионална и самостална	4,550	1,564-13,237	
Самостална	3,304	1,144-9,543	
Не спроводи се	3,813	1,327-10,957	

Старосна категорија и контрола глодара на фармама, као варијабле повезане са инфекцијом паразитом *T. gondii* у униваријантној анализи, испитане су и у моделима мултиваријантне логистичке регресије. Финални модел је показао да су обе независно повезане са инфекцијом паразитом *T. gondii* (Табела 5). Излучене крмаче биле су под више од четири пута вишем ризику од инфекције *T. gondii* у поређењу са свињама из това (млађим од 8 месеци). У односу на професионалну дератизацију, ризик за инфекцију свиња пореклом са фарми на којима се дератизација спроводила професионално у комбинацији са самосталним вршењем дератизације био је 4 пута виши, а само нешто нижи био је ризик на фармама где се вршила самостална дератизација (више од 3 пута), као и на фармама где се дератизација уопште није спроводила.

Пошто није било могуће извршити детаљне анкете са питањима која се односе на биосигурност на фармама и домаћинствима на свим фармамама порекла, него само на 55 фарми са којих је потицао 581 узорак (70,4% укупног узорка), ови резултати су приказани засебно. Униваријантна анализа показала је да су старосна група, узгајање више врста, присуство глодара, дезинфекционе баријере на улазу у сваки објект, контрола глодара, регион, као и тип фарме, повезани са серопреваленцијом *T. gondii* код појединачних свиња (Табела 6). Ове варијабле укључене су у мултиваријантне анализе, при чему је метод поступног корака уназад имао најбоље уклапање у модел.

Табела 6. Серопреваленција инфекције паразитом *Toxoplasma gondii* код 581 узорковане свиње са комплетним подацима о биосигурносним мерама на фармама у зависности од испитиваних фактора, и резултати униваријантне логистичке регресионе анализе. Као јединица анализе посматране су појединачне свиње (*n* - број испитаних, ИП - интервал поверења, *OR* - однос вероватноћа).

Фактор	n	Преваленца (%)	95% ИП	OR	95% ИП	P
Врста узгоја						0,704
Фарма	526	16,5	13,7-20,0			
Домаћинство	55	14,8	6,5-26,7	0,859	0,392-1,881	
Старосна категорија						<0,0001
Товљеници (< 8 месеци)	542	14,4	11,5-17,6			
Излучене крмаче (≥ 8 месеци)	39	43,6	27,8-60,4	4,579	2,336-9,045	
Капацитет фарме						0,523
Велика (>500)	471	17,2	13,9-20,9			
Средња (150-500)	70	12,9	6,0-23,0	0,710	0,339-1,488	
Мала (<150)	40	12,5	4,2-26,8	0,688	0,261-1,809	
Обуке радника						0,323
Не	353	17,6	13,7-21,9			
Да	228	14,5	10,2-19,7	0,794	0,502-1,258	
Радна униформа						0,823
Да	516	16,5	13,4-20,0			
Не	65	15,4	7,6-26,5	0,922	0,452-1,880	
Гајење и других животиња						<0,0001
Не	526	14,4	11,6-17,7			
Да	55	34,5	22,2-48,6	3,125	1,704-5,732	
Присуство мачака на фарми						0,178
Не	330	14,5	10,9-18,8			
Да	251	18,7	14,1-24,1	1,354	0,871-2,103	
Присуство паса на фарми						0,710
Да	419	16,7	10,2-21,9			
Не	162	15,4	13,3-20,6	0,910	0,553-1,496	
Присуство глодара на фарми						0,040
Да	374	18,7	14,9-23,0			
Не	207	12,1	8,0-17,3	0,597	0,365-0,976	
Порекло воде на фарми						0,360
Бунарска вода	469	15,8	12,6-19,4			
Водовод	50	14,0	5,8-26,7	0,869	0,376-2,006	
Водовод /бунарска вода	62	22,6	12,9-35,0	1,557	0,817-2,967	
Контрола и третирање воде						0,563
Не	333	17,1	13,2-21,6			
Да	248	15,3	11,1-20,4	0,876	0,560-1,371	

Затворен систем за храњење Да Не	330 251	14,8 18,3	11,2-19,1 13,7-23,7	1,287	0,828-2,000	0,262
Дезинфекциона баријера на улазу фарме Да Не	472 109	16,5 15,6	13,3-20,2 9,4-23,8	0,933	0,527-1,653	0,813
Дезинфекциона баријера испред сваког објекта на фарми Да Не	382 199	18,8 11,6	15,0-23,1 7,5-16,8	0,563	0,340-0,932	0,025
Вршење контроле глодара Професионална дератизација Професионална и самостална Самостална Не спроводи се дератизација	82 190 284 25	4,9 20,5 17,3 12,0	1,3-12,0 15,0-27,0 13,0-22,2 2,5-31,2	5,036 4,066 2,659	1,737-14,605 1,422-11,629 0,553-12,781	0,025
Регион Северна Србија Западна Србија Цент. и југоисточна Србија Град Београд	441 35 65 40	14,1 31,4 29,2 7,5	10,9-17,7 16,7-49,1 18,6-41,8 1,6-20,4	2,802 2,525 0,496	1,307-6,006 1,388-4,592 0,148-1,657	0,001
Систем производње Затворен систем производње Систем завршног това	496 85	15,3 22,4	12,3-18,8 14,0-23,7	1,591	0,904-2,801	0,108

Коначни модел је показао да су регион, старосна категорија, гајење и других врста домаћих животиња поред свиња, дезинфекционе баријере испред сваког објекта на фарми и систем производње, независно повезани са инфекцијом паразитом *T. gondii* односно да представљају факторе ризика за инфекцију. Свиње из западне Србије, као и свиње из централне и југоисточне Србије, биле су под четири односно два пута вишим ризиком да буду заражене него свиње из северне Србије, док је порекло са подручја Града Београда имало заштитни ефекат од 75% у односу на регион северне Србије. Излучене крмаче су биле под 14 пута вишим ризиком да буду заражене у поређењу са товљеницима. Ризик за свиње пореклом са фарми на којима се узгајају и друге домаће животињске врсте био је три пута виши у односу на фарме на којима су узгајане само свиње. Свиње које су пореклом са фарми где се врши само тов биле су под четири и по пута вишим ризиком да буду заражене од оних које потичу са фарми на којима је заокружен процес производње од репродукције до това. (Табела 7).

Табела 7. Фактори ризика за инфекцију паразитом *T. gondii* код свиња (n=581) у Србији. Финални мултиваријантни модел; као јединица анализе посматране су појединачне животиње.

Фактор	Кориговани OR	95% ИП	P
Регион			0,001
Северна Србије			
Западна Србије	4,014	1,777-9,070	
Централна и југоисточна Србија	2,264	1,051-4,877	
Град Београд	0,250	0,067-0,935	
Старосна категорија			<0,0001
Товљеници (< 8 месеци)			
Излучене крмаче (≥ 8 месеци)	14,247	6,258-32,438	
Гајење и других животиња			0,003
Не			
Да	3,092	1,480-6,459	
Дезинфекциона баријера испред сваког објекта на фарми			0,005
Да			
Не	0,385	0,197-0,752	
Систем производње			<0,0001
Затворен систем производње			
Систем завршног това	4,508	2,160-9,406	

5.3. Инфекција паразитом *T. gondii* на нивоу фарме

Инфекција паразитом *T. gondii* је такође анализирана узимајући фарму као јединицу анализе. Од укупно 55 фарми за које је извршено и анкетирање о биосигурности на фармама, скоро две трећине су имале најмање једну серопозитивну животињу, са укупном преваленцијом од 61,8%. Међутим, униваријантна анализа претпостављених фактора ризика је показала да ниједна од варијабли није била повезана ($P>0.15$) са серопреваленцијом *T. gondii*.

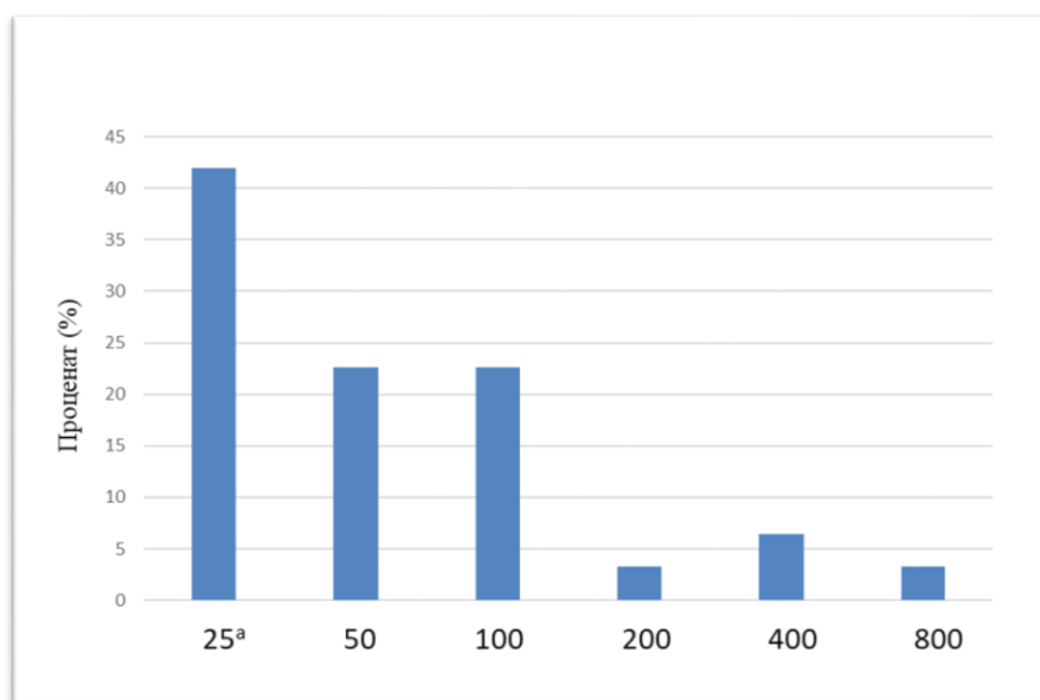
5.4. Директна детекција *T. gondii* и потврда вијабилности

Крв, и срце као модел јестивог органа, узорковани су од 68 излучених крмача у четири кланице. Специфична антитела у титру $\geq 1:25$ детектована су код 33 крмаче, и срца пореклом од ових животиња подвргнута су вештачкој дигестији и затим детекцији ДНК паразита qPCR методом, односно детекцији самог паразита биолошким огледом. Два биолошка огледа нису могла бити завршена због јаке бактеријске инфекције и последичног егзитуса мишева. Перитонеални ексудати прикупљени од мишева непосредно *post mortem* испитани су у лабораторији Факултета ветеринарске медицине на Катедри за микробиологију са имунологијом, када је у свим узорцима утврђено присуство великог броја бактерија, и то грам негативних *E. coli* (резистентне на антибиотике коришћене током обраде дигеста срца), те се

може сматрати да су мишеви угинули услед колисептикемије. Стога су у Табели 8 приказани резултати директне детекције *T. gondii* у материјалу пореклом од 31 крмаче.

Биолошки огледи били су позитивни на цисте *T. gondii* у 22,6% (7/31) случајева. У истом броју дигеста срца (22,6%, 7/31) детектована је ДНК *T. gondii*, уз укупну сагласност ова два метода од 87,1% и κ вредност од 0,631. На основу серолошког испитивања мишева, биолошки огледи били су позитивни у 29% случајева (9/31, укључујући два биолошка огледа који су била позитивни само на основу серологије). Коначно, према присуству ДНК *T. gondii* у мозгу мишева, позитивност биолошких огледа је била 35,5%. Кумулативно, када су све три методе детекције узете у обзир, докази о присуству *T. gondii* откривени су у укупно 41,9% (13/31) биолошких огледа.

Логистичком регресионом анализом доказано је да висина титра специфичних антитела у серуму крмача није имала утицаја ни на успех изолације, ни на детекцију ДНК *T. gondii* у дигестима срца.



Графикон 2. Дистрибуција нивоа антитела *Toxoplasma gondii* код серопозитивних излучених крмача; ^a реципрочни титар

Међутим, највећи број изолација циста *T. gondii* (5/7) јесте потицао из мишева инокулисаних материјалом крмача са титром специфичних антитела једнаким или вишим од 1:100 (Графикон 2), док цисте нису детектоване у мозгу мишева из чак 13 биолошких огледа пореклом од крмача са титром од 1:25. Треба напоменути да је у једном од ових 13 огледа детектована ДНК *T. gondii* и у дигесту и мозгу миша, у другом само у мозгу миша, док је у трећем случају миш био позитиван само серолошки.

Табела 8. Резултати биолошких огледа из дигеста срца пореклом од 31 излучене крмаче серопозитивне на *T. gondii*

ID број свиње	HSDA титар (серум свиње)	qPCR (дигест срца свиње)	Мишеви са цистама / број испитаних мишева (n) (број циста)	Серопозитивни мишеви / број испитаних мишева (n) (HSDA титар)	qPCR (мозак мишева*)
C 1	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 5	1:50	-	0/2	0/2	0/2
C 10	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 14	1:100	+	1/1 ^a (820/mL)	1/1 ^a (1:20480)	2/2 [†]
C 16	1:50	-	1/2 (30/mL)	1/2 (1:40960)	1/2
C 19	1:50	-	0/2	0/2	0/2
C 23	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 24	1:100	-	0/2	0/2	1/2
C 27	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 29	1:50	-	0/2	0/2	0/2
C 30	1:100	-	2/2 (30/mL; 10/mL)	2/2 (1:5120; 1:2560)	2/2
C 33	1:25	+	0/0 ^б	0/0 ^б	1/1 ^{б, †}
C 34	1:25	-	0/2	1/2 (1:40)	0/2
C 35	1:100	-	0/2	1/2 (1:20)	0/2
C 36	1:200	+	0/1 ^в	0/1 ^в	0/1 ^в
C 37	1:400	+	1/1 ^г (<10/mL*)	1/1 ^г (1:40960)	1/1 ^г
C 44	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 46	1:50	+	1/1 ^д (20/mL)	1/1 ^д (1:20480)	1/1 ^д
C 47	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 48	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 49	1:800	-	0/2	0/2	0/2
C 50	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 52	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 53	1:50	-	0/2	0/2	0/2
C 54	1:25	-	0/2	0/2	0/2
C 58	1:100	-	0/2	0/2	0/2
C 60	1:25	-	0/2	0/2	1/2
C 64	1:50	-	0/2	0/2	0/2
C 65	1:400	-	0/2	0/2	1/2
C 66	1:100	+	1/2 (30/mL)	2/2 (1:5120; 1:5120)	2/2
C 68	1:100	+	1/2 (10/mL)	2/2 (1:2560; 1:5120)	2/2

^a Један миш је угиуо 14. дана након инфекције (†qPCR: јетра, срце); ^б Један миш је угиуо 10. дана након инфекције (није прегледан), док је други миш из огледа жртвован 14. дана након инфекције (†qPCR: срце, плућа, јетра); ^в Један миш је угиуо 3. дана након инфекције (ентеротоксична *Escherichia coli* изолована из перитонеалног ексудата); ^г Један миш угиуо другог дана након инфекције (ентеротоксична *Escherichia coli* изолована из перитонеалног ексудата); ^д Један миш је угиуо 13. дана након инфекције; * Цисте су пронађене само у „squash“ препаратима.

Анализом пратећих података крмача уочено је да је доказ о присуству вијабилних паразита у њиховим ткивима детектован код јединки пореклом са све три кланице у којима је вршено узорковање (Табела 9).

Табела 9. Резултати биолошког огледа у односу на кланице где је вршено узорковање

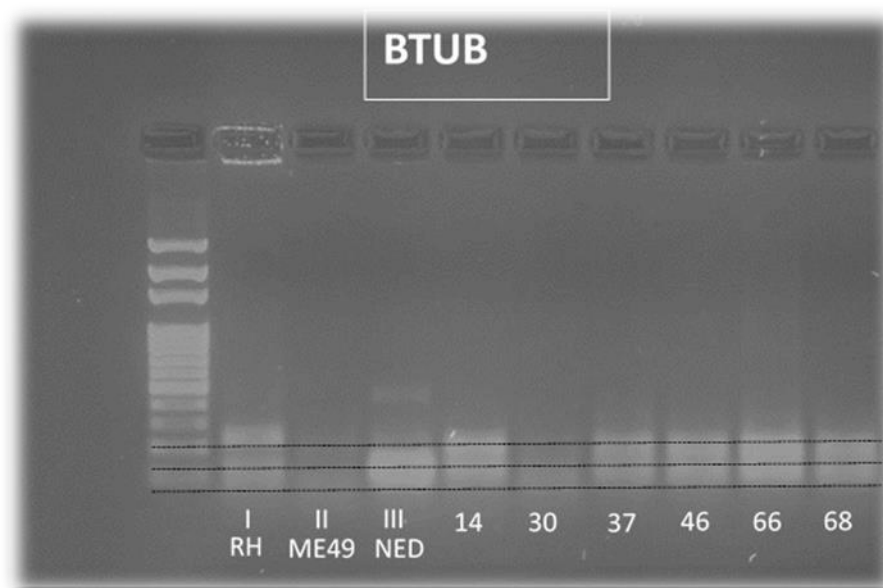
	Број испитаних излучених крмача	Број серо-позитивних крмача (HSDA)	Број qPCR-позитивних дигеста срца	Број БО са цистама у мозгу мишева (микро-скопија)	Број БО са серопозитивним мишевима (HSDA)	Број БО са qPCR-позитивним мозговима мишева	Укупно позитивних биолошких огледа*
Кланица 1	25	8	1	2	2	3	3
Кланица 2	40	21 (23)**	4	3	5	6	8
Кланица 3	3	2	2	2	2	2	2
Укупно	68	31	7	7	9	11	13

* Позитивним биолошким огледом сматрао се сваки оглед где је код мишева детектована макар једна циста *T. gondii*, или ДНК паразита, или уколико је доказано присуство специфичних IgG антитела;

** Два биолошка нису завршена због угинућа мишева услед бактеријске инфекције.

5.5. Генотипизација

Анализом фрагмената добијених деловањем рестрикционих ензима на продукте Mn-PCR реакције, одређивање генотипа било је могуће за укупно шест изолата *T. gondii*. Код свих шест изолата је извршена типизација и сви изолати су идентификовани као генотипови лозе II (Табела 10). Генотипизација је урађена на основу пет стандардизованих маркера: Alt Sag2, BTUB, GRA6, C22-8, PK-1. Сви резултати су јасно очитани на геловима (Слика 10; Слика 11); једино узорак бр. С 37, због недовољне количине темплата није било могуће испитати на маркер C22-8.



Слика 10. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер BTUB: I, II, III – позитивне контроле за одговарајуће клонске типове *T. gondii*; 14, 30, 37, 46, 66, 68 – узорци.

Табела 10: Резултати PCR-RFLP генотипизације изолата *T. gondii* пореклом из излучених крмача. Као референтни сојеви коришћени су архетипски I (RH), II (ME49) и III (NED).

Ознака референтног соја / идент. број свиње	Генотипизација локуса				
	<u>Хромозоми</u>				
	<i>VIII</i> Alt Sag2	<i>IX</i> BTUB	<i>X</i> GRA6	<i>I</i> C22-8	<i>VI</i> PK-1
Реф. сој типа I – RH	I	I	I	I	I
Реф. сој типа II – ME 49	II	II	II	II	II
Реф. сој типа III – NED	III	III	III	III	III
C 14	II	II	II	II	II
C 30	II	II	II	II	II
C 37	II	II	II	-	II
C 46	II	II	II	II	II
C 66	II	II	II	II	II
C 68	II	II	II	II	II



Слика 11. Фрагменти добијени деловањем рестрикционих ензима, за маркер alt. SAG 2: I, II, III – позитивне контроле за одговарајуће клонске типове *T. gondii*; 14, 30, 37, 46, 66, 68 – узорци.

6. ДИСКУСИЈА

Резултати ове опсежне студије, која је обухватила испитивање 825 узорака крви пореклом од свиња које су заклане у кланицама широм Републике Србије и намењене за исхрану људи, показали су серопреваленцију инфекције паразитом *T. gondii* од 16,5%. Ниво специфичних антитела код 136 серопозитивних животиња се кретао у опсегу од 1:25 до 1:800, од којих је 80% испитаних свиња било позитивно у титру 1:50. Као главни фактори ризика за инфекцију паразитом *T. gondii* на фармама/домаћинствима на основу анкетних питања везаних за биосигурност на фармама препознати су: старосна категорија, коришћење професионалне услуге дератизације у комбинацији са самосталним вршењем исте, регион, гајење других врста животиња на истој фарми са свињама, дезинфекционе баријере испред сваког објекта као и сам систем производње свиња. Поред серолошких испитивања и анкете о биосигурности на фармама, експериментом је обухваћено и 68 излучених крмача од којих је 31 крмача била позитивна на присуство антитела паразита *T. gondii*, а од серопозитивних излучених крмача су коришћена срца као модел јестивог органа за постављање биолошких огледа. Од укупног броја постављених биолошких огледа доказано је присуство паразита код 41,9%, било на основу присуства циста и/или ДНК паразита у мозгу мишева, било на основу позитивног серолошког налаза. Генотип паразита је било могуће утврдити за шест изолованих сојева, код свих је извршена типизација и сви изолати су идентификовани као тип II. Имајући у виду резултате ове студије, традицију у конзумирању меса свиња у Србији, као и друга истраживања која су доказала да месо свиња представља доминантан пут инфекције за хуману популацију, неопходно је размишљати о додатим испитивањима и мониторингу како би се смањио ризик за јавно здравље.

Важно је истаћи да је месо свиња значајан извор протеина у целом свету, и да се тренд раста производње свињског меса наставља упоредо са повећањем броја становника. Процењује се да ће глобална потрошња свињског меса порасти на око 130 милиона тона до 2027. године. Само у Европској унији је током 2021. године заклано око 250 милиона свиња (European Commission, 2022), док подаци из 2020. године показују да Европска унија са производњом свињског меса од 23 милиона тона, што представља петину укупне производње свињског меса, заузима друго место у свету по производњи, после Кине а испред САД (Eurostat, 2022). У Србији се гаји око 3 милиона свиња, док се годишње закоље око 2,2 милиона (РЗС, 2018).

С друге стране, месо свиња, посебно НТО, као и сирови или сувомеснати производи од меса свиња, представљају један од главних чинилаца у преношењу патогена путем хране, укључујући и *T. gondii*. Дакле, имајући у виду велики обим производње меса тј. гајења свиња, разумевање епизоотиологије инфекције *T. gondii* на фармама свиња и улоге одређених фактора ризика за инфекцију на фарми су изузетно важни за контролу болести (Guo и сар., 2015). Из наведених разлога, од изузетне користи за креирање здравствене политике у погледу безбедности хране неопходна је процена присуства инфекције паразитом *T. gondii* код животиња у примарној производњи, имајући у виду да је доминантан пут инфекције човека путем НТО меса, а које потиче од инфицираних свиња.

6.1. Присуство инфекције паразитом *T. gondii*

Серолошке студије присуства *T. gondii* код свиња представљају важно средство за надзор овог паразита на нивоу фарме (Zimmerman и сар., 1990; Weigel и сар., 1995), и неопходно је да се спроводе истраживања која пружају додатне сврсисходне информације које могу послужити у доношењу одлука о интервенцијама на фармама (Alban и сар., 2020). Сада већ постоје бројни подаци о серопреваленцији инфекције паразитом *T. gondii* код свиња, с тим да се вредности крећу у великом распону од 0,9% код крмача у Аустрији (Edelhofer, 1994), до чак 90,9% серопозитивних узорака прикупљених од свиња које се гаје на органским фармама у САД (Dubey и сар., 2012).

У овој студији укупна серопреваленција инфекције паразитом *T. gondii* код свиња у Србији је износила 16,5%, а посматрано по старосним категоријама, серопреваленција код крмача је износила 43,6% док је код товљеника била 15,1%. Иако преваленција инфекције може да варира током времена, резултати добијени овим истраживањем према старосним категоријама свиња су слични резултатима добијени у првој сероепизоотиолошкој студији која је обухватала целу територију Србије пре 15 година, која је имала као резултат укупну серопреваленцију од 28,9%, код крмача 40,9%, док је код товљеника износила 15,2% (Klun и сар., 2006). Велика разлика у укупној преваленцији произилази из старосне структуре испитаних узорака, тј. чињенице да је у овој студији испитан мањи број излучених крмача у односу на ранију студију, највише због тога што је фокус испитивања био на животињама тржишне тежине које су претежно категорија која се највише коље на кланицама у нашој земљи. У истраживању Klun и сарадника (2011) којим су обухваћене свиње заклане у три кланице на територији Београда, добијени су резултати код којих је показана слична разлика у серопозитивности излучених крмача (30%) у односу на товљенике млађе од 8 месеци (8,3%), док је укупна преваленција износила 9,2%. Недавним истраживањем, спроведеним током 2014. и 2015. године у северном делу Србије (регион АП Војводине), у коме су испитиване свиње тржишне тежине, показана је укупна преваленција од 21,5% (Куруца, 2017). Овако висока преваленција била је одраз испитаног узорка као и момента испитивања, јер се испоставило да је један број узорака потицао са фарме на којој је у тренутку узорковања инфекција паразитом *T. gondii* била детектована код 100% узоркованих животиња (15/15) (а што у поновљеном испитивању већ следеће године није био случај).

Већ је поменуто да преваленција инфекције паразитом *T. gondii* варира између континената, држава, па и унутар самих држава. Глобално су забележене вредности преваленције инфекције у широком опсегу од 0% до 93% (Dubey, 2009b) док се серопреваленција у земљама које се убрајају у највеће произвођаче свиња на свету креће у следећим опсезима: од 19% до 30% у Кини, 16-36,5% у САД, 13-26% у Шпанији и 8-11% у Немачкој (Foroutan и сар., 2019). У Европи, обједињена (*pooled*) серопреваленција из 51 студије из више земаља, којом је обухваћено скоро 60 хиљада узорака, процењена је на 13% (95% CI: 10-15%) (Foroutan и сар., 2019). Одавно је такође познато да преваленција варира између различитих испитиваних популација свиња, између излучених крмача из репродукције у односу на товљенике, као и између свиња које се гаје на фармама које имају имплементиране системе биосигурности у поређењу са свињама које се гаје у слободном узгоју (Dubey, 2009b).

Од земаља у окружењу, истраживање спроведено пре десетак година у Румунији је показало преваленцију од 30,5% код свиња које воде порекло из домаћинстава, код излучених крмача износила 12,4%, док у истој студији није утврђен ниједан позитиван узорак из категорије товљеника од укупно 371 испитаних (Pastiu и сар., 2013). У односу на ово

истраживање, преваленција код излучених крмача је три и по пута виша у овој студији, односно два пута мања код свиња пореклом из домаћинства. Последњи објављени подаци о токсоплазмози код свиња у Румунији показују да је преваленција код свиња које се чувају у домаћинствима чак 46,8% (Pastiu и сар., 2019), што представља три пута веће присуство паразита него у нашој студији где је износило 15,2% код свиња пореклом из домаћинства. За разлику од истраживања у Румунији и нашој земљи, једно недавно истраживање у Грчкој показало је далеко нижу серопреваленцију од 4,3% (Papatsiros и сар., 2016). Укупна серопреваленција у овом истраживању, међутим, најсличнија је резултатима истраживањима рађеним у Италији, где је код свиња различитих старосних категорија пореклом са Сицилије утврђена преваленција од 16,3% (352/2160), односно 16,1% (155/960) код свиња у централној Италији (Villari и сар., 2009; Veronesi и сар., 2011), као и у Шпанији, где је испитивањем свиња у 10 региона са највећом производњом свиња, серолошки утврђена преваленција од 16,6% (García-Bocanegra и сар., 2010). С друге стране, скорашња истраживања свиња различитих старосних категорија нпр у Француској и Естонији показала су нижу преваленцију од 7% (Djokic и сар., 2016), односно 5,8% (Santoro и сар., 2017).

Ниво специфичних антитела код свиња у овој студији се кретао у опсегу од 1:25 до 1:800, при чему је код чак две трећине (66,2%) испитаног узорка показан низак ниво специфичних антитела од 1:25, 20,6% свиња је било позитивно у титру од 1:50, око 8% свиња у титру од 1:100, титар од 1:200 и 1:400 је био детектован у по 2,2% животиња, док је највиши измерени титар, од 1:800, имала само једна свиња.

Ниво антитела може знатно да варира код природно инфицираних свиња, често се детектују ниски нивои антитела, а уочене варијације могу зависити од више фактора попут времена настанка инфекције, разлика у вируленцији сојева, имунског одговора јединке и разлика у инфективним облицима које су животиње унеле, као и разлика у вируленцији међу сојевима (Dubey, 2009b; Veronesi и сар., 2011). Уколико се упореде резултати са недавним истраживањем у Војводини, у ком је титар од 1:25 и 1:50 био доказан код 65,1% тестираних свиња, а највиши измерени титар износио 1:400 и показан је код само једне свиње (Куруца, 2017), уочиће се велике сличности. Насупрот овоме, високи титрови специфичних антитела од $\geq 1:1600$, који могу да указују на акутну инфекцију, детектовани су код бројних испитиваних свиња у студији из 2006. године (Klun и сар., 2006), у којој је највиши титар био 1:12800. Узрок оваквих разлика у резултатима може се објаснити разликама у узорку, или присуством одређених фактора ризика својствених за поједине фарме. У Шпанији, низак ниво титра од 1:25 је утврђен код 53,7% серопозитивних излучених крмача, док је код товљеника титар од 1:25 утврђен код 68,6% јединки, односно код 58,3% свих испитиваних свиња (García-Bocanegra и сар., 2010), што су вредности веома сличне резултатима добијеним у представљеној студији.

6.2. Фактори ризика за инфекцију свиња паразитом *T. gondii*

Иако неке фарме нису доставиле попуњене анкете за проверу биосигурности на истим, анализа фактора ризика за инфекцију је урађена на основу познатих информација из базе података кланица као и Управе за ветерину МПШВ. Анализа фактора ризика је показала да је ризик од инфекције паразитом *T. gondii* био више од четири пута већи код излучених крмача него код товљеника. Овај фактор ризика је потврђен и многим студијама до сада, како у Србији (Klun и сар., 2006; Klun и сар., 2011), тако и у другим државама попут Данске, Француске, Шпаније и Пољске. У недавно спроведеној студији у Данској вршено је поређење између

товљеника и излучених крмача са конвенционалних фарми, где је потврђено присуство инфекције код 1,9% товљеника и 19,2% излучених крмача (Olsen и сар., 2020). Резултати наше студије су упоредиви са још једним истраживањем такође спроведеним у Данској, са преваленцијом код товљеника од 3,1%, односно 33,7% код излучених крмача (Kofoed и сар., 2017). У истраживању спроведеном у Шпанији је такође утврђена виша преваленција (24,2%) код излучених крмача у односу на товљенике (9,7%) (García-Bocanegra и сар., 2010). Попут наведених, и најновија истраживања у Пољској су потврдила присуство инфекције код 43,7% свиња старијих од 9 месеци (Puchalska и сар., 2022). Мета анализа осам студија које су се бавиле анализом овог фактора показала је преваленцију паразита *T. gondii* код свиња старијих од годину дана од 18%, док је за свиње млађе од дванаест месеци обједињена преваленција износила 12% (Foroutan и сар., 2019).

Контрола глодара представља свакако један од главних фактора ризика за трансмисију токсоплазмозе. Тражећи разлог за преваленцију паразита код излучених крмача од 34% у интензивној производњи унедавном истраживању које је спроведено у Данској, испитано је 137 мишева који су ухваћени замкама на 32 фарме. Резултати су показали укупну преваленцију од 8% код мишева, док је ако се узме фарма као јединица анализе, 11% фарми било позитивно, што је само потврдило да је успешна контрола глодара једна од главних баријера за инфекцију свиња *T. gondii* (Nielsen и сар., 2019). Генерално, преваленција инфекције паразитом *T. gondii* код свиња у интензивном узгоју је углавном ниска, чему је разлог строго контролисање услова на фарми и спровођење високих хигијенских стандарда, где свакако спадају и превентивне мере ради спречавања контакта свиња са глодарима и мачкама (Papatsiros и сар., 2021).

У овом истраживању, имплементирање контроле глодара на фармама од стране професионалних служби за сузбијање глодара имало је за резултат најнижу преваленцију на тим фармама. Овај резултат се свакако слаже са студијама које су показале нижу преваленцију токсоплазмозе код свиња у случају када се спроводи контрола глодара (Papatsiros и сар., 2016). Насупрот овоме, утицај самосталног спровођења контроле глодара у комбинацији са професионалним као фактора ризика који се у нашем истраживању испоставио као најнеповољнији начин контроле глодара разликује се од других студија у којима је одсуство контроле глодара било један од главних фактора ризика за инфекцију (Villari et. al., 2009, García-Bocanegra и сар., 2010). Овај неочекивани резултат се може објаснити нестручном самосталном применом препарата за дератизацију (без праћења и придржавања упутства произвођача).

Фарме које су пријавиле да не спроводе организовану дератизацију често су пријављивале употребу мачака као вид заштите од глодара. Овакви одговори су углавном долазили од малих произвођача са сеоских домаћинстава, чије су свиње уобичајено долазиле на кланицу преко откупљивача стоке. Поред тога што је истраживањима утврђено да свиње гајене на малим фармама у екстензивној производњи имају чак 4,5 пута већу вероватноћу да буду инфициране, показано је и да присуство мачака на фармама представља 2,6 пута већи ризик од инфекције *T. gondii* у односу на фарме на којима их нема (Assadi-Rad и сар., 1995).

Имајући у виду да су у овој студији узорци узети од свиња пореклом из свих региона у земљи, може се слободно рећи да је токсоплазмоза код свиња присутна на територији целе земље, у мањем или већем обиму. Добијени резултати дају и процену распрострањености паразита на фармама свиња по регионима. Досадашњим истраживањима је потврђено да постоје разлике у инфекцији свиња токсоплазмозом по регионима у истој држави (Tenter и сар., 2000; Dubey и Jones, 2008; García-Bocanegra и сар., 2010). Наше истраживање је показало да су свиње из два региона, западне Србије као и централне и југоисточне Србије, под

повишеним ризиком од инфекције *T. gondii*. Ризик за свиње гајене у западној Србији као изразито брдско-планинском пределу је чак више од четири пута виши од ризика за оне гајене у северном делу земље. Овакав резултат није јединствен, напротив, истраживањем на територији Грчке је утврђено да статистички значајно веће шансе за инфекцију паразитом *T. gondii* имају свиње гајене у планинским деловима у односу на равничарске пределе земље (Papatsiros и сар., 2016). За свиње гајене у централној и југоисточној Србији, која је по рељефној структури такође брдски односно брдско-планински регион, показан је више од два пута виши ризик од инфекције у односу на север земље. Објашњење за ове налазе се може тражити и у разликама у начину узгоја свиња, с обзиром на то да су у брдским регионима углавном заступљене мање фарме и домаћинства са слабо имплементираним биосигурносним мерама, а знатно је мање великих интензивних фарми у односу на северни регион. Наиме, у Војводини се свиње углавном гаје на фармама са интензивним системом гајења где су имплементиране биосигурносне мере. Да су мање фарме/пољопривредна газдинства под значајно вишим ризиком од инфекције *T. gondii* код свиња, у односу на велике фарме показано је и у другим истраживањима (Sroka и сар., 2020). Узорци који потичу из подручја Града Београда су такође пореклом са високо индустријализованих фарми, па је стога и ризик од инфекције нижи у поређењу са западним и централним и југоисточним деловима земље. Интересантно је да претходна студија из Србије није показала регионалне разлике у серопреваленцији одн. повећан ризик за свиње из западног и централно-југоисточног региона (Klun и сар., 2006), будући да се свиње првенствено узгајају у затвореном простору и да је контакт са животном средином индиректан, преко сточне хране и воде.

Као што је и раније поменуто, серопреваленција инфекције *T. gondii* код крмача била је константно виша него код товљеника, такође и у посебној анализи која је у обзир узела само резултате са фарми које су дале све одговоре на питања о биолошкој безбедности. У овом делу истраживања више од 14 пута већу вероватноћу да буду инфициране су имале крмаче у односу на товљенике. Старост свиња је већ доказани фактор ризика за инфекцију (Villari и сар., 2009; Klun и сар. 2011; Slany и сар., 2016), али се процењене висине ризика увелико разликују. Тако је у Данској утврђено да је ризик од инфекције паразитом *T. gondii* већи код излучених крмача 22 пута у односу на товљенике (Olsen и сар., 2020). Анализом више фактора ризика за инфекцију крмача у Француској такође је показано да је ризик од инфекције скоро пет пута већи него за товљенике (Djokic и сар., 2016). Као и у Француској, истраживање спроведено у Шпанији је показало скоро три пута виши ризик код излучених крмача у односу на товљенике (García-Vosapnegra и сар., 2010). Виша серопреваленција код крмача у односу на товљенике на конвенционалним фармама може се свакако делимично приписати дужем временском периоду изложености инфекцији (Kofoed и сар., 2017), односно дужем периоду изложености инфицираним мачкама и глодарима (Nielsen и сар., 2019).

Иако се показало да је и само присуство живине фактор ризика за инфекцију свиња (Villari и сар., 2009), узгој више врста се генерално сматра једним од показатеља да се на некој фарми/домаћинству спроводи полуинтензивна производња са свим својим специфичностима (Stelzer at al., 2019), док се у нашој земљи чак може сматрати и индикатором веома заступљеног екстензивног гајења животиња. Гајење у мање интензивној производњи само по себи представља фактор ризика за повећано присуство паразита *T. gondii*. Сходно овим тврдњама, и резултати истраживања у Перуу показују да су свиње које се гаје у интензивној производњи мање изложене инфекцији паразитом *T. gondii* (18,5%) у односу на свиње које се гаје у полуинтензивним системима производње (48,5%) (de Sousa и сар., 2014). Такође, чињеница да се на фарми гаје друге врсте или да је омогућен контакт свиња и других врста животиња, карактеристика је полуинтензивног односно екстензивног начина гајења; за услове који владају на оваквим фармама већ је показано да повећавају ризик од настанка инфекције.

С друге стране, присуство и гајење других животињских врста на фармама свиња може имати и директан утицај на ризик од инфекције, јер те друге животиње могу представљати и резервоар инфекције (Stelzer et al., 2019).

Поједини истраживачи чак наводе серопозитивност на *T. gondii* као један од главних индикатора хигијенског статуса фарме свиња (Damriyasa et al., 2004). Примена строжих санитарних процедура на фармама свиња може допринети смањењу преваленције инфекције *T. gondii* (Gazzonis et al., 2018), а показано је да је кључна исправна примена биосигурносних мера. Режији чишћења, поштовање хигијенских процедура и правилно примењена дезинфекција на фармама могу имати важну протективну улогу; сам поступак чишћења смањује контаминацију објекта ооцистама, а с друге стране смањује изложеност прелазних домаћина паразиту, на првом месту глодара који могу да заразе свиње. Постоји јасна корелација између високог хигијенског статуса и правилног спровођења режима чишћења, хигијенских процедура и дезинфекције са нижим ризиком за инфекцију паразитом *T. gondii* (Stelzer et al., 2019). Међутим, у нашем истраживању је добијен супротан резултат тј. управо се присуство дезинфекционих баријера испред сваког објекта на фарми показало као фактор ризика. Овај наизглед парадоксални резултат се може објаснити тиме да иако је већина посећених фарми, где је рађена детаљна анкета за проверу биосигурности, имала дезинфекционе баријере испред сваког објекта на фарми, те дезинфекционе баријере су углавном биле празне, без дезинфекционог средства и као такве нису ни могле да имају протективни ефекат.

Ризик од инфекције био је четири и по пута виши за свиње на фармама где се вршио само тов (углавном на мањим фармама/домаћинствима) у односу на фарме где је затворен систем производње од репродукције до завршног това. Такви резултати су добијени у више ранијих студија (Klun et al., 2006; Villari et al., 2009; Veronesi et al., 2011), што је разумљиво с обзиром на то да је на фармама затвореног типа присутна обавезна контрола услова гајења и боља произвођачка пракса; такође, на повишени ризик на малим фармама за тов свакако утиче и увођење већ инфицираних свиња на фарму.

Нажалост, нису идентификовани фактори ризика за инфекцију *T. gondii* на нивоу фарме као јединице анализе, и то ни на укупном узорку од 825 свиња, нити на подузорку од 581 свиње. Могуће објашњење би могло бити то да је на већини фарми детектована макар једна серопозитивна јединка, које су отуда класификоване као позитивне, а да са широким спектром избора за сваку варијаблу снага повезаности једноставно није била довољна да се покаже у регресионој једначини. Интересантно је да су посматрано према старосној категорији, фарме са којих су потицале излучене крмаче имале преваленцију од 100%, а фарме где су гајени товљеници 60,4%, док је посматрано на укупан број фарми са којих су животиње потицале преваленција износила скоро 2/3 односно 61,8%. Од укупно 55 фарми са попуњеним упитницима 34 је имало најмање једну позитивну свињу. Сви ови подаци свакако указују, а нарочито удео од 100% позитивних фарми са којих потичу крмаче, на широку распрострањеност паразита *T. gondii* код свиња на територији Србије. И истраживања у другим европским земљама показују високу стопу инфекције на нивоу фарме; тако је на пример једно истраживање спроведено у Шпанији које је обухватило 100 фарми показало преваленцију од 85% (95% CI: 78–92), а преваленција унутар самих фарми се кретала од 2,9% па до чак 92,8% (García-Vocanegra et al., 2010). За разлику од Шпаније, истраживање спроведено у Италији на чак 274 фарми, показало је да је на мање од половине испитаних фарми (42,3%) било инфицираних јединки (Villari et al., 2009).

6.3. Успех изолатије и генотипизација

Молекуларна епидемиологија *T. gondii* као узрочника потенцијално озбиљних клиничких ентитета у осетљивим категоријама популације као што су фетус и имуносупримиране особе, директно је условљена сложеност популационе структуре паразита. Стога је од великог значаја одређивање генотипа сваког изолованог соја присутног у изворима хране односно месо које конзумирају људи на одређеној територији. Такође, глобализација промета меса може имати утицај и представља ризик за ширење одређених сојева у пределима (земљама, континентима) у којима раније нису постојали, и на тај начин довести до промена у популационо-генетичкој структури и диверзитету *T. gondii*. У овом истраживању извршена је генотипизација изолата добијених из шест узорака свиња, у којима је доказано присуство вијабилних циста и/или паразитске ДНК. Показано је да свих шест узорака припадају генотипу лозе II.

У досадашњим истраживањима у Србији утврђено је да су, као што је и уобичајено у Европи, најзаступљенији клонски типови II и III; у недавно спроведеном првом таквом истраживању овог типа код свиња је потврђено предоминантно присуство клонског типа II код 7/9 изолата, док је клонски тип III потврђен код 2/9 изолата (Куруца, 2017; Kurusa и сар., 2019). Како је и код свиња гајених на територији Румуније изолован једино клонски тип II, (Paștiu, 2019), можемо рећи да је код свиња у нашем региону предоминантан клонски тип II. Док је код иберијских свиња на територији Шпаније поред клонског типа II, чешће потврђено присуство клонског типа III (Fernández-Escobar и сар, 2020), у недавном истраживању у Пољској такође је код свиња утврђено предоминантно присуство клонског типа II, али уз присуство клонског типа I (Sroka и сар, 2020).

6.4. Анализа ризика за јавно здравље у Србији

Процена ризика за потрошаче може се индиректно извести из укупне серопреваленције инфекције код свиња и из успешности изолатије вијабилних паразита из јестивих органа свиња. Према подацима, у Србији се годишње закоље око 2,2 милиона свиња (тачније 2 219 000 у 2019. години) (РЗС, 2020). На основу укупне преваленције инфекције свиња од 16,5% показане у овој студији, а познато је да се годишње закоље око 2,2 милиона свиња, може се проценити да се годишње у Србији закоље око 360.000 серопозитивних свиња. Успешност изолатије из срца свиња као јестивог органа је износила 22,6%, што би значило да од око 360 000 серопозитивних свиња скоро 80 000 трупова свиња носи вијабилне паразите *T. gondii*. Процењено је да месо једне свиње конзумира између 300-400 људи (Kijlstra и сар., 2004), односно, да се од 50 килограма меса свиња произведе преко 300 порција obroka (Jones и Dubey, 2012); обе ове процене указују на то да се чак и ниска преваленција *T. gondii* мора сматрати индикацијом за ризик по безбедност хране. Овај ризик је утолико већи с обзиром на чињеницу да се месо свиња најчешће меша са месом других врста животиња у различитим размерама ради добијања производа од меса (Aspinall и сар., 2002), што повећава број потенцијално контаминираних порција пореклом од инфициране јединке. Ради подизања свести о постојању и висини поменутог ризика као и евентуалног повећања могућности за превентивно деловање, Dubey је изјавио да би се сви јестиви делови серопозитивних свиња морали сматрати заразним (Dubey, 1986).

Рачунато према просечној тежини закланих свиња у Србији која је у 2019. години износила 102 килограма, односно 78 килограма нето масе трупа (РЗС, 2020), то представља количину сировине за прављење најмање 300 до 400 obroka. Као што је раније поменуто, скоро 80 000 трупова носи вијабилне паразите, што помножено бројем obroka који могу да се направе од те количине mesa, даје број од 50 милиона obroka који су потенцијално ризични за инфекцију људи паразитом *T. gondii*, а самим тим и по јавно здравље у Србији.

Наведени подаци представљају и податке од значаја за јавно здравље, јер сугеришу да свиње произведене за људску исхрану у Србији представљају важан извор контаминације са великим потенцијалом за преношење. Мада је у овом истраживању примењена директна детекција паразита у ткиву срца, и да се у више студија показало да се ткивне цисте чешће могу открити у неким органима који су истовремено и доступнији прегледу пост мортем (као што су мозак, језик, срце и дијафрагма – тзв. предилекциони органи) (Edelhofer, 1994; Dubey и сар., 2005; Dos Santos и сар., 2005), треба имати у виду да је налаз циста *T. gondii* могућ у било ком ткиву, што подразумева и сва јестива ткива (Hill и Dubey, 2002). У прилог наведеној анализи ризика иде и податак о предоминантности клонског типа II *T. gondii* код људи, као и код свиња на територији Србије. На јавноздравствени ризик од конзумације *T. gondii* путем контаминираног свињског mesa, указују и резултати најновијег епидемиолошког истраживања којим је на узорку од 1095 здравих особа (давалаца крви), утврђена серопреваленција од 20,5% (Stopić и сар., 2022). Иако резултат представља најнижу преваленцију токсоплазмозе у здравој популацији још од првих истраживања из 1969. године од кад се у нашој земљи систематски прати (Šibalić и сар., 1969), значајно је што се од укупног броја серолошки позитивних особа скоро две трећине (65,2%) изјаснило да конзумира сирово/НТО месо (Stopić и сар., 2022).

6.5. Превентивне мере против ширења *T. gondii* – интервенције на нивоу фарме

Производња хране „од фарме до виљушке“ је описана као ланац активности који се спроводи од примарне производње („фарма“) до крајњег потрошача („виљушка“). Приступ „од фарме до виљушке“ подржава и Европска агенција за безбедност хране, која је предложила програм епидемиолошког надзора који укључује контролу биолошких опасности, серолошки скрининг живих свиња, ревизију фактора ризика и превентивне стратегије на нивоу фарме у примарној производњи. Имплементација оваквог система надзора могла би довести до нове генерације инспекције mesa, засноване на коришћењу серолошких података из скрининга, као и података о биосигурности на фармама. Очекује се да се применом предложеног система пре свега идентификују фарме на којима би се због незадовољавајућих резултата вршио појачани надзор. Успех оваквог приступа би се мерио снижењем присуства паразита *T. gondii* у ланцу снабдевања храном (EFSA, 2011; EFSA, 2012).

Тренутно, једини активан програм надзора над *T. gondii* у Европској унији спроводи компанија за производњу хране у Холандији која поседује пет кланица, а учествује у укупном броју свих закланих свиња у тој земљи са уделом од око 50%. Критеријуми за број узоркованих свиња засновани су на систему праћења *Mycobacterium avium* код свиња (Hiller и сар., 2013). Укратко, нови добављачи се стављају на режим прегледа два узорка при свакој испоруци; када је 10 узастопних узорака прикупљено, мења се режим узимања узорака на један узорак при свакој испоруци. Уколико буде позитивних узорака (на нивоу 20-50% позитивности), режим

се мења на узимање шест узорака приликом следеће испоруке, а уколико су сви негативни враћа се на један узорак при свакој испоруци животиња са фарме, уколико опет има позитивних режим се повећава на узимање по шест узорака при свакој испоруци до тренда од 18 негативних узорака у низу. Тестирање узорака у овом програму ограничено је на један до два узорка по серији у стадима ниског ризика и шест узорака у стадима високог ризика (Swanenburg и сар., 2019). Наведени надзор има за циљ контролу добављача као и њихово сврставање у категорије: фарме ниског ризика, фарме средњег ризика и фарме високог ризика. Сам надзор и интервенције на фарми се могу сматрати континуираним, интерактивно прилагодљивим процесом, који може да одговори изазовима у прехранбеној индустрији. Зато је неопходно да се надзор успостави тако да се из њега добије што више информација које омогућавају доношење одлука о интервенцијама тамо где су потребне. Системи надзора засновани на ризику имају предност јер се могу имплементирати тако да дају већи ефекат надзора уз мање трошкове, кроз циљани фокус који је најважнији за индустрију или друштво у целини. Тренутна званична фаза за смањење присуства *T. gondii* је процена колико је велики ризик и које интервенције су потребне, за шта је потребна сарадња са субјектима у пословању храном, потрошачима, невладиним организацијама и другим организацијама које су укључене у систем производње хране где сви требају да размотре заједничке интересе, да међусобно деле податке и на крају да сви делују заједно (Alban и сар., 2020).

Пошто је ризик од инфекције свиња паразитом *T. gondii* директно повезан са условима гајења на фарми, неопходно је имплементирати услове гајења засноване на ризику од биолошких опасности. Присуство паразита је вероватније уколико је ниво хигијене на фармама низак (Puchalska и сар., 2022). Постоји већа вероватноћа да ће мање фарме или системи производње имати лошије хигијенске услове, који омогућавају већу изложеност животиња инфективним облицима паразита присутним у земљишту, води и храни, и тиме за последицу имати виши ниво присуства паразита *T. gondii* код животиња (Herrero и сар., 2016, Djokić и сар., 2016).

Генерално, програм биосигурности на фармама треба да укључи низ превентивних мера које би имале утицај на смањење инфекције паразитом *T. gondii*. Пре свега тежиште треба ставити на правилно спровођење контроле глодара, на коришћење затвореног типа гајења животиња којим би био онемогућен приступ мачкама, као и на одлагање уинулих животиња на прописан начин (Jones and Dubey, 2012; Robert-Gangneux and Dardé, 2012; Opsteegh и сар., 2016).

Као што је раније наведено, присуство овог паразита представља индикатор квалитета хигијенских услова на фарми. Зато је неопходно да се режим чишћења, хигијенске процедуре и комплетна дезинфекција на фарми спроводе према прописаним стандардима. Доказано је да је спровођење хигијенских процедура и одржавање фарме на високом хигијенском нивоу директно повезано са заштитним ефектом (Stelzer и сар., 2019). На фармама са отвореним системом држања животиња, чак и уколико би се спровеле све наведене хигијенске мере вероватно се преваленција не би значајно смањила. Међутим, ниво затворености фарме исто тако неће имати протективни ефекат уколико се сточна храна и додаци сточној храни чувају на местима којима имају приступ мачке, глодари или друге врсте животиња (Stelzer и сар., 2019).

6.6. Превентивне мере против ширења *T. gondii* - интервенције на нивоу кланице и прераде меса

Превенција инфекције паразитом *T. gondii* путем хране укључује неколико предложених мера предострожности за добру хигијенску праксу током обраде меса, као и термичку обраду меса (Jones и Dubey, 2012; Hill и Dubey, 2013; Hussain и сар., 2017). Радници који раде са храном као и потрошачи (фармери, продавци, месари, људи који припремају и кувају храну од меса свиња) и сви који су директно или индиректно укључени у производњу, припрему, прераду и дистрибуцију хране се у већини случајева сматрају најодговорнијим за ширење токсоплазмозе. Из тог разлога, правилна примена одговарајућих хигијенских процедура у фази производње и прераде хране представља критичну тачку у превенцији токсоплазмозе (Jones и сар., 2003; Mirza Alizadeh и сар., 2018). Генерално, производи од свињског меса представљају нижи ризик за потрошача од свежег свињског меса. Оптерећење мишића цистама *T. gondii* се континуирано показује као ниско. Међутим, нова, осетљивија PCR метода која користи технологију тзв. магнетне хватаљке (MC) за екстраховану ДНК, има могућност да везује мале количине ДНК *T. gondii* присутне у великој количини мишићног ткива (Opsteegh и сар., 2010). MC-qPCR метода је нашла примену код меса оваца и у пилећем месу од стране Schares и сар. (2018), а затим је унапређена и за дијагностику у месу свиња (Gisbert Algaba и сар., 2017) и валидирана према ISO 17025 стандарду; као метода обећава да замени биолошке огледе на експерименталним животињама, показујући једнаку осетљивост у откривању и квантификавању веома малог броја паразита у мишићном ткиву (на нивоу детекције једне ткивне цисте у 100 грама мишићног ткива) (Gisbert Algaba и сар., 2017). Даље усавршавање и развој нових метода детекције је у току, па се тако развија метода ddPCR која обезбеђује апсолутну и директну квантификацију циљане ДНК, са већом осетљивошћу у односу на друге PCR методе, и има бољу поновљивост у односу на qPCR (Mancusi и сар., 2022). Ипак, и поред нових достигнућа у методологији, важно је напоменути да је биолошки оглед на мачкама и мишевима, као једини метод за процену вијабилности ткивних циста, за сада и даље најбољи начин да се правилно процени ризик за потрошаче. Важно је такође прецизно одредити и који органи и комади меса највероватније садрже значајан број ткивних циста и тако представљају највећи ризик за потрошаче. Заправо, цисте *T. gondii* откривене су у већини прегледаних ткива свиња намењених за људску исхрану, укључујући срце, дијафрагму, мозак, јетру, језик, жвакаћи мишић, комерцијалне делове мишића као и у сировој шунки (Cademartori и сар., 2014; Franco-Hernandez и сар., 2016; Hererro и сар., 2016; Hernández-Cortazar и сар., 2016; Куруца и сар., 2017; Vergara и сар., 2018; Miura и сар., 2019; Alves и сар., 2019; Paraboni и сар., 2020), а паразит је чак изолован из крви говњеника (Klun и сар., 2011). Бројна истраживања су показала афинитет *T. gondii* за мозак и срце свиња у односу на остале органе и мишићна ткива (Gisbert Algaba и сар., 2018). Неопходно је извршити додатна истраживања у том правцу и утврдити присутност паразита у најчешћим комерцијалним комадима меса код природно инфицираних животиња. Приликом експерименталног заражавања свиња биолошким огледима на мишевима су испитани комерцијални комади меса, када је *T. gondii* откривена у следећим групама мишића: леђном мишићу, плећи, врату и буту (Alves и сар., 2019). *T. gondii* је биолошким огледима на мишевима откривена у 2/25 узорак свежег меса свиња које је потицало из месара и супермаркета у Шпанији (Bayart и сар., 2012). У сличном истраживању спроведеном у Мексику само је један од 48 узорак свежег бута свиње садржавао вијабилне цисте *T. gondii* (Galvan-Ramirez и сар., 2010). *T. gondii* (вијабилни паразити или ДНК паразита) је такође откривен у 18% узорак свежег свињског меса у Кини (Wang и сар., 2012), у 7% узорак леђног мишића у Мексику (Hernández-Cortazar и сар., 2016) и у 4,2% малопродајних узорак свињског меса у Шкотској (Plaza и сар., 2020). Врло је важно напоменути да је биолошким огледима утврђено да су ткивне цисте у плећи свиње неравномерно распоређене а да су доказане већ након 7 дана од инфекције, што значи да чак и недавно заражене свиње

могу бити извор инфекције за људе (Rani и сар., 2019). За млевено месо је такође утврђено да може да садржи ткивне цисте *T. gondii*, што оије изненађујуће јер се обично састоји од меса са више различитих места на трупу, чиме се повећавају шансе за налаз паразита. Студија у Канади је показала ДНК *T. gondii* у 3,2% од 94 малопродајна узорка уситњеног свињског меса (Iqbal и сар., 2018). У великој студији из Пољске, ДНК *T. gondii* је откривена у 4,5% од 756 узорака млевеног свињског меса у малопродаји и у 5,8% од 1355 узорака сирове кобасице (Sroka и сар., 2019). У једној бразилској студији ДНК *T. gondii* је доказана у скоро половини свих испитаних узорака сирових свињских кобасица (Costa и сар., 2018). Сирова домаћа свињска кобасица позитивна на *T. gondii* повезана је са случајем акутне симптоматске токсоплазмозе у Италији (Vitale и сар., 2014). Сирова кобасица испитивана је и код експериментално заражених свиња, чије је месо потом коришћено за прављење свежих кобасица којима су храњени мишеви током различитог периода зрења кобасица. ДНК паразита је откривена код 4/288 мишева, што имплицира да свеже кобасице могу бити извор инфекције за потрошаче (Abdulmawjood и сар., 2014). Како је постало све популарније, на тржишту се све више дистрибуира месо одлежало у вакууму. Током процеса зрења, месо омекша, његове сензорне особине се побољшавају, чиме се повећава његова привлачност за купца и тиме тржишна вредност. Недавно спроведеним истраживањем о утицају процеса зрења у вакууму је утврђено да је период од 14 дана недовољан за инактивисање ткивних циста, док се након 21 и 28 дана зрења оне успешно инактивишу. Аутори овог истраживања су дали препоруку од 21 дан зрења за примену у месној индустрији (Alves и сар., 2020).

Имајући у виду наведене податке и уколико би се вршио мониторинг за добављаче/фармере на основу ког би се извршила категоризација на фарме малог, средњег и високог ризика за инфекцију *T. gondii*, таква категоризација фарми би касније одредила ниво прераде меса, где би се месо пореклом са фарми високог ризика прерадило методама (сољење, замрзавање на -12 °C, топло димљење, дуготрајна ферментација, термичка обрада меса температуром изнад 67 °C, зрачење, висок хидростатички притисак) које имају за циљ смањење броја циста или њихово инактивисање у месу (Mie и сар., 2008; Ware и сар., 2010; Guo и сар., 2015; Mirza Alizadeh и сар., 2018). Међутим, недавним истраживањем замрзавања меса и то свежег бута и суве шунке пореклом од експериментално заражених свиња на температури од -20 °C током 7 и 14 дана, није успело инактивисање ткивних циста *T. gondii*, тј. замрзавање се није показало као фактор смањења ризика од инфекције (Gracia и сар., 2022). Неопходно је прецизније утврдити тачну температуру и време које је потребно за инактивисање ткивних циста, и у зависности од добијених резултата евентуално прилагодити постојећу препоруку о замрзавању ради инактивисања *T. gondii* у сировом и сушеном месу.

Да би храна била безбедна за потрошача, неопходно је спроводити радње и активности за спречавање или уклањање опасности за безбедност хране сходно Codex Alimentarius-у (Codex alimentarius, 2005). Сврха мера контроле које се предузимају у ланцу производње хране је безбедна храна која је погодна за исхрану људи. Такође, и сами потрошачи могу спречити или макар знатно смањити трансмисију *T. gondii* путем хране, придржавајући се упутстава (тзв. пет кључева за безбедну храну) које је прописала Светска здравствена организација, а која обухватају одржавање чистоће, раздвајање сирове од куване хране, потпуну термичку обраду, складиштење хране на одговарајућој температури, и употребу безбедне воде и сировина за припрему хране и оброка (WHO, 2006). На крају, важно је истаћи да је за ефективност превентивних мера кључна њихова доследна примена на свим поменутих нивоима - од фарме, преко кланице и прераде меса, па све до потрошача.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведеног истраживања које је обухватило серолошка, биолошка и молекуларна испитивања инфекције паразитом *T. gondii* код свиња на линији клања као и анализу фактора ризика за инфекцију, уз упоредно испитивање присуства вијабилних паразита у ткиву срца као моделу јестивог органа код излучених крмача, може се закључити следеће:

1. Узоркована је крв од укупно 825 свиња са целе територије Србије чија је заступљеност из појединих епизоотиолошких подручја била пропорционална броју у том подручју гајених свиња.
2. Антитела специфична на *T. gondii* потврђена су код 16,5% испитаних свиња, са нивоом антитела у распону од 1:25 до 1:800. Серопреваленција је статистички била значајно виша код излучених крмача (43,6%) него код товљеника (15,1%).
3. Анализом фактора ризика за инфекцију на узорку од свих 825 испитаних свиња утврђено је да старији узраст свиња и неадекватна контрола глодара независно утичу на присуство инфекције паразитом *T. gondii*.
4. Од фарми (n=55) где је извршено анкетирање о биосигурносим мерама, скоро две трећине (61,8%) је било позитивно. Позитивне су биле све (100%) фарме порекла излучених крмача, а 60,4% фарми на којима су гајени товљеници.
5. Анализом фактора ризика за инфекцију свиња (n=581 узорак) пореклом са фарми на којима је извршено анкетирање о биосигурносим мерама, утврђено је да на инфекцију независан утицај имају старији узраст свиња, гајење и других врста домаћих животиња на фарми, гајење у систему завршног това, као и регион из кога су свиње потицале.
6. Анализом фактора ризика на нивоу фарме показало се да ниједна испитана варијабла није имала утицаја на инфекцију, вероватно због високог процента позитивних фарми.
7. Докази о вијабилној *T. gondii* у инокулисаном материјалу откривени су у укупно 41,9% (13/31) биолошких огледа; ткивне цисте у мозгу мишева детектоване су у 22,6% случајева, а на основу серолошког испитивања мишева огледи су били позитивни у 29%, док су према присуству ДНК *T. gondii* у мозгу мишева били позитивни у 35,5% случајева.
8. Генотип *T. gondii* је било могуће одредити код укупно шест изолата. Свих шест изолата су на основу методе анализе полиморфизама дужине фрагмената добијених деловањем рестрикционих ензима на Mn-PCR продукте, идентификовани као генотипови лозе II.

На крају, општи закључак овог истраживања је да би, с обзиром на то да је преваленција инфекције паразитом *T. gondii* код свиња сугерисана као погодан индикатор ризика за инфекцију људи услед конзумирања меса свиња које садржи цисте овог паразита, мониторинг присуства *T. gondii* код свиња и поштовање протективних мера које су укључене у биосигурност на фармама могли бити добар почетак за смањење ризика за потрошаче. Мере које треба да се имплементирају на нивоу фарме у Србији, како је показало ово истраживање, неопходно је да обухватају спровођење контроле глодара од стране професионалних служби, дезинфекцију обуће на улазу у сваки објект на фарми, избегавање гајења различитих врсти животиња на фарми као и подизање нивоа биосигурности на малим фармама које врше тов свиња до постизања кланичне тежине.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdulmawjood, A., Rosa, S., Taubert, A., Bauer, C., Failing, K., Zahner, H., Bülte, M. (2014). Investigation of persistence of infectious *Toxoplasma gondii* in raw sausages using in-house developed and validated real time-PCR. *Meat Science*. 97(4), 542-547. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.03.008>.
2. Alban, L., Häsler, B., van Schaik, G., Ruegg, S. (2020). Risk-based surveillance for meat-borne parasites. *Experimental Parasitology*. 208, 107808.
3. Alves, B. F., Gennari, S. M., Oliveira, S., Soares, H. S., Conte-Junior, C. A., Dubey, J. P., Amaku, M., Jesus Pena, H. F. (2020). The impact of dry ageing vacuum-packed pork on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Food Microbiology*. 86:103331. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103331>
4. Alves, B. F., Oliveira, S., Soares, H. S., Pena, H. F. J., Conte-Junior, C. A., Gennari, S. M. (2019). Isolation of viable *Toxoplasma gondii* from organs and Brazilian commercial meat cuts of experimentally infected pigs. *Parasitology Research*. 118(4), 1331-1335.
5. Ardoin, P., Couzineau, P., Baufine-Ducrocq, H. (1967). Sur l'utilisation du sarcome T.G. 180 pour l'obtention d'une suspension riche en *Toxoplasma gondii* extracellulaires. *C. R. Soc. Biol.* 161, 117-119.
6. Aspinall, T. V., Marlee, D., Hyde, J. E. and Sims, P. F. (2002). Prevalence of *Toxoplasma gondii* in commercial meat products as monitored by polymerase chain reaction—food for thought? *International journal for parasitology*, 32(9), pp.1193-1199.
7. Assadi-Rad, A. M., New, J. C., Patton, S. (1995). Risk factors associated with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. *Veterinary parasitology*. 57:289–97.
8. Santoro, A., Tagel, M., Must, K., Laine, M., Lassen, B., Jokelainen, P. (2017). *Toxoplasma gondii* seroprevalence in breeding pigs in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 59:82.
9. Batz, M. B., Hoffmann, S., Morris, J. G. (2012). Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *Journal of Food Protection*. 75:1278–1291.
10. Bayarri, S., Gracia, M. J., Pérez-Arquillué, C., Lázaro, R., Herrera A. (2012). *Toxoplasma gondii* in commercially available pork meat and cured ham: a contribution to risk assessment for consumers. *Journal of Food Protection*. 75(3), 597-600.
11. Bobić, B., Jevremović, I., Marinković, J., Šibalić, D., Djurković-Djaković, O. (1998). Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *European Journal of Epidemiology*. 14(6), 605-610.
12. Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I., Djurković-Djaković, O. (2011). Kinetics of *Toxoplasma* infection in the Balkans. *Wien Klin Wochenschr* 123: 2-6.
13. Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., Boothroyd, J. C. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 27, 8: 1787-1792.
14. Cademartori, B. G., Santos, L. M. J. F., Oliveira, F. C., Quevedo, P., Oliveira, P. A., Ramos, T. S., Rocha, A. S. R., Ruas, J. L., Farias, N. A. R. (2014). Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Veterinary parasitology*. 203(1-2), 207-211.
15. Codex alimentarius. (2005). CAC/RCP58 Code of Hygienic Practice for Meat.
16. Cook, A. J., Gilbert, R., Buffolano, W., Zufferey, J., Petersen, E., Jenum, P. A., Foulon, W., Semprini, A. E. and Dunn, D. T. (2000). *British Medical Journal*. 321 (7254) 142–7.

17. Cornelissen, J. B., van der Giessen, J. W., Takumi, K., Teunis, P. F., & Wisselink, H. J. (2014). An experimental *Toxoplasma gondii* dose response challenge model to study therapeutic or vaccine efficacy in cats. *PLoS one*. 9(9), e104740.
18. Costa, D. F., Fowler, F., Silveira, C., Junqueira Nóbrega, M., Junqueira Nobrega, H. A., Nascimento, H., Rizzo, L. V., Commodaro, A. G., Belfort, R. (2018). Prevalence of *Toxoplasma gondii* DNA in processed pork meat. *Foodborne Pathogens and Disease*. 15(11):734-736. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2438>
19. Damriyasa, I. M., Bauer, C., Edelhofer, R., Failing, K., Lind, P., Petersen, E., Schares, G., Tenter, A.M., Volmer, R. and Zahner, H. (2004). Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Veterinary parasitology*. 126(3), 271-286.
20. Davies, P.R. (2011). Intensive swine production and pork safety. *Foodborne Pathogens and disease*. 8, 189–201.
21. de Sousa, R.A., Lemos Jda, F., Farias, L.A., Lopes, C.D., dos Santos, K.R. (2014). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pigs in southern Piauí. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 23, 98–100.
22. Desmonts, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., Lelong, M. (1965). Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev Fr Étud Clin Biol*. 10:952–8.
23. Desmonts, G., Daffos, F., Forestier, F., Capella-Pavlovsky, M., Thulliez, P., Chartier, M. (1985). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1, 8427: 500504.
24. Desmonts, G., Remington, J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*. 11, 6: 562- 568.
25. Djokic, V., Blaga, R., Aubert, D., Durand, B., Perret, C., Geers, R., Ducry, T., Vallee, I., Djurkovic Djakovic, O., Mzabi, A., Villenar I., Boireau, P. (2016). *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology*. 143(5), 557-567.
26. Djurković-Djaković O, Bobić B, Nikolić A, Vuković D. (1996). Murine susceptibility to acute *Toxoplasma gondii* infection. *Archives of Biological Sciences*. 48, 1-2, 31-35.
27. Djurković-Djaković O. (1998). Toxoplasmosis and immunosuppression. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*. 126 (5-6), 197-203.
28. Djurković-Djaković, O. (2004). Toksoplazmoza: problem i za 21. vek? U: O. Djurković-Djaković (ured.) Toksoplazmoza u humano i veterinarskoj medicini, Institut za zdravlje Crne Gore i Društvo mikrobiologa Crne Gore, Podgorica. *Zbornik radova Seminara*, 14.10.2003., str: 7-29.
29. Djurković-Djaković, O., Klun, I., Khan, A., Nikolić, A., Knežević-Ušaj, S., Bobić, B., Sibley, L.D. (2006). A human origin type II strain of *Toxoplasma gondii* causing severe encephalitis in mice. *Microbes and infection*. 8, 2206–2212.
30. Djurković-Djaković, O., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Aleksić, A., (2005). Stage conversion of *Toxoplasma gondii* RH parasites in mice by treatment with atovaquone and pyrrolidine dithiocarbamate. *Microbes and infection*. 7, 49-54.
31. Dos Santos, C. B. A., De Carvalho, A. C. F. B., Ragozo, A. M., Soares, R. M., Amaku, M., Yai, L. E. O., Dubey, J. P., Gennari, S. M. (2005). First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary parasitology*. 131, 207–211.
32. Dubey, J. P., Desmonts, G. (1987). Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine veterinary journal*. 19, 337-339.
33. Dubey J, (2010). Toxoplasmosis of Animals and Humans. CRC Press, Boca Raton, FL. 336 pp.
34. Dubey J.P. (2009b). Toxoplasmosis in pigs- The last 20 years. *Veterinary Parasitology*. 164, 89-103.

35. Dubey, J. P. (1977). Persistence of *Toxoplasma gondii* in the tissues of chronically infected cats. *Journal of Parasitology*. 63(1), 156-157.
36. Dubey, J. P. (1997). Tissue cyst tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cyst formation in organs of cats, and rodents fed oocysts. *Parasitology*. 115(1), 15-20.
37. Dubey, J. P. (1998). Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*. 28, 1019 –1024.
38. Dubey, J. P. (1986). A review of toxoplasmosis in pigs. *Veterinary parasitology*. 19,181–223.
39. Dubey, J. P., and Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International journal for parasitology*. 38(11), 1257-1278.
40. Dubey, J. P., Speer, C. A., Fayer, R. (1989). *Sarcocystosis of animals and man*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla
41. Dubey, J. P. (1995). Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *The Journal of parasitology*, pp.410-415.
42. Dubey, J. P., Hill, D. E., Jones, J. L., Hightower, A. W., Kirkland, E., Roberts, J. M., Marcet, L. P., Lehmann, T., Vianna, M. C. B., Miska, K., Sreekumar, C., Kwok, O. C. H., Shen, S. K., Gamble, H. R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *Journal of Parasitology*. 91(5), 1082-1093.
43. Dubey, J. P. (2009a). *Toxoplasmosis of Animal and Humans*, Second Edition, ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
44. Dubey, J. P., Hill, D. E., Rozeboom, D.W., Rajendran, C., Choudhary, S., Ferreira, L.R., Kwok, O.C.H., Su, C. (2012). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary parasitology*. 188, 14-18.
45. Ecolab-Ecosure. Cold temperature report. (2007). Available at: <http://foodrisk.org/exclusives/ecosure/> Accessed February 14, 2020.
46. Edelhofer, R. (1994). Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitology Research*. 80, 642–644.
47. EFSA. (2007). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from EFSA on surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *EFSA Journal*. 583:1–64.
48. EFSA. (2018). Public health risks associated with food-borne parasites. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*. 16(12):5495
49. EFSA. (2011). Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for public health hazards to be covered by meat inspection of swine. *EFSA Journal*. 9:2371. [Crossref](#), [Google Scholar](#)
50. EFSA. (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. 10:2597. [Google Scholar](#)
51. EFSA. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 15, 12: 5077
52. European Commission. Pigmeat Statistics. (2022). Available online: https://agridata.ec.europa.eu/Reports/Pigmeat_Dashboard.pdf (accessed on 15 March 2022)
53. Eurostat (2019). Agricultural production - livestock and meat. Eurostat, statistic-explained. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_livestock_and_meat#Meat_production
54. Eurostat. Statistic Explained. Agricultural Production—Livestock and Meat. Available online: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_livestock_and_meat&oldid=549389 (accessed on 3 April 2022)
55. Farm Biosecurity. Available online: <https://www.farmbiosecurity.com.au/wp-content/uploads/2019/03/Piggery-BiosecurityAudit-Checklist.pdf> (accessed on 5 March 2018).

56. Fernández-Escobar, M., Calero-Bernal, R., Regidor-Cerrillo, J., Vallejo, R., Benavides, J., Collantes-Fernández, E., & Ortega-Mora, L. M. (2020). Isolation, genotyping, and mouse virulence characterization of *Toxoplasma gondii* from free ranging Iberian pigs. *Frontiers in Veterinary Science*. 7, 604782.
57. Foroutan, M., Fakhric, Y., Riahid, M. S., Ebrahimpoure, S., Namroodif, S., Taghipourb, A., Spoting, A., Gamblei, H. R., Rostamie A. (2019). The global seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*. 269, 42–52.
58. Foulon, W., Pinon, J. M., Stray-Pedersen, B., Pollak, A., Lappalainen, M., Decoster, A., ... & Naessens, A. (1999). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: a multicenter evaluation of different diagnostic parameters. *American journal of obstetrics and gynecology*. 181(4), 843-847.
59. Franco-Hernandez, E. N., Acosta, A., Cortés-Vecino, J., Gómez-Marín, J. E. (2016). Survey for *Toxoplasma gondii* by PCR detection in meat for human consumption in Colombia. *Parasitology Research*, 115(2), 691-695.
60. Frenkel, J. K. (1973). *Toxoplasma* in and around us. *Bioscience*. 23(6), 343-352.
61. Fulton, J. D., Turk, J. L. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet* ii, 1068-1069.
62. Fulton, J. D. (1965). Micro-agglutination test for *Toxoplasma* antibodies. *Immunology*. 9, 491-495.
63. Galvan-Ramirez, M. L., Madriz Elisondo, A. L., Rico Torres, C. P., Luna-Pastén, H., Rodríguez Pérez, L. R., Rincón-Sánchez, A. R., Franco, R., Salazar-Montes, A., Correa, D. (2010). Frequency of *Toxoplasma gondii* in pork meat in Ocotlán, Jalisco, Mexico. *Journal of Food Protection*. 73(6), 1121-1123. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.6.1121>
64. García-Bocanegra, I., Simon-Grife, M., Dubey, J. P., Casal, J., Martin, G. E., Cabezon, O., Perea, A., Almeria, S., (2010). Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitology International*. 59, 421–42
65. Gazzonis, A. L., Marangi, M., Villa, L., Ragona, M. E., Olivieri, E., Zanzani, S. A., Giangaspero, A., Manfredi, M. T. (2018). *Toxoplasma gondii* infection and biosecurity levels in fattening pigs and sows: serological and molecular epidemiology in the intensive pig industry (Lombardy, Northern Italy). *Parasitology research*. 117(2), 539-546. doi: 10.1007/s00436-017-5736-z
66. Gisbert Algaba, I., Geerts, M., Jennes, M., Coucke, W., Opsteegh, M., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S. (2017). A more sensitive, efficient and ISO 17025 validated magnetic capture real time PCR method for the detection of archetypal *Toxoplasma gondii* strains in meat. *International journal for parasitology*. 47(13), 875–884.
67. Gisbert Algaba, I., Verhaegen, B., Jennes, M., Rahman, M., Coucke, W., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S. (2018). Pork as a source of transmission of *Toxoplasma gondii* to humans: a parasite burden study in pig tissues after infection with different strains of *Toxoplasma gondii* as a function of time and different parasite stages. *International Journal of Parasitology*. 48(7), 555-560. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.009>.
68. Gracia, M. J., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Bayarri, S. (2022). Effect of Domestic Freezing on the Viability of *Toxoplasma gondii* in Raw and Dry-Cured Ham from Experimentally Infected Pigs. *Journal of Food Protection*. 85(4), 626-631.
69. Guo, M., Dubey, J. P., Hill, D., Buchanan, R. L., Gamble, H., Jones, J. L., Pradhan, A. K. (2015). Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in meat animals and meat products destined for human consumption. *Journal of food protection*. 78(2), 457-476.
70. Havelaar, H. A., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J. et al. (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *Plos Medicine*. DOI:10.1371/journal.pmed.1001923

71. Hernández-Cortazar, I. B., Acosta-Viana, K. Y., Guzmán-Marin, E., Ortega-Pacheco, A., de Jesus Torres-Acosta, J. F., Jimenez-Coello, M. (2016). Presence of *Toxoplasma gondii* in pork intended for human consumption in tropical Southern Mexico. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13(12), 695-699. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2165>.
72. Herrero, L., Gracia, M. J., Perez-Arquillue, C., Lazaro, R., Herrera, M., Herrera, A., Bayarri, S. (2016). *Toxoplasma gondii*: pig seroprevalence, associated risk factors and viability in fresh pork meat. *Veterinary parasitology*. 224, 52–59.
73. Hill, D. and Dubey, J. P. (2002). *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection*, 8(10), pp.634-640.
74. Hill, D. E., & Dubey, J. P. (2013). *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *International journal for parasitology*. 43(2), 107-113.
75. Hiller, A., Oorburg, D., Wisselink, H. J., van Solt-Smits, C. B., Urlings, B., Klein, G., Schulze Althoff, G., Heres, L. (2013). Prevalence of *Mycobacterium avium* in slaughter pigs based on serological monitoring results and bacteriological validation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10, 4027-4038.
76. Howe, D. K., Sibley, L. D. (1995). *Toxoplasma gondii* Comprises of Parasite Three Clonal Lineages: Correlation with Human Disease Genotype. *Journal of infectious diseases*. 172, 1561–1566.
77. Hussain, M. A., Stitt, V., Szabo, E. A., Nelan, B. (2017). *Toxoplasma gondii* in the Food Supply. *Pathogens*. 6 (2), 21.
78. Iqbal, A., Janecko, N., Pollari, F., Dixon, B. (2018). Prevalence and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* DNA in retail fresh meats in Canada. *Food and Waterborne Parasitology*. 13:e00031. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.e00031>.
79. Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Wilson, M. (2003). *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2000. *Emerging infectious diseases*. 9(11), 1371.
80. Jones, J. L. and Dubey, J. P. (2010). Waterborne toxoplasmosis—recent developments. *Experimental parasitology*, 124(1), pp.10-25.
81. Jones, J. L. and Dubey, J. P. (2012). Foodborne toxoplasmosis. *Clinical infectious diseases*, 55(6), pp.845-851.
82. Juan, C. Sepulveda-Ares., Jorge, E. Gomez-Marin., Branko, Borić., Carlos A. Naranjo-Galvis., Olgica, Djurkovic-Djakovic. (2014). *Toxoplasma* as a travel risk. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 12 (6), 592-601.
83. Kellen, A., Ayllon-Leindl, L., Labzoffsky, N. (1962). Indirect fluorescent antibody method in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Canadian Journal of Microbiology*. 8(4), 545-554.
84. Khan, A., Dubey, J. P., Su, C., Ajioka, J. W., Rosenthal, B. M., Sibley, L. D. (2011). Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *International journal for parasitology*. 41, 645–655.
85. Khan, A., Jordan, C., Muccioli, C., Vallochi, A.L., Rizzo, L. V., Belfort, R., et al. (2006). Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 12: 942– 949.
86. Khan, A., Taylor, S., Su, C., Mackey, A. J., Boyle, J., Cole, R., Glover, D., Tang, K., Paulsen, I. T., Berriman, M., Boothroyd, J. C., Pfefferkorn, E. R., Dubey, J. P., Ajioka, J. W., Roos, D. S., Wootton, J. C., Sibley, L. D. (2005). Composite genome map and recombination parameters derived from three archetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. *Nucleic Acids Research*. 33, 9, 2980-92. doi: 10.1093/nar/gki604.
87. Kijlstra, A., Eissen, O. A., Cornelissen, J., Munniksma, K., Eijck, I., Kortbeek, T. (2004). *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Investigative ophthalmology & visual science*. 45:3165–9.

88. Kijlstra, A., Jongert, E. (2008). Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *International journal for parasitology*. 38(12):1359–1370. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.06.002>.
89. Klun, I., Djurković-Djaković, O., Katić-Radivojević, S., & Nikolić, A. (2006). Cross-sectional survey on *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep and pigs in Serbia: seroprevalence and risk factors. *Veterinary parasitology*. 135(2), 121-131.
90. Klun, I., Uzelac, A., Villena, I., Mercier, A., Bobić, B., Nikolić, A., Rajnpreht, I., Opsteegh, M., Aubert, D., Blaga, R., van der Giessen, J., Djurković-Djaković, O. (2017). The first isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from horses in Serbia. *Parasites & vectors*. 10, 167.
91. Klun, I., Vujanic, M., Year, H., Nikolic, A., Iovic, V., Bobic, B., Bradonjic, S., Dupouy, J. C., Djurkovic-Djakovic, O. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: Seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Veterinary research*. 42, 17.
92. Kofoed, K. G., Vorlund-Kiaer, M., Nielsen, H. V., Alban, L., Johansen, M. V. 2017. Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* in Danish pigs. *Veterinary parasitology*. Reg. Stud. Reports. 10, 136-138
93. Kuruca, L., Uzelac, A., Klun, I., Lalošević, V. and Djurković-Djaković, O., 2019. *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic pigs in Serbia. *Acta Veterinaria Hungarica*. 67(2), pp.204-211.
94. Lehmann, T., Marcet, P. L., Graham, D. H., Dahl, E. R., Dubey, J. P. (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 11423–11428.
95. Mancusi, A., Giordano, A., Bosco, A., Girardi, S., Proroga, Y. T., Morena, L., Pinto, R., Sarnelli, P., Cringoli, G., Rinaldi, L. and Capuano, F. (2022). Development of a droplet digital polymerase chain reaction tool for the detection of *Toxoplasma gondii* in meat samples. *Parasitology Research*, 121(5), 1467-1473.
96. Marković, M., Ivočić, V., Štajner, T., Djokić, V., Klun, I., Bobić, B., Nikolić, A., Djurković Djaković, O., (2014). Evidence for genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in selected intermediate hosts in Serbia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 37, 173–179.
97. McLeod, R., Van Tubbergen, C., Montoya, J. G., Petersen, E. (2013). Human *Toxoplasma* infection. In: *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*: 2nd edn. Elsevier. 99-159
98. Mie, T., Pointon, A. M., Hamilton, D. R., Kiermeier, A. (2008). A qualitative assessment of *Toxoplasma gondii* risk in ready-to-eat smallgoods processing. *Journal of food protection*. 71:1442–1452. [Crossref](#), [Medline](#), [Google Scholar](#)
99. Mirza Alizadeh, A., Jazaeri, S., Shemshadi, B., Hashempour-Baltork, F., Sarlak, Z., Pilevar, Z., Hosseini, H. (2018). A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods. *Pathogens and global health*. 112:306–319. [Crossref](#), [Medline](#), [Google Scholar](#)
100. Miura, A. C., de Barros, L. D., Ferreira, F. P., Neto, J. M. F., Sicupira Franco, P. M., Su, C., Vidotto, O., Garcia, J. L. (2019). Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolated from pigs for human consumption. *Parasitology research*. 118(5), 1593-1599.
101. Montoya, J. G. and Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet*. 363, 1965-1976.
102. Nielsen, S. T., Westergaard, I. L., Guldbech, G. K., Nielsen, H. V., Johansen, M. V. (2019). The prevalence of *Toxoplasma gondii* in mice living in Danish indoor sow herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61(48):(16 October 2019). doi:<https://ezproxy.nb.rs:2134/article/10.1186/s13028-019-0483-z>
103. Olsen, A., Sandberg, M., Houe, H., Nielsen, H. V., Denwood, M., Jensen, T.B. and Alban, L., (2020). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sows and finishers from conventional

- and organic herds in Denmark: Implications for potential future serological surveillance. *Preventive veterinary medicine*. 185, p.105149.
104. Opsteegh, M., Landear, M., Sprong, H., den Hartog, L., De Craeye, S., Bokken, G., Ajzenberg, D., Kijlstra, A., der Giessen, J. (2010). Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 193-201.
 105. Opsteegh, M., Kortbeek, T. M., Havelaar, A. H. and van der Giessen, J. W. (2014). Intervention strategies to reduce human *Toxoplasma gondii* disease burden. *Clinical Infectious Diseases*. 60, 101–107.
 106. Opsteegh, M., Maas, M., Schares, G. and Giessen, J. (2016). Relationship between seroprevalence in the main livestock species and presence of *Toxoplasma gondii* in meat (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01) An extensive literature review, Final report. EFSA Supporting Publications, 13, 294.
 107. Papatsiros, V. G., Athanasiou, L. V., Stougiou, D., Papadopoulos, E., Maragkakis, G. G., Katsoulos, P. D., Lefkaditis, M., Kantas, D., Tzika, E. D., Tassis, P. D., Boutsin, S. (2016). Cross-sectional serosurvey and risk factors associated with the presence of *Toxoplasma gondii* antibodies in pigs in Greece. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*. 16(1):48–53. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1845>
 108. Papatsiros, V. G., Athanasiou, L. V., Kostoulas, P., Giannakopoulos, A., Tzika, E., & Billinis, C. (2021). *Toxoplasma gondii* Infection in Swine: Implications for Public Health. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(12), 823-840.
 109. Paraboni, M. L. R., Costa, D. F., Silveira, C., Gava, R., Pereira-Chiocola, V. L., Belfort, R., Commodaro A. G. (2020). A new strain of *Toxoplasma gondii* circulating in southern Brazil. *Journal of Parasitic Diseases*. 44, 248–252. <https://doi.org/10.1007/s12639-019-01155-x>
 110. Pastiu, A. I., Gyorke, A., Blaga, R., Mircean, V., Rosenthal, B. M., Cozma, V. (2013). In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitology Research*. 112(6):2403. doi:10.1007/s00436-013-3353-z
 111. Pastiu, A. I., Cozma-Petruț, A., Mercier, A., Balea, A., Galal, L., Mircean, V., Pusta, D. L., Bogdan, L., Gyorke, A. (2019). Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected backyard pigs intended for familial consumption in Romania. *Parasites Vectors*. 12, 586. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3842-8>
 112. Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Su, C. (2008). Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International journal for parasitology*. 38, 5, 561-9. doi:10.1016/j.ijpara.2007.09.004.
 113. Plaza, J., Dámek, F., Villena, I., Innes, E.A., Katzer, F., Hamilton, C. M. (2020). Detection of *Toxoplasma gondii* in retail meat samples in Scotland. *Food and Waterborne Parasitology*. 20, e00086. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2020.e00086>
 114. Puchalska, M., Wiśniewski, J., Klich, D., Gołąb, E., Jańczak, D., Sokołowska, J., Urbańska, K. and Anusz, K. (2022). A serological survey of *Toxoplasma gondii* in polish pigs from organic farms, other housing systems and in pigs of different age groups. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 64(1), 1-11.
 115. Rani, S., Cerqueira-Cézar, C. K., Murata, F. H. A., Sadler, M., Kwok, O. C. H., Pradhan, A. K., Hill, D. E., Urban, J. F., Dubey, J. P. (2019). *Toxoplasma gondii* tissue cyst formation and density of tissue cysts in shoulders of pigs 7 and 14 days after feeding infected mice tissues. *Veterinary Parasitology*. 269, 13-15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.04.004>.
 116. Remington, J.S., Miller, M.J., Brownlee, I. (1968). IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics*. 41, 6: 1082-1091.

117. Remington, J. S., McLeod, R., Desmonts, G. (1995). Toxoplasmosis. Remington, J. S., Klein, J. O. (уред.): Infectious Diseases of the Fetus and the Unborn Infant. IV издање, WB Saunders, Philadelphia. 140-267.
118. Robert-Gangneux F, Dardé ML. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*. 25:264–296. [Crossref](#), [Medline](#), [Google Scholar](#)
119. Robert-Gangneux, F., Gavinet, M.F., Ancelle, T., Raymond, J., Tourte-Schaefer, C., Dupouy Camet, J. (1999). Value of prenatal diagnosis and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: retrospective study of 110 cases. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 9: 2893–289
120. Roqueplo, C., Halos, L., Cabre, O., Davoust, B. (2011). *Toxoplasma gondii* in wild and domestic animals from New Caledonia. *Parasite*. 18, 345–348.
121. Schares, G., Koethe, M., Bangoura, B., Geuthner, A. C., Randau, F., Ludewig, M., Maksimov, P., Sens, M., Bärwald, A., Conraths, F. J., Villena, I., Aubert, D., Opsteegh, M., Van der Giessen, J. (2018). *Toxoplasma gondii* infections in chickens - performance of various antibody detection techniques in serum and meat juice relative to bioassay and DNA detection methods. *International journal for parasitology*. 48(9–10), 751–762.
122. Scharff, R. (2020). Food attribution and economic cost estimates for meat and poultry related illnesses. *Journal of Food Protection*, 83(6):959-967. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-548>.
123. Shwab, E. K., Zhu, X. Q., Majumdar, D., Pena, H. F., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Su, C. (2014). Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141: 453-61.
124. Šibalić, D., Radović, M. (1969). Contribution la connaissance de la fréquence de l'infection de *Toxoplasma gondii* chez l'homme dans la Serbie. GLAS CCLXXV. Acc. Serbe Sci. Arts Cl. Sci. Med. 22.
125. Sibley, L. D. (2010). How apicomplexan parasites move in and out of cells. *Current opinion in biotechnology*. 21: 592–598.
126. Sibley, L. D., Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*. 359: 82–85.
127. Slany, M., Reslova, N., Babak, V. and Lorencova, A. (2016). Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 238, pp.252-255.
128. Sroka, J., Bilska-Zajac, E., Wójcik-Fatla, A., Zajac, V., Dutkiewicz, J., Karamon, J., Piotrowska, W., Cencek, T. (2019). Detection and molecular characteristics of *Toxoplasma gondii* DNA in retail raw meat products in Poland. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(3):195-204. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2537>.
129. Sroka, J., Karamon, J., Wójcik-Fatla, A., Piotrowska, W., Dutkiewicz, J., Bilska-Zajec, E., Kochanowski, M., Dabrowska, J., Cencek, T. (2020). *Toxoplasma gondii* infection in slaughtered pigs and cattle in Poland: seroprevalence, molecular detection and characterization of parasites in meat. *Parasites Vectors*. 13, 223. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04106-1>
130. Štajner, T., Vasiljević, Z., Vujić, D., Marković, M., Ristić, G., Mičić, D., Pašić, S., Ivović, V., Ajzenberg, D., Djurković-Djaković, O. (2013). Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *Journal of Clinical Microbiology*. 51, 2686–2690
131. Stelzer, S., W. Basso, J. Benavides Silván, Luis M. Ortega-Mora, P. Maksimov, J. Gethmann, F. J. Conraths, and G. Schares. (2019). "Toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis in farm animals: Risk factors and economic impact." *Food and Waterborne Parasitology*. 15, e00037.
132. Stopić, M., Štajner, T., Marković-Denić, L., Nikolić, V., Djilas, I., Srzentić, S.J., Djurković-Djaković, O., Bobić, B. (2022). Epidemiology of Toxoplasmosis in SERBIA: A Cross-Sectional Study on Blood Donors. *Microorganisms*. 10, 492.

133. Su, C., Khan, A., Zhou, P., Majumdar, D., Ajzenberg, D., Dardé, M.L. и cap. (2012). Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the national academy of sciences. USA* 109: 5844-9.
134. Su, C., Shwab, E. K., Zhou, P., Zhu, X. Q., Dubey, J. P. (2010). Moving towards and integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 137, 1–11, doi:10.1017/S0031182009991065.
135. Swanenburg, M., Gonzales, J. L., Bouwknegt, M., Boender, G. J., Oorburg, D., Heres, L., Wisselink, H. J. (2019). Large-scale serological screening of slaughter pigs for *Toxoplasma gondii* infections in the Netherlands during five years (2012–2016): trends in seroprevalence over years, seasons, regions and farming systems. *Veterinary parasitology*. 2, Article 100017.
136. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology*. 30(12-13), 1217-1258.
137. Thrusfield, M. (2005). Surveys. In *Veterinary Epidemiology*, 3rd ed.; Blackwell Science: Oxford, UK. 228–246.
138. Uzelac, A., Klun, I., Ćirović, D., Penezić, A., Ćirković, V., Djurković-Djaković, O. (2019). Detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in wild canids in Serbia. *Parasitology International*. 73, art. no. 101973. DOI: 10.1016/j.parint.2019.101973
139. Veronesi, F., Ranucci, D., Branciarri, R., Miraglia, D., Mammoli, R., Fioretti, D.P. (2011). Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses Public Health*. 58, 178–84.
140. Vergara, A., Marangi, M., Caradonna, T., Pennisi, L., Paludi, D., Papini, R., Ianieri, A., Giangaspero, A., Normanno, G. (2018). *Toxoplasma gondii* lineages circulating in slaughtered industrial pigs and potential risk for consumers. *Journal of food protection*. 81(8), 1373-1378.
141. Villari, G., Vesco, E., Petersen, A., Crispo, W., Buffolano. (2009). Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Veterinary Parasitology*. Volume 161, Issues 1–2, 2009, Pages 1-8, ISSN 0304-4017.
142. Vitale, M., Tumino, G., Partanna, S., La Chiusa, S., Mancuso, G., La Giglia, M., Lo Presti, V. D. M. (2014). Impact of traditional practices on food safety: a case of acute toxoplasmosis related to the consumption of contaminated raw pork sausage in Italy. *Journal of food protection*, 77(4), 643-646.
143. Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., Fleck, D.G., Perkins, M., Oladehin, B. (1976). A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 29, 2: 150-153.
144. Wallon, M., P. Gaucherand, M. Al Kurdi, and F. Peyron. (2002). Toxoplasma infections in early pregnancy: consequences and management. *Journal De Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction*. 31:478–484.
145. Wang, H., Wang, T., Luo, Q., Huo, X., Wang, L., Liu, T., Xu, X., Wang, Y., Lu, F., Lun, Z., Yu, L., Shen, J. (2012). Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pork from retail meat stores in Eastern China. *International Journal of Food Microbiology*. 157(3), 393-397. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.011>.
146. Ware, M.W., Augustine, S.A., Erisman, D.O., See, M. J., Wymer, L., Hayes, S.L., Dubey, J.P., Villegas, E. N. (2010). Determining UV inactivation of *Toxoplasma gondii* oocysts by using cell culture and a mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5140–5127. [Crossref](#), [Medline](#), [Google Scholar](#)
147. Warnekulasuriya, M. R., J. D. Johnson, and R. E. Holliman. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *International Journal of Food Microbiology*. 45:211–215
148. Weigel, R. M., Dubey, J. P., Siegel, A. M., Hoefling, D., Reynolds, D., Herr, L., Kitron, U. D., Shen, S. K., Thulliez, P., Fayer, R., Todd, K S. (1995). Prevalence of antibodies to *Toxoplasma*

- gondii* in swine in Illinois in 1992. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 206, 1747–1751.
149. WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. ISBN 978 92 4 156516 5.
 150. www.statista.com/statistics/263964/number-of-pigs-in-selected-countries (accessed on 13 April 2020)
 151. Zander, K., Stolz, H., Hamm, U. (2013). Promising ethical arguments for product differentiation in the organic food sector: a mixed methods research approach. *Appetite* 62, 133–142.
 152. Zimmerman, J. J., Dreesen, D. W. Owen, W. J., Beran, G. W. (1990). Prevalence of toxoplasmosis in swine from Iowa. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196, 266–270.
 153. Вујанић, М. (2012). Молекуларна детекција и генотипизација сојева паразита *Toxoplasma gondii* изолованих у Србији. Универзитет у Београду. Докторска дисертација.
 154. Куруца, Љ. (2017). Инфекција паразитом *Toxoplasma gondii* код свиња: серолошки, паразитолошки и молекуларни налази као параметри безбедности меса. Универзитет у Новом Саду. Докторска дисертација.
 155. Републички завод за статистику (РЗС), Република Србија (2018). Саопштење број 032 – год. LXVIII, 14.02.2018. ISSN 0353-9555. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2018/Pdf/G20181032.pdf> (accessed on 12 December 2019)
 156. Републички завод за статистику (РЗС), Република Србија (2020). Статистички годишњак Републике Србије 2020. Издање 53., 222 стране, ISSN 0354-4206. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2020/Pdf/G20202053.pdf> (accessed on 10 April 2021)
 157. Републички завод за статистику (РЗС), Република Србија (2021). Статистички годишњак, 20.10.2021. Издање 54, 226 страна, ISSN 0354-4206. <https://publikacije.stat.gov.rs/G2021/Pdf/G20212054.pdf> (accessed on 12 December 2021)

Прилог 1.

Анкетна питања за израду докторске дисертације под називом: Утицај инфекције паразитом *T. gondii* на безбедност меса свиња у Србији

Назив фарме:

Датум анкетирања:

Редни број:	Питање	Одговори	Напомене
1.	Капацитет фарме?	а) <150 б) 150-500 ц) >500	
2.	Систем производње ?	а) затворен систем; б) систем све унутра/све напоље	
3.	Да ли особље има спроведену обуку за рад на фарми, да ли постоји евиденција о спроведеним обукама?	а) Да б) Не	
4.	Да ли постоји ограда на фарми ?	а) Да б) Не	
5.	Да ли постоје дезобаријере А) на главном улазу; В) на улазу у сваки објект	А) а) Да б) Не Б) а) Да б) Не	
6.	Да ли постоји контрола на улазној рампи на фарму? Ако постоји да ли се води дневник евиденције посетилаца?	а) Да б) Не	
7.	Да ли радници користе посебну радну одећу и обућу за рад на фарми ?	а) Да б) Не	
8.	Да ли су присутна и у функцији, места за санитацију или прање руку испред сваког улаза у објекте на фарми?	а) Да б) Не	
9.	Одржавање круга фарме?	а) добро; б) задовољавајуће; ц) лоше	
10.	Које године је направљена фарма ?		
11.	Да ли постоји заштитна мрежица на прозорима објекта?	а) Да б) Не	
12.	Да ли су присутне друге животиње у кругу фарме?	а) мачке, б) пси, ц) мишеви, д) птице	
13.	Да ли су присутне друге животиње изван круга фарме?	а) мачке, б) пси, ц) мишеви, д) птице	
14.	Контрола глодара на фарми?	а) професионална, б) мамци, ц) мачке	
15.	Да ли се гаји још нека врста животиња на фарми?	а) Да, _____ (коју врсту) б) Не	
16.	Да ли постоји ситуациони план о тачним позицијама постављених мамака? Да ли постоји евиденција о употребљеним, утрошеним и замењеним мамцима?	а) Да б) Не	
17.	Исхрана животиња на фарми?	а) Сува концентрована храна б) Коришћење нуспроизвода у исхрани	
18.	Ако се користе нуспроизводи и помије, да ли се пре употребе термички обрађују?	а) Да б) Не	
19.	Да ли је систем за храну затвореног типа, тако да омогућава заштиту хране од штеточина?	а) Да б) Не	
20.	Порекло воде на фарми ?	а) бунар; б) река; ц) водовод	
21.	Ако је вода са фарме да ли се врши третман воде, и да ли се проверава њена исправност?	а) Да б) Не	
22.	Да ли постоји одговарајућа процедура за одлагање утинулих свиња? Која је Ваша?	а) Да б) Не	
23.	Да ли постоји евиденција о морталитету свиња?	а) Да б) Не	

Списак скраћеница:

AIDS	- енгл. Acquired ImmunoDeficiency Syndrome
CS3	- енгл. CircumSporozoite protein 3
FAO	- енгл. Food and Agriculture Organization
gDNK	- геномска дезоксирибонуклеинска киселина
GRA	- енгл. Dense GRAnule protein
Ig	- Имуноглобулин
LD	- енгл. Lethal Dose
MAT	- енгл. Modified Agglutination Test
MnPCR-RFLP	енгл. Multiplex Nested Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
ToxoDB	- енгл. <i>Toxoplasma gondii</i> DataBase
WHO	- енгл. World Health Organization
EFSA	- енгл. European Food Safety Authority
PCR	- енгл. Polymerase chain reaction
rRNK	- рибозомска рибонуклеинска киселина
RT-PCR	- енгл. Real-time Polymerase Chain Reaction
qPCR	- енгл. quantitative PCR
IgA	- Immunoglobulin A
IgG	- Immunoglobulin G
IgM	- Immunoglobulin M
HSDA	- енгл. High Sensitivity Direct Agglutination
ELISA	- енгл. Enzyme-linked immunosorbent assay
НРЛТ	- Национална референтна лабораторија за токсоплазмозу
ИМИ	- Институт за медицинска истраживања
gDNA	- енгл. Genomic deoxyribonucleic acid
RFLP	- енгл. Restriction Fragment Length Polymorphism
SPSS	- енгл. Statistical Package for the Social Sciences
CI	- енгл. Confidence Interval
OR	- енгл. Odds Ratio
MC	- енгл. Magnetic capture
ISO	- енгл. International Organization for Standardization
ddPCR	- енгл. digital droplet Polymerase chain reaction
ВЦИ	- Ветеринарски специјалистички институт
НИВ	- Научни институт за ветеринарство

Биографија

Никола (Здравко) Бетић рођен 24. маја 1991. у Истоку. Основну школу „Радоје Домановић“ је завршио у Параћину, средњу школу (Пољопривредно ветеринарска школа са домом ученика у Свилајнцу-ветеринарски техничар) је завршио у Свилајнцу. Интегрисане основне студије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписао је 2010/11 године. Кроз студије ветеринарске медицине, определио се за изборну област из Хигијене и технологије намирница анималног порекла. Дипломирао је 26.09.2016. године са просечном оценом 8,68 и одбранио дипломски рад на тему “Оцена услова добробити свиња током фазе омамљивања”. Докторске академске студије на Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписује 2016/2017 године, где је положио све испите прописане планом и програмом са просечном оценом 9,67.

Приправнички стаж обавио је на Институту за хигијену и технологију меса од 10.02.2017. године, након којег је успешно одбранио приправнички рад на тему „Интегрисани приступ управљању биолошким опасностима у ланцу производње свињског меса и производа од свињског меса у континууму фарма-кланица-прерада меса-дистрибуција“. Николе Бетић је тренутно распоређен у Сектору за научно-техничку сарадњу као млађи асистент и обавља послове и задатке из делокруга сектора. Учествовао је у више екстерних и интерних обука и курсева. Активно је учествовао у организацији научних међународних скупова (The 60th International Meat Industry Conference – MeatCon19, The 61st International Meat Industry Conference – MeatCon21) као члан организационог одбора.

У звању је истраживач сарадник, објавио 13 радова у часописима од међународног и националног значаја, као и у зборницима научних скупова међународног значаја који су штампани у целини, на 4 је први аутор. Био је учесник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја ТР-31071: "Истраживање фармаколошких карактеристика антимикуробних агенаса, увођење нових технолошких решења и алтернативних метода профилаксе с циљем да се побољша контрола инфективних обољења домаћих животиња". Учествовао је у креирању и раду на XX иновационих пројеката Фонда за иновациону делатност РС, од којих је на 5 био носилац истраживања. Освојено прво место у сесији „Студентске оралне презентације“ на The 61st International Meat Industry Conference, Златибор, 26-29. септембра 2021. године са темом „*Toxoplasma gondii* in pork and pigs in Serbia - a real food safety hazard". Похађао је у оквиру RIBMINS COST пројекта “Training School on Farm and Abattoir Interventions in a Risk-Based Meat Safety Assurance System“. Успешно је завршио обуку за интерног аудитора за Global Standard for Food Safety Issue 8, учешће на EFSA Јесењој школи 2022. у Осијеку „Attracting IPA scientist to become risk assessors“.

Ожењен је, отац двоје деце.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Никола З. Бетић

Број индекса 2016/5009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„УТИЦАЈ ИНФЕКЦИЈЕ ПАРАЗИТОМ *Toxoplasma gondii* НА БЕЗБЕДНОСТ
МЕСА СВИЊА У СРБИЈИ“**

- резултат сопственог истраживачког рада
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора **Никола З. Бетић**

Број индекса **2016/5009**

Студијски програм **Докторске академске студије**

Наслов рада „Утицај инфекције паразитом *Toxoplasma gondii* на безбедност меса свиња у Србији“

Ментор 1: **Др Неђељко Карабасил, редовни професор**

Ментор 2: **Др Ивана Клун, научни саветник**

Потписани Никола З. Бетић,

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, _____

Потпис аутора

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај инфекције паразитом *Toxoplasma gondii* на безбедност меса свиња у Србији“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, _____

Потпис аутора

1. **Ауторство** - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прераде.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.