# Čimbenici rizika i seroprevalencija anisakijaze u profesionalno izloženoj populaciji

**Nonković, Diana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2021**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:484609

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

*Repository / Repozitorij:*

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Diana Nonković

# ČIMBENICI RIZIKA I SEROPREVALENCIJA ANISAKIJAZE U PROFESIONALNO IZLOŽENOJ POPULACIJI

Doktorska disertacija

Split, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Diana Nonković

# ČIMBENICI RIZIKA I SEROPREVALENCIJA ANISAKIJAZE U PROFESIONALNO IZLOŽENOJ POPULACIJI

Doktorska disertacija

Split, 2021.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije. Istraživanje je provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost, AnGEL (*Anisakis spp. genomic, epidemiology*, broj ugovora 5576).

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Boris Lukšić, spec. infektolog

*Zahvaljujem svim koautorima znanstvenog članka na kojem se temelji ova doktorska disertacija, za značajan doprinos i uspješnu suradnju, kao i svima koji su sudjelovali u provedbi istraživanja.*

*Hvala mom mentoru izv. prof. dr. sc. Borisu Lukšiću na vodstvu tijekom izrade doktorske disertacije.*

*Hvala prof. dr. sc. Ivoni Mladineo na nesebičnoj potpori, prenesenom znanju i uključivanju u znanstvene projekte.*

*Hvala prijatelju i kolegi izv. prof. dr. sc. Vedranu Poljaku na potpori, strpljenju i motivaciji za znanstveni rad.*

*Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, hvala Vam što ste me oduvijek podržavali i vjerovali u mene.*

*Rad posvećujem svom pok. ocu.*

**SADRŽAJ**

POPIS OZNAKA I KRATICA ..... VII
1. UVOD ..... 1
1.1. Rod *Anisakis Dujardin*, 1845 (Nematoda, *Anisakidae*) ..... 2
1.1.1. Biološke i ekološke odrednice *Anisakis* spp. ..... 3
1.2. Epidemiologija ..... 6
1.3. Anisakijaza ..... 6
1.3.1. Klinička slika i patohistološke promjene ..... 7
1.3.2. Imunološki odgovor i alergijske reakcije na *Anisakis* spp. ..... 9
1.3.3. HLA sustav i anisakijaza ..... 10
1.3.4. Oblić *Anisakis* spp., skriveni alergen u hrani ..... 11
1.4. Javnozdravstveni aspekti anisakijaze ..... 14
1.4.1. Utjecaj parazita na sigurnost hrane, proizvoda ribarstva ..... 14
1.4.2. Senzibilizacija na *Anisakis* spp. stanovništva ..... 17
1.4.3. Profesionalno izložena populacija ..... 20
2. HIPOTEZE I CILJEVI ..... 22
2.1. Hipoteze ..... 22
2.2. Ciljevi ..... 22
3. METODE I MATERIJALI ..... 23
3.1. Etička načela ..... 23
3.2. Ustroj istraživanja ..... 23
3.3. Ishod istraživanja ..... 23
3.4. Ispitanici ..... 24
3.5. Postupci ..... 28
3.5.1. Laboratorijske analize ..... 28
3.5.2. HLA tipizacija ..... 29
3.5.3. Upitnik ..... 29
3.5.4. Spirometrija ..... 30
3.5.5. Statistički postupci ..... 30

4. REZULTATI ..... 32
4.1. Imunološki odgovor na Ani s 1 i Ani s 7 antigene (alergene) posredovan IgE antitijelima ..... 33
4.2. Imunološki odgovor na *Anisakis* CE antigene posredovan specifičnim IgE antitijelima .. 35
4.3. Imunološki odgovor na *Anisakis* spp. antigene posredovan specifičnim IgE antitijelima, mjeren ImmunoCAP testom ..... 37
4.4. Čimbenici rizika za seropozitivnost na glavne *Anisakis* spp. alergene (antigene) u djelatnika riboprerađivačke industrije u Republici Hrvatskoj ..... 37
4.5. Povezanost serološkog statusa ispitanika na *Anisakis* spp. i rezultata spirometrijskog testiranja u radnika riboprerađivačke industrije ..... 42
4.6. Sustav humanih leukocitnih antigena (HLA) i serološki status ispitanika na *Anisakis* spp. ..... 43
5. RASPRAVA ..... 46
5.1. Rizični čimbenici za seropozitivnost na *Anisaki*s spp. u djelatnika riboprerađivačke industrije ..... 46
5.2. Seroprevalencija anti-*Anisakis* IgE antitijela ..... 51
5.3. HLA i *Anisakis* spp. senzibilizacija ..... 52
5.4. Spirometrijsko testiranje profesionalno izložene populacije ..... 53
6. ZAKLJUČAK ..... 55
7. SAŽETAK ..... 56
8. SAŽETAK NA ENGLESKOM JEZIKU (SUMMARY) ..... 57
9. POPIS LITERATURE ..... 58
10. DODATNI MATERIJALI ..... 72
10.1. Upitnik ..... 72
10.2. Popis HLA alela i haplotipova identificiranih u istraživanju ..... 84
11. KRATKI ŽIVOTOPIS ..... 86

**POPIS OZNAKA I KRATICA**

| | |
|---|---|
| *A. simplex* | *Anisakis simplex* (vrsta) |
| *A. simplex s.s.* | *Anisakis simplex* sensu stricto |
| *A. physeteris* | *Anisakis physeteris* |
| *Anisakis* spp. | *Anisakis* vrste |
| Th2 limfociti | Pomoćnički T limfociti (*engl.T helper type 1, 2… lymphocites*) |
| IgE | Imunoglobulin E |
| IL-10 | Interleukin 10 |
| HLA | Humani leukocitni antigeni |
| MHC | Glavni sustav tkivne snošljivosti (*engl. Mayor Histocompatibility Complex*) |
| Ani s (1-14) | Glavni *Anisakis* antigeni/alergeni (1-14) |
| EFSA | Europska agencija za sigurnost hrane (*engl. European Food Safety Authority*) |
| ES | Ekskretorno-sekretorni antigeni |
| RASFF | Sustav brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje *(engl. Rapid Alert System for Food and Feed*) |
| CA | Alimentarni kodeks (*engl. Codex Alimentarius*) |
| WHO | Svjetska zdravstvena organizacija (*engl. World Health Organization*) |
| FAO | Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (*engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations*) |
| WTO | Svjetska trgovinska organizacija (*engl. World Trade Organization*) |
| UV | Ultraljubičasto svjetlo *(engl. Ultra Violet)* |
| *per capita* | Prema stanovniku |
| EU | Europska unija |
| KBC Split | Klinički bolnički centar Split |
| PCR-SSO | (*engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotids)* |

| | |
|---|---|
| PCR-SSP | (*engl. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer*) |
| FITC | Florescein-izocijanat |
| ELISA test | Enzimski povezani imunosorbentni test (*engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) |
| DNA | Deoksiribonukleinska kiselina (*engl. Deoxyribonucleic Acid*) |
| FVC | Forsirani vitalni kapacitet *(engl. Forced Vital Capacity)* |
| FEV1 | Forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi |
| OR | Omjer izgleda (*engl. Odds Ratio*) |
| CI | Interval pouzdanosti (*engl. Confidence Interval*) |
| TI | Tiffenau indeks |
| IPARD | Instrument predpristupne pomoći za ruralni razvoj EU *(engl. Instrument for Pre-accession Assistance for Rural Development)* |

# 1. UVOD

Intenzivna globalna trgovina prehrambenim proizvodima, putovanja, klimatske promjene, povećanje svjetske populacije uz promjene u prehrambenim navikama dovele su do porasta broja infekcija koje se prenose hranom (1). Paraziti koji se prenose hranom, od kojih je većina zoonoza, predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi. Globalizacija i klimatske promjene imaju ogroman utjecaj na ove patogene mijenjajući njihove epidemiološke obrasce i ekosustave zbog promjena biotičkih i abiotičkih parametara (2). Učinci ovih promjena na parazite koji se prenose hranom ne mogu se predvidjeti u cjelini zbog njihove složenosti, ali važno je da biolozi, epidemiolozi, liječnici i veterinari procijene/riješe problem unutar jedinstvenog zdravstvenog pristupa („Jedno zdravlje“) (2).

Posljednjih desetak godina povećana je svjesnost javnosti o dobrobitima konzumacije hrane iz mora i ribi kao lako dostupnom i visoko kvalitetnom izvoru proteina (3, 4). Morska riba je važna u prehrani i zbog visokog sadržaja omega-3-višestruko nezasićenih masnih kiselina, te je značajna sastavnica zdrave mediteranske dijete (prevencija kardiovaskularnih bolesti, Alzheimerove bolesti, karcinoma) (5). Prema podatcima Europske komisije, u 28 zemalja Europske unije (EU) prosječna konzumacija ribe u 2011. godini iznosila je 24,9 kg po osobi, uz velike razlike u stopi potrošnje između pojedinih država članica (6).

Postoji čitav niz nametnika koji parazitiraju u ribama i drugim morskim organizmima, ali ne izazivaju svi bolest u ljudi (7). Oblić *Anisakis* spp. je prepoznat kao važan patogen (anisakijaza), sa značajnim potencijalom prijenosa na čovjeka pa se zdravstveni rizik za konzumenta radi prisutnosti ovog parazita u komercijalnim vrstama riba ne smije zanemariti. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2012. godine, oko 56 milijuna slučajeva humane infestacije parazitima povezano je s konzumacijom ribe i ribljih prerađevina (8). Posebno je istaknuta skupina anisakida, radi njihove sposobnosti izazivanja ozbiljnih patoloških stanja u ljudi kao i geografske rasprostranjenosti na svim kontinentima (9). Rodovi *Anisakis, Contracaecum* i *Pseudoterranova* koji pripadaju obitelji *Anisakidae*, odgovorni su za humanu infestaciju (10). Svjetski gastronomski trendovi doveli su do iznimne globalne popularnosti tradicijskih kuhinja baziranih na sirovoj, ponekad nedovoljno termički obrađenoj ribi ili drugim morskim organizmima. Takva jela nose visok rizik za prijenos ličinki nametnika na ljude, pa su tako japanski sushi i sashimi, južnoamerički ceviche, riblji tartar, skandinavski gravlax, nizozemska dimljena i usoljena haringa, te španjolski ili talijanski marinirani

(ukiseljeni) inćuni najčešći razlog za nastanak anisakijaze (11). U pripremu pojedinih prethodno nabrojenih jela uključene su metode mariniranja, soljenja, dimljenja ili kiseljenja koje ne uništavaju ovog oblića (12).

Unatoč navedenim činjenicama, stvarni teret bolesti u većini zemalja još uvijek je loše procijenjen ili nepoznat, pa se anisakijaza smatra globalno podcijenjenom zoonozom (13–15). Morska riba i riblji proizvodi infestirani s *Anisakis* spp., osim negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, uzrok su ekonomskih gubitaka riboprerađivačke industrije diljem svijeta. Vidljive ličinke nametnika narušavaju povjerenje građana i kupaca u kvalitetu ribarskih proizvoda. Zbog toga je u posljednjem desetljeću *Anisakis* spp. postao zanimljiv ne samo zdravstvenim profesionalcima i znanstvenicima različitih profila (koncept „Jednog zdravlja“), nego i agencijama za sigurnost hrane i zaštite potrošača (16, 17).

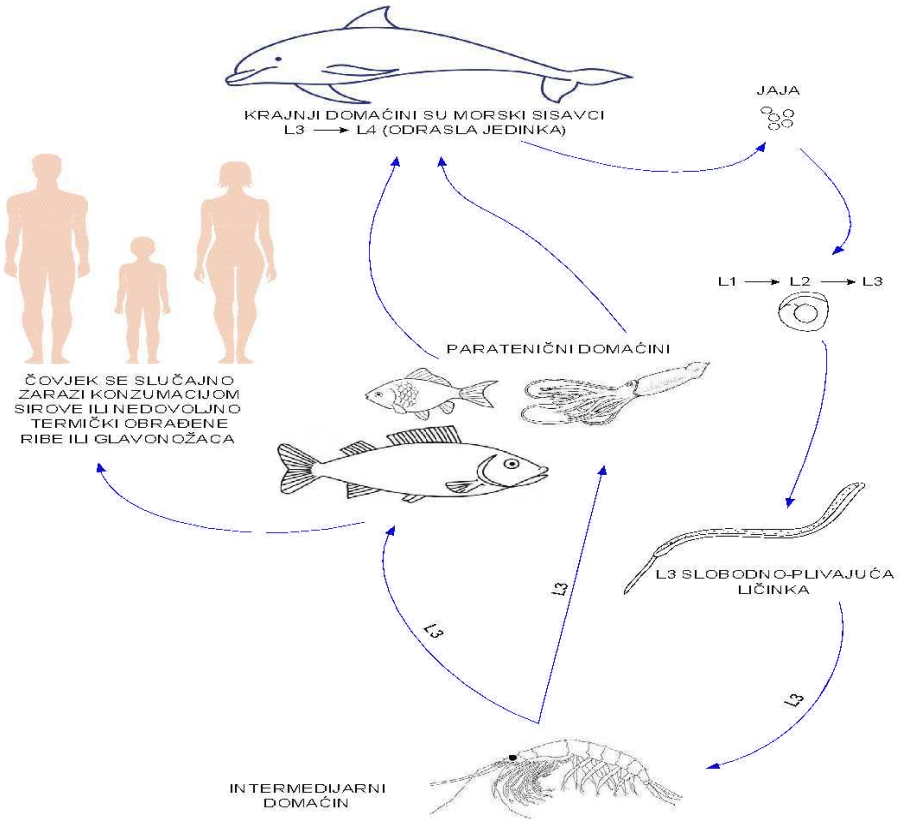
### 1.1. Rod *Anisakis Dujardin*, 1845 (*Nematoda, Anisakidae*)

Zahvaljujući razvoju suvremenih molekularnih i biokemijskih laboratorijskih metoda, istraživanje roda *Anisakis* i otkrivanje pripadajućih novih vrsta uspješno se provodi posljednjih petnaestak godina. Danas je poznato devet vrsta tog nametnika, od kojih su *Anisakis simplex* i *Anisakis pegreffii* posebno važni radi izazivanja bolesti u ljudi (10, 18).

Proučavanjem jedinki oblića iz laboratorijskog uzgoja (*in vitro*) Grabde (1976), uspješno su morfološki determinirani svi razvojni stadiji parazita. Ličinke nametnika L3 stadija zauzimaju spiralni oblik u domaćinu, dok ispružena ličinka ima prosječnu dužinu oko 2 cm i biserno je bijele boje (19). Mattiucci i Nascetti su 2008. godine utvrdili genetičke biljege nekoliko vrsta koje su reproduktivno izolirane, ali sličnih morfoloških značajki, što je dovelo do pojma „sestrinskih vrsti“. Taksonomski, sestrinske vrste se redom svrstavaju unutar kompleksa vrsta koji odgovara već morfološki prepoznatoj kozmopolitskoj vrsti. Tako npr. *Anisakis simplex* kompleks sadrži tri sestrinske vrste: *A. simplex* (sensu stricto), *A. pegreffii*, i *A. berlandi* (20, 21). Dosadašnja istraživanja, uz pomoć prvenstveno molekularnih metoda, pokazala su da je rod *Anisakis* vrlo heterogen, te da postoji nekoliko različitih filogenetskih grana unutar roda (22).

1.1.1. Biološke i ekološke odrednice parazita *Anisakis* spp.

Morski sisavci poput dupina i kitova konačni su domaćini ovog parazita. Odrasli crvi (odvojenih spolova) žive u njihovom probavnom traktu gdje se i razmnožavaju. Oplođena jajašca nametnika zajedno s fecesom izlaze u morsku vodu i time započinje životni ciklus parazita izvan organizma konačnog domaćina. Nakon što se ličinke *Anisakis* spp. izvale iz embrioniranih jaja (L1) u morski okoliš, slijedi iduća faza razvoja: oblik slobodno plivajuće ličinke faze 2 (L2). Kada planktonski račići (npr. Krill), prvi intermedijarni domaćini, pojedu L2 ličinke, one unutar njihovog haemocela prelaze u stadij ličinke L3. Ribe ili glavonošci se tijekom prehrane zooplanktonom (beskralješnjaci) zaražavaju L3 ličinkom te tako postaju paratenični (transportni) domaćini u kojem se nametnici mogu akumulirati u velikom broju. Infestirane ribe su izravan plijen u hranidbenom lancu morskih sisavaca što omogućava ličinkama *Anisakis* spp. ulazak u svog konačnog domaćina (dupini, kitovi, morski lavovi). U njima ličinke dosežu adultni oblik i sposobnost reprodukcije te se životni ciklus parazita nastavlja (22).

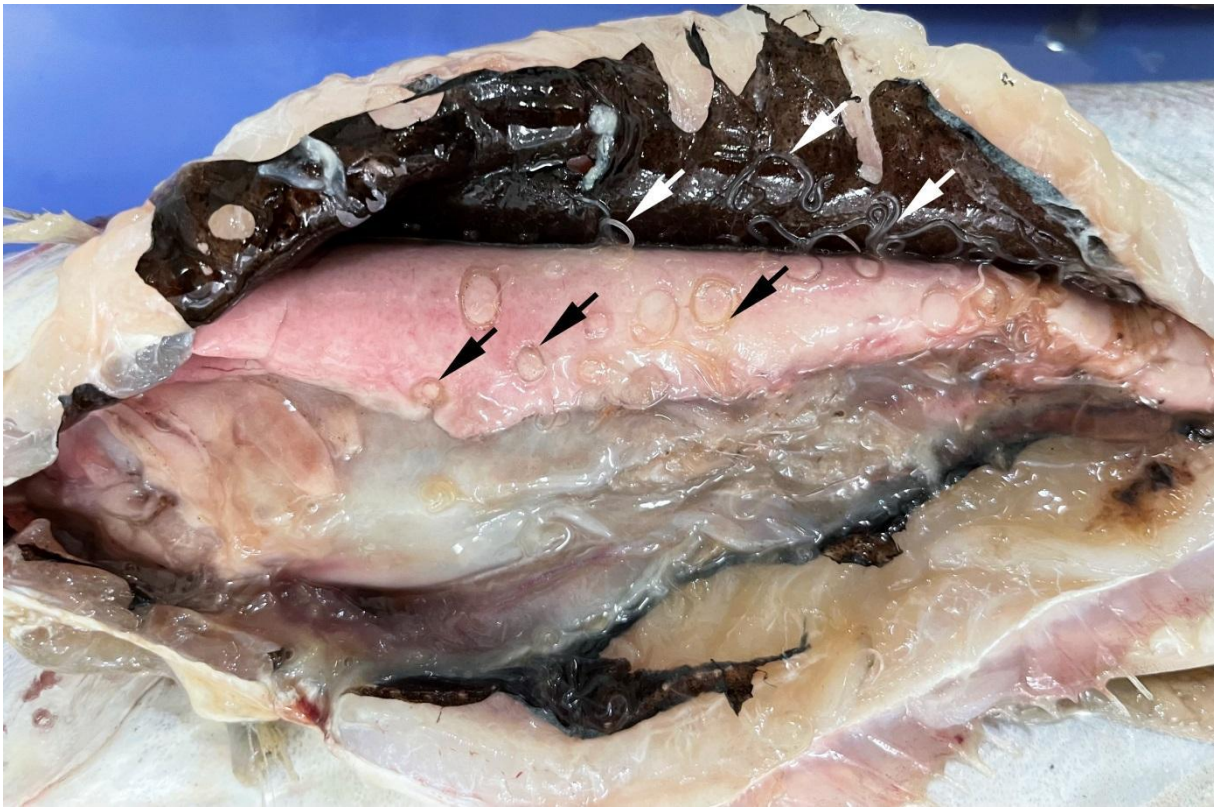



Slika 1. Životni ciklus *Anisakis* spp.

Preuzeto i prilagođeno s: https://www.cdc.gov/parasites/anisakiasis/biology.html)

Prijenosu parazita na čovjeka pogoduje učestala infestacija pojedinih morskih ribljih vrsta kroz hranidbene veze (npr. veća riba se hrani manjom) unutar ekosustava, te dug životni vijek ličinki parazita. Tako je utvrđeno preživljenje oblića od najmanje dvije godine u atlantskom bakalaru, odnosno tri godine u atlantskoj haringi (23, 24). Stoga primjerci starijih predatorskih morskih riba, ako se intenzivno hrane zaraženim parateničnim (srdela) ili intermedijarnim domaćinima (rakovi), mogu imati veliku prisutnost *Anisakis* spp. ličinki (17, 25).

Značajna koncentracija ličinki u grabežljivih riba, među kojima su i važne, komercijalne vrste (npr. tuna), povećava mogućnost kontakta parazita i ljudi (22). Ličinke *Anisakis* spp. obično su spiralizirane u ovalne tvorbe 4 do 5 mm u promjeru, te su smještene ispod serozne ovojnice visceralnih organa (26). Migracija ličinki nametnika u mišićno tkivo ribe događa se i nakon ugibanja ribe ili drugog parateničnog domaćina, što dodatno doprinosi većoj prisutnosti parazita u jestivim dijelovima neke riblje vrste (27).



Slika 2. Ličinke L3 stadija parazita u osliću (*Merluccius merluccius*); snimljeno u laboratoriju Instituta za oceanografiju i ribarstvo u Splitu

*Anisakis* spp. do sada je dokazan kao parazit u oko 200 vrsta riba i 25 vrsta glavonožaca, s daljnom tendencijom širenja infestacije na ostale morske vrste (28). Potvrđeno je da prisutnost ovog parazita u istom parateničnom domaćinu (ribama) varira sezonalno, kao i među zemljopisno odvojenim poljima za ribarenje. Prema istraživanju Serraca i suradnika (2014.), pojedini intermedijarni (beskralježnjaci) domaćini parazita nisu stalni, uobičajeni dio svakodnevne prehrane parateničnih domaćina u određenom geografskom ribarskom polju, nego ribe i glavonošci mogu preferirati neke druge vrste beskralježnjaka (mezoplankton) u određenom ekosustavu za prehranu, često ovisno o godišnjem dobu. Zbog takvih povremenih promjena u ishrani isti paratenični domaćin u nekom geografskom području može biti izrazito opterećen parazitom, dok negdje drugdje može biti potpuno bez njih. Autori su stoga zaključili da je iznimno važan čimbenik u širenju nametnika u komercijalnim vrstama riba sastav zooplanktona u pojedinom ribolovnom području, što ima i indirektan utjecaj na učestalost anisakijaze u ljudi usljed konzumacije hrane morskog porijekla (29). Zaključci znanstvenog rada Aibinu i suradnika ukazuju na to da vrste *Anisakis* ne moraju biti specifične za bilo kojeg posrednog domaćina te da mogu koristiti bilo kojeg od intermedijarnih domaćina za prelazak s jednog staništa na drugo, ovisno o sezonskoj i ekološkoj dostupnosti takvih posredničkih domaćina. Posljedice su povećanje pojavljivanja anisakijaze u cijelom svijetu uz porast učestalosti alergijskih reakcija popraćenim unakrsnom reaktivnošću na homologne proteine drugih beskralježnjaka (30). Vrste *A. simplex* kompleksa prisutne su u Atlantskom oceanu te istočnom i zapadnom Pacifiku. Geografska rasprostanjenost *A. simplex s.s.* je uža, pa je uglavnom zastupljen na sjevernoj hemisferi od 20° sjeverno do iznad Arktičkog polarnog kruga, 80°N (31). Ponekad se nalazi i u vodama zapadnog Sredozemlja, prvenstveno zbog migracija pelagičkih vrsta riba (10). Vrsta *A. pegreffii* je rasprostranjena u Jadranskom i Sredozemnom moru, istočnom Atlantiku, južno do Antarktičkog poluotoka, u morima Japana i Kine, a na sjeveru do Pirinejskog poluotoka (31, 32). Vrsta *A. physeteris* obitava u Sredozemlju i središnjem dijelu Atlantskog oceana (10). Istraživanje Mladineo i suradnika iz 2003. godine prvi put je pokazalo značajnu, vrlo visoku prevalenciju nametnika *Anisakis simplex* u pet komercijalnih vrsta riba iz Jadranskog mora, a koje se učestalo konzumiraju: oslić (88%), šarun (50%) skuša (92%), lokarda (54%), i inćun (100 %) (26). Dodatno, opsežno istraživanje populacijske dinamike nametnika *A. pegreffii* uz molekularnu identifikaciju, na uzorku od 4 600 inćuna u hrvatskom dijelu Jadranskog mora, provela je ista autorica sa

suradnicima, te utvrdila prevalenciju nametnika u uzorku inćuna od 76,1%, uz oscilacije u različitim sezonama uzorkovanja od 20% do 100% (33).

### 1.2. Epidemiologija

Prvi, vjerojatni slučaj humane infekcije oblićima porodice *Anisakidae* zabilježio je još 1876. godine Leuckhart (34). Tek 1960. godine, nakon obolijevanja nekoliko osoba koje su konzumirale soljenu haringu u Nizozemskoj, Van Tiel je zapazio a potom i opisao „vrlo neobičan nalaz" morskog crva u središtu eozinofilnog granuloma kod jednog pacijenta s akutnom boli u trbuhu (haringin crv) (10).

Dvije najznačajnije vrste za infekciju u ljudi su *Anisakis simplex* sensu stricto (s.s) i *Anisakis pegreffii,* ali je potrebno spomenuti i treću vrstu, *Anisakis physeteris* (35, 36, 37). Infektivne ličinke trećeg stadija (L3) *Anisakis* spp. su uzročni agensi za nastanak bolesti anisakijaze u ljudi (38). Glavni put prijenosa parazita na čovjeka je vezan uz konzumaciju sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe. Značajan vehikulum predstavljaju jela u kojima je poslužena svježa riba u obliku globalno popularnih sushija ili sashimija, glavnih sastavnica japanske nacionalne kuhinje, kao i tradicijska kulinarska baština konzumacije mariniranih ili sirovih riba (mala plava riba) u pojedinim zemljama Europe (Italija, Španjolska) i svijeta (39, 40). Kako čovjek nije sastavni dio biološkog životnog ciklusa *Anisakis* spp., osim kao slučajni domaćin, ličinke u pravilu u ljudskom organizmu ne prelaze u adultni oblik, niti imaju sposobnost razmnožavanja. Također, nema interhumanog prijenosa nametnika (41). Do sada je u stručnoj literaturi opisano tek nekoliko slučajeva presvlačenja ličinke u stadij L4 u ljudskom organizmu nakon konzumacije infestirane ribe (42).

### 1.3. Anisakijaza

Prema standardiziranoj nomenklaturi parazitskih zoonoza iz 1988. godine, anisakijaza je definirana kao ihtiozoonoza izazvana nematodama roda *Anisakis*, porodice *Anisakidae* (43).

Razlog nastanka anisakijaze u humanoj populaciji je unos infektivne ličinke L3 pojedinih vrsta *Anisakis* parazita u organizam tijekom konzumacije infestirane ribe ili glavonožaca. Ako je uzročnik vrsta iz roda *Anisakis,* govorimo o anisakijazi kao kliničkom entitetu, dok anisakidoza označava bolest u ljudi kada uzročnik pripada u širem smislu obitelji *Anisakidae* (37, 41).

### 1.3.1. Klinička slika i patohistološke promjene

Anisakijazu uglavnom prate blago do srednje izraženi simptomi, a infekcija najčešće završava izbacivanjem ličinke iz tijela (44). U manjeg broja osoba prisutna je teža klinička slika koja je rezultat invazije ličinke u sluznicu probavnog trakta, nastajanja popratnog eozinofilnog gastroenteritisa odnosno eozinofilnih granuloma u sluznici želuca, tankog i debelog crijeva (39).

Prema lokalizaciji žive ili uginule ličinke u organizmu, kao i prema prevladavajućim simptomima, govorimo o četiri oblika bolesti: gastrična, intestinalna, ektopična i gastro-alergijska (alergijska) anisakijaza (17, 44). Prisutnost povišenog titra anti-*Anisakis* antitijela u zdravih, asimptomatskih, senzibiliziranih osoba mogući je i za sada nedovoljno objašnjeni, peti oblik pojavnosti anisakijaze u ljudi (45).

Simptomi akutne gastrointestinalne anisakijaze uključuju iznenadne bolove u trbuhu, mučninu, povraćanje i proljev koji se uobičajeno pojavljuju do 48 sati nakon konzumacije infestirane sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe (35, 41). Zbog nespecifičnosti kliničke slike moguće je anisakijazu zamijeniti sa simptomima akutnog abdomena, ulkusa ili upalnih bolesti crijeva (46, 47, 48).

Gastrični oblik anisakijaze odgovoran je za 95% bremena bolesti i najčeće se pojavljuje 1–12 sati nakon konzumacije ribe ili glavonožaca, a karakterizira ga bol u žličici, mučnina i povraćanje, ali zbog iznenadne i nagle pojave tegoba želučana anisakijaza može biti klinički krivo percipirana kao ulkusna bolest ili gastritis (37). Ako se posumnja da se radi o gastričnoj anisakijazi, rana gastroskopija je metoda izbora kojom je moguće odmah mehanički odstraniti ličinke parazita te tako spriječiti invaziju ličinki u submukozu želuca (44). Primjena antihelmintika u liječenju gastrointestinalne anisakijaze, u prvom redu albendazola (400-800 mg dnevno tijekom 6 do 21 dan) se u nekim slučajevima pokazalo učinkovitim liječenjem (49). Prema znanstvenom istraživanju Gomez-Mateos i suradnika na životinjskom laboratorijskom modelu, utvrđeno je da je mebendazol najučinkovitiji u sprječavanju gastrointestinalnih lezija, nakon čega slijedi ranitidin, koji je bio najučinkovitiji antacid u toj skupini ispitivanih lijekova, te da bi se oba lijeka stoga mogla smatrati dijelom konzervativnog liječenja anisakijaze (50).

Crijevni oblik anisakijaze (5% slučajeva) javlja se 5–7 dana nakon ingestije parazita i praćen je difuznim bolovima u trbuhu. U literaturi su opisane dvije forme intestinalne anisakijaze: blaga i teža forma bolesti (37). Smatra se da je blaži oblik prvenstveno posljedica primarne infekcije, dok je teži oblik bolesti s izraženijim simptomima obično posljedica reinfekcije, ali

i alergijske upalne reakcije stijenke crijeva (edem intestinalnog zida) protiv ličinki i njihovih proteina. Tijek bolesti može biti kompliciran nastankom opstrukcije i potrebe hitnog operativnog zahvata (42).

Najintenzivnije histopatološke promjene su prisutne na mjestu gdje se ličinka nalazi. Radi njene invazije u stijenku sluznice probavnog sustava i lučenja antikoagulantnih tvari dolazi do stvaranja malih hemoragičnih lezija (prve nastaju već nakon sat vremena od zaražavanja), a nakon 4 sata do 6 dana od zaražavanja javljaju se i erozivne lezije (41). Ličinke obično ugibaju u roku od nekoliko dana te se potpuno razgrađuju za otprilike osam tjedana. Tijekom tog razdoblja, ostatci ličinki okruženi su edemom, nekrozom i staničnom upalom koja se sastoji uglavnom od eozinofila, ali također i od neutrofila, limfocita i monocita (lokalni upalni odgovor). Stvaranje fibrinskih naslaga uz pojavnost fibroblasta i eozinofila oko stranog tijela dovodi do formiranja granuloma (51). Tjedan do dva nakon infekcije, radi uklanjanja ostataka ličinki iz organizma, otežano je zaključivanje da je granulom uzrokovao parazit (52).

Perzistencija parazita, kao i posljedično nastajanje granuloma, može biti pogrešno proglašeno tumorom, odnosno nekim drugim kliničkim entitetima upalne etiologije (53).

Granulomatozne tvorbe izazvane *Anisakis* spp. u prošlosti su pogrešno proglašavane tumorima, ali kako je zamijećeno da kod većine pacijenata postupno iščeznu, korišten je izraz "tumori koji nestaju" (54). Sam opseg oštećenja tkiva kao i novonastala reaktivna upala stijenke probavnog sustava tijekom infekcije upućuju na direktno invazivnu ulogu parazita, ali i interakciju između imunološkog sustava domaćina i različitih tvari (antigena) koje izlučuje ili sadrži u sebi ličinka *Anisakis* spp. (41, 55). Zabilježeni su i rijetki slučajevi ektopične anisakijaze, koji uključuju prodor ličinki u tkiva poput ždrijela, jezika, pluća, peritonealne šupljine, jajnika, limfnih čvorova ili gušterače (56, 57).

Provedena istraživanja tumorskog potencijala parazita na animalnom modelu i na epitelnim stanicama, *in vitro*, pokazala su da *Anisakis* spp. može imati kancerogeni učinak (58).

Pa ipak, potencijal parazita za izazivanje kancerogenih promjena, posljedice kronične infekcije u ljudi, za sada nije jasno objašnjen, iako je u literaturi više puta opisano postojanje kronične anisakijaze u pacijenata s karcinomom debelog crijeva (59).

Činjenice da je prevalencija karcinoma želuca kao i anisakijaze najviša u Japanu, mogu govoriti u prilog njihovoj mogućoj povezanosti, ali je tu povezanost potrebno potkrijepiti rezultatima budućih istraživanja (41, 60).

1.3.2. Imunološki odgovor i alergijske reakcije na *Anisakis* spp.

Poznato je da su za imunološki odgovor na parazite odgovorni Th2 limfociti, jednako kao i kod alergijskih bolesti, ali prema dosadašnim spoznajama infekcija parazitima može imati protektivni učinak i umanjiti mogućnost nastanka alergijske reakcije (61, 62).

Tijekom parazitskih infekcija, proizvodnja IgE antitijela ima tendenciju rasta, iako krajnji učinci IgE u organizmu mogu biti različiti i u velikoj mjeri ovisni o odnosima domaćina i parazita (imunomodulatorski učinak). Infestacija parazitom uobičajenog domaćina, bez obzira na porast proizvodnje IgE, ima tendenciju smanjenja alergijskog odgovora domaćina (63). To je posebno primjetno u populacijskim skupinama u pojedinim geografskim područjima s endemski prisutnom helmintijazom (64, 65). Istraživanje na laboratorijskom životinjskom modelu pokazalo je da je ta zaštita posredovana IL-10 i/ili regulatornim T stanicama (66).

Rezultati nekih istraživanja pokazali su suprotno, da infekcija helmintima nema pozitivan učinak na smanjenje atopijske sklonosti organizma, nego je u pozitivnoj korelaciji s pojavnosti alergije (67).

Imunosni odgovor ljudskog organizma na prisutnost ličinke *Anisakis* spp. (neuobičajenog, slučajnog domaćina ovog oblića) vjerojatno se ne razvija jednako odgovoru domaćina koji su koevoluirali s nametnikom (17).

Premda alergijska simptomatologija nije uobičajena za infekcije helmintima, češće se primjećuje kod pojedinih zoonotskih infekcija kao što je anisakijaza (68). Prema nekim autorima, visoki intenzitet infekcije može značajno potaknuti aktivaciju T-regulatornih stanica kao i produkciju citokina, u prvom redu IL-10, te tako pokazati protektivni učinak, dok niska razina infekcije stimulacijom Th2 odgovora pogoršava alergijski odgovor organizma. Ta hipoteza može objasniti zašto *Anisakis* spp. uzrokuje pojavnost alergija u ljudi. Osim što parazit nije prilagođen suživotu s čovjekom, broj infektivnih ličinki parazita koje se konzumacijom ribe unesu u tijelo je obično mali, a sama infekcija je prolaznog karaktera (69).

Prisutnost L3 infektivne ličinke u ljudskom tijelu potiče proizvodnju specifičnih antitijela i niza citokina (69). Antitijela se mogu potvrditi laboratorijskim analizama dva tjedna nakon infekcije, pa dokaz njihove prisutnosti može biti koristan radi postavljanja ispravne dijagnoze za oboljelu osobu (npr. razlikovanje tumorskih tvorbi nejasne etiologije od granuloma nastalih u anisakijazi) (53). Kontakt sa živom *Anisakis* L3 ličinkom može dovesti do senzibilizacije imunosnog sustava i kliničke slike alergije, odnosno pojavnosti alergijskih manifestacija pri svakom novom susretu s parazitom. Prema većini autora, relativno mali broj ličinki (uzročnika)

kojima je izložena većina bolesnika, kao i činjenica da nije došlo do međusobne prilagodbe (slučajni domaćin-nametnik), najvažniji su čimbenici u nastanku alergijske reakcije zbog anisakijaze (70).

Pojedini, osjetljivi pojedinci mogu pokazivati preosjetljivost, čak i nakon konzumacije termički obrađene hrane u kojoj su mrtve ličinke (52). Tada govorimo o alergijskoj/gastroalergijskoj anisakijazi (41, 44, 48). Eozinofilija je uobičajena kao dio obrambenog odgovora domaćina na parazit, ali nije tipična za anisakijazu jer je u manje od 30% slučajeva zabilježena sustavna eozinofilija (41). Alergijske reakcije poput urtikarije, angioedema i anafilaksije uključuju zaseban mehanizam interakcije parazita i domaćina, te se ne javljaju kod svih oboljelih. Pacijenti s alergijskim manifestacijama najčešće se ne sjećaju prethodne, primarne epizode anisakijaze (vjerojatno radi vrlo blagih, slabo primjetnih simptoma). Pojedini znanstvenici smatraju da je primarna epizoda bolesti trebala postojati kao polazište za stvaranje IgE protutijela koja uzrokuju njihove alergijske reakcije, no ostavljaju mogućnost da je primarna infekcija najčešće bila i asimptomatska (70). Snažna reakcija organizma (s povraćanjem i proljevom) obično eliminira parazita iz organizma, što ide u prilog tvrdnji da alergijski odgovor funkcionira kao imunološki obrambeni mehanizam (68). Također je dokazano da postoje razlike u ravnoteži Th1/Th2 imunosnog odgovora kod pacijenata senzibiliziranih na *A. simplex* u odnosu na kliničku sliku (71).

### 1.3.3. HLA sustav i anisakijaza

Sustav HLA (humani leukocitni antigeni) je glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC) u čovjeka, a molekule HLA sustava služe kao membranski proteini koji predočavaju antigene imunološki kompetentnim stanicama i ključni su za pokretanje imunološke reakcije (72). Višekratno je istraživana povezanost sustava HLA i niza bolesti (prvenstveno autoimunih) radi uloge u imunološkom odgovoru organizma i izrazite polimorfije HLA sustava (73).

Molekule HLA razreda II (HLA-DR, -DQ i -DP) izražene su na ograničenom broju stanica (B limfociti, dendritične stanice, monociti i makrofagi), ali ih je također moguće inducirati interferonom gama (IFNγ) na drugim stanicama, kao što su endotelne stanice za vrijeme upalnog odgovora. Ove molekule prezentiraju izvanstanične peptide (antigene) CD4+ pomoćničkim T stanicama (74). HLA razred I i II proteina ima važnu ulogu u prilagodbi imunološkog sustava čovjeka radi adekvatnog imunološkog odgovora na patogen, pa zbog toga može biti i čimbenik genetske prijemčivosti na *Anisakis* spp.

Svaka osoba je nositelj pojedinih HLA genskih varijanti, ili alela, na kromosomu, pa se pojam haplotipa odnosi na skup svih prisutnih HLA gena osobe na jednom kromosomu u cjelini (74). Pojavnost alergijskih simptoma u 11 osoba nakon konzumacije ribljeg obroka, opisano u radu Kasuya i suradnika, pokazalo je da su svi oboljeli imali i genetsku predispoziciju za prijemčivost na parazit u vidu prisutnih pojedinih alela HLA razreda II, neuobičajenih za stanovništvo Njemačke i Francuske, ali frekventnih u stanovnika Japana (75).

Rezultati drugih istraživanja također govore u prilog povezanosti pojedinih haplotipova kao što su HLA-DRB1*15:02, HLA-DQB1*06:01 s obolijevanjem od anisakijaze (Sanchez-Velasco i suradnici) (76).

Slično su pokazali Guarneri i suradnici u svojoj studiji kada su utvrdili da Ani s 2 i Ani s 3 alergeni sadrže vezno mjesto za HLA-DRB1*04:04, što također može upućivati na povezanost pojedinih alela s pojavnošću ove zoonotske bolesti (77).

### 1.3.4. Oblić *Anisakis* spp., skriveni alergen u hrani

Dokazano je da su alergeni skriveni u hrani uzrok više od četvrtine svih alergijskih reakcija na hranu (78).

Parazit *Anisakis* spp. se smatra jednim od najznačajnijih skrivenih alergena u hrani, a odgovoran je za oko 10 % prethodno nerazjašnjenih idiopatskih anafilaksija kao i značajan broj urtikarija u odrasloj populaciji (79).

Također, humana infekcija uzrokovana *Anisakis* spp. trenutno je jedini poznati slučaj gdje helmint ujedno ima ulogu i skrivenog alergena iz hrane (80). Senzibilizirani pacijenti mogu reagirati na prisutne *Anisakis* spp. antigene (alergene), ne samo u termički obrađenoj ili smrznutoj hrani morskog porijekla, nego i na male količine antigena radi drugih puteva izlaganja kao što su kontakt s kožom ili udisanjem alergena (45). Stoga imunološki odgovor na *Anisakis* spp. treba promatrati s oba aspekta: prisutnosti same ličinke L3 (parazita) u organizmu i alergena oblića (38).

Javnozdravstvena uloga ovog parazita kao važnog čimbenika u etiologiji sistemskih alergijskih reakcija (angioedem, urtikarija ili anafilaksija) prepoznata je tek posljednjih petnaest godina (70).

Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) je u svom znanstvenom mišljenju o procjeni rizika radi prisutnosti parazita u hrani koja spada u proizvode ribarstva potvrdila da kod

osjetljivih pojedinaca *A. simplex* može izazvati dva glavna klinička odgovora: gastro-alergijsku anisakijazu i alergijsku reakciju (17).

Iako su termička obrada odnosno smrzavanje sirove ribe prema važećim preporukama najučinkovitiji postupci za uništavanje infektivnih ličinki parazita, te fizikalne metode nemaju učinak na alergijski potencijal parazita. Alergeni *Anisakis* spp. su iznimno otporni na visoke i niske temperature, pa još uvijek nema preventivne mjere koja bi u potpunosti zaštitila konzumenta od mogućnosti nastanka alergije na ovog oblića (17).

*Anisakis simplex* alergija nastala nakon konzumacije skuša prvi put je opisana 1990. u Japanu. Svih 11 oboljelih osoba s kliničkom slikom urtikarije imali su pozitivnu reakciju na *Anisakis simplex* L3 antigene, a nijedna osoba nije reagirala na antigene mesa skuše (75). Anafilaksija izazvana istim nametnikom zabilježena je 1995. godine u Španjolskoj. Pacijentica 52 godine stara, imala je četiri epizode anafilaksije praćene povraćanjem, bolovima u trbuhu i proljevima, svaki put nakon konzumacije morske ribe (oslić) (81). Prema rezultatima epidemiološke studije iz Japana, Morishime i suradnika, parazit *Anisakis* je glavni uzrok anafilaksije stanovnika priobalja te države (82).

Premda je konzumacija morske hrane kontaminirane ovim parazitom najčešći razlog alergijskih manifestacija, interesantan je znanstveni rad u kojem je opisana pojava alergijske kliničke slike u osam pacijenata nakon konzumacije piletine. U svih oboljelih dokazana je senzibilizacija na *Anisakis simplex* antigene. Značajno je da tijekom uzgoja svakodnevna prehrana peradi ima i visok udio riblje hrane („riblje brašno“) koja može biti kontaminirana nametnikom i indirektno izazvati anisakijazu u ljudi (83).

Noviji znanstveni radovi posebno ističu osobe bez kliničkih simptoma bolesti, ali s dokazanim anti-*Anisakis* IgE antitijelima u cirkulaciji koja mogu biti prisutna niz godina u senzibiliziranih pacijenta, te mogu potaknuti pojavnost alergijske slike anisakijaze nakon ponovljenih unosa ličinke L3 stadija u organizam hranom, čak i termički obrađenom (45, 84).

Alergijsku reakciju nakon konzumacije hrane iz mora koja sadrži nametnika ili njegove antigene, mogu izazvati somatski ili ekskretorno-sekretorni (ES) produkti *Anisakis* ličinki. Do sada je dokazano postojanje 14 *Anisakis simplex* alergena (nazvani Ani s 1 do 14), koji uglavnom pripadaju skupini ekskretorno-sekretornih produkata nametnika (13).

Serološke laboratorijske analize uzoraka krvi kod pacijenata s alergijskim manifestacijama anisakijaze pokazale su najčešće reakciju na Ani s 1, Ani s 5 i Ani s 7, glavne antigene (alergene) nametnika. Protein Ani s 1 identificiran je u 87% pacijenata koji su razvili kliničku

sliku kao rezultat prethodne infekcije parazitom (85). Ani s 7 je ekskretorni antigen, detektiran u akutnoj fazi u 100% pacijenata s alergijama uzrokovanim nametnikom (86).

Prema rezultatima ImmunoCAP testa u radu španjolskih autora, određivanje specifičnih IgE antitijela Ani s 1 i Ani s 7 pokazalo je različite obrasce senzibilizacije između alergičnih i asimptomatskih osoba, te je alergen Ani s 1 prihvaćen kao mogući biomarker za otkrivanje pacijenata u riziku od ozbiljnih alergijskih reakcija (87). Potvrđeno je da je Ani s 7 protein prisutan u akutnoj (početnoj) fazi u svih pacijenata s alergijskim manifestacijama na *Anisakis* spp. (86, 87).

Kontakt s parazitom izaziva proizvodnju specifičnih IgE antitijela protiv parazita; stoga prisutnost specifičnog IgE ili pozitivan kožni test izravno ukazuje na senzibilizaciju organizma. Rezultati kohortnog istraživanja djece koja žive u regiji Italije gdje je prisutna „endemska" preosjetljivost na *Anisakis* spp. radi tradicijski česte konzumacije mariniranih inćuna, pokazali su da je više od 4,5% djece bilo prethodno senzibilizirano, jednako kao i u odrasloj populaciji, a prema rezultatima prethodne multicentrične studije na odraslim stanovnicima (10 570 ispitanika) (88, 89).

Dijagnoza alergijske (gastroalergijske) anisakijaze treba biti dopunjena kad god je to moguće anamnestičkim podatcima o konzumaciji ribe (17, 41, 90).

Termostabilni antigeni nametnika izazivaju isti stanični odgovor kao i ukupni proteinski ekstrakt *A. simplex*, što potvrđuje postojanje rizika prilikom konzumiranja i termički (ne samo sirove) obrađene ribe u kojoj se nalazi parazit (71).

Deskriptivna, presječna studija Caballera i suradnika, pokazala je kliničke i imunološke razlike u prisutnosti IgE antitijela u odnosu na pet odabranih antigena parazita među pacijentima senzibiliziranima ili alergičnima na parazit iz Italije i Španjolske. Najučestalija je u obje populacije bila reakcija na Ani s 1 alergen. Svi španjolski pacijenti s alergijom su bili pozitivni na barem jedan od alergena, dok je samo 76,2% talijanskih pacijenata reagiralo na neki od testiranih antigena. Ujedno je među talijanskim pacijentima zabilježeno značajno više gastrointestinalnih simptoma, a među španjolskim više urtikarije, angioneurotskih edema ili anafilaksija. Autori su razlike objasnili učestalijom izloženosti Španjolaca parazitu jer je anisakijaza kod njih prisutnija nego u Italiji, pa opetovani susret s ličinkom i njezinim ES produktima omogućava razvoj alergijske reakcije (91).

## 1.4. Javnozdravstveni aspekti anisakijaze

Sposobnost parazita za širenje na različite morske organizme dovodi do stvaranja mreže potencijalnih domaćina u bilo kojem dijelu svijeta. Stoga je prisutnost parazita u proizvodima ribarstva u porastu, što utječe i na učestaliju mogućnost kontakta parazita i čovjeka, slučajnog domaćina, te tako povećava populacijski rizik za anisakijazu.

### 1.4.1. Utjecaj parazita na sigurnost hrane, proizvoda ribarstva

Potreba učinkovite kontrole prijenosa *Anisakis* spp. (i drugih nametnika) putem hrane iz mora izazovna je zbog niza otegotnih čimbenika kao što je intenzivan cjelogodišnji međunarodni turizam praćen povećanim interesom za konzumaciju hrane izvan kuće, u restoranima ili na uličnim štandovima (92). Velik interes kupaca diljem svijeta za cjelovitom, svježom ribom na ledu, bez evisceracije nakon izlova, dodatno dovodi konzumente u veći rizik za nastanak anisakijaze (92). Rezultati meta-analize Fiorenza i suradnika pokazali su značajno povećanje *Anisakis* spp. ličinki (prosječan broj crva/riba) u razdoblju od 53 godine, od 1962. do 2015., a bez značajnih promjena u brojnosti *Pseudoterranova* spp. u razdoblju od 37 godina (od 1978. do 2015.). Autori ističu činjenicu da povećanje prisutnosti *Anisakis* spp. može imati posljedice na zdravlje ljudi, zdravlje morskih sisavaca i isplativost djelatnosti ribarstva (93).

Prevencija i zaštita od zoonotičnih nametnika prenosivih putem proizvoda ribarstva postala je prioritetnom aktivnosti ne samo zbog potencijala parazita za izazivanje bolesti u ljudi, nego i negativnog utjecaja na kvalitetu i komercijalnu vrijednost ribe u prodaji (94). U Sjedinjenim Američkim Državama, većina slučajeva anisakijaze je posljedica konzumacije divljeg lososa, dok je u Europi razlog konzumacija haringe, srdele, oslića, inćuna i skuše, sirovih ili neadekvatno termički obrađenih (95).

U zemljama Europske unije putem RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) sustava objavljeno je od 1979. do 2019. godine 546 upozorenja za 13 država Unije radi infestacije *Anisakis* spp. proizvoda ribarstva. Najveći broj notifikacija zabilježen je u razdoblju od 2011.-2019. godine, uglavnom radi ribe i ribljih proizvoda iz Španjolske. Značajan broj obavijesti odnosio se na zabranu izvoza infestirane ribe i drugih proizvoda ribarstva izvan granica domicilnih država, a parazit je najčešće bio nađen u ribljim komercijalnim vrstama kao što su skuša ili oslić (96). Glavni cilj meta-analize koju je provela skupina belgijskih autora bila je procjena prevalencije i intenziteta prisutnosti *Anisakis* spp. u zemljama koje izvoze ribu na belgijsko tržište. Rezultati su pokazali rasprostranjenost parazita s velikom varijabilnošću u

prevalenciji između vrsta riba i polja za ribarenje, pa tako bakalar (*Gadus morhua*) i atlantski losos (*Salmo salar*), najčešće konzumirane vrste ribe u Belgiji, imaju prosječnu prevalenciju od 33% odnosno 5%, a od svih istraživanih ribolovnih zona, riba ulovljena u sjeveroistočnom Atlantiku ima najveću stopu zaraze (68 %) (97).

Stoga prisutnost *Anisakis* spp. ličinki u hrani morskog porijekla ugrožava ne samo kvalitetu i sigurnost hrane, nego predstavlja i ozbiljan razlog za zabrinutost potrošača (98).

Socio-ekonomski aspekt također nije zanemariv, jer učestala odbacivanja proizvoda ribarstva od strane prodavača i potrošača mogu proizvesti značajne negativne učinke na promet ribe i ribljih proizvoda na nacionalnim i međunarodnim tržištima, uz rast nepovjerenja potrošača u proizvode ove grane industrije (28, 92). Iznesena zapažanja mogu biti povezana s ekonomskim deficitima i gubitkom radnih mjesta u ribarstvu, a što je već zabilježeno u Njemačkoj 1987. godine tijekom poznate „krize nematoda“. (99).

U dijelovima svijeta gdje su komercijalne riblje vrste (npr. inćun u Jadranskom moru) učestalo infestirane parazitom, može se očekivati i indirektan, negativan, dugoročan utjecaj na stopu potrošnje ribe po stanovniku (100).

Stoga je grupa autora 2018. godine provela internetsku anketu kako bi se istražili stavovi i mišljenja potrošača proizvoda ribarstva u Španjolskoj o prisutnosti *Anisakis* spp., kao i pridruženih bolesti (tj. anisakijaze i alergija na hranu) (101). Rezultati istraživanja pokazali su da je većina potrošača (77%) spremna platiti više za *Anisakis* „free” riblji proizvod (bez nametnika), te da je više od četvrtine potrošača (>25%) prethodno izbjegavalo kupnju i/ili konzumiranje proizvoda ribarstva zbog prisutnosti parazita. Ovi nalazi podupiru pretpostavku da prisutnost nametnika u ribi, osim što je ugrožavajuća za ljudsko zdravlje, radi odbojnosti kupaca prema vidljivim ličinkama dovodi do izbjegavanja kupnje i uvrštavanja ribe u svakodnevnu prehranu, iznimno kvalitetnog i relativno pristupačnog izvora proteina (101).

Svjetske standarde proizvodnje hrane definira *Codex Alimentarius* (CA), kodeks o hrani koji su izradile Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO). Standardi i odgovarajući načini ponašanja u praksi, opisani u tom dokumentu, mjerila su sigurnosti i kvalitete prema kojima se evaluiraju nacionalne mjere i propisi unutar zakonskih okvira Svjetske trgovinske organizacije (WTO). To podrazumijeva da u proizvodnji hrane postoje osnovna načela koja svaka država i svaki proizvođač mora poštovati. Između ostalog, u pravilniku je navedeno za slane haringe (*C.harengus*) i drugu sitnu, usoljenu ribu, da se održivost nematoda ispituje umjetnom digestijom s magnetskim

centrifugiranjem, te da termička obrada ribe na temperaturi od 60°C i više najmanje 1 minutu, odnosno zamrzavanje na temperaturi nižoj od -20°C najmanje 24 sata, uništava parazita (102). Iako su preporučeni fizikalni algoritmi zamrzavanja i termičke obrade ribljih proizvoda prema definiranim uvjetima (EFSA, 2010.) preventivne metode koje jamče uništavanje ličinki *Anisakis* spp., problem inaktivacije alergena koji sadrži ličinka nametnika i dalje je prisutan (17, 41).

Kako bi se rizici vezani uz hranu morskog porijekla smanjili na najmanju moguću mjeru ili potpuno uklonili, Opća uprava Europske komisije za zdravlje i potrošače izradila je „Vodič o primjeni procedura HACCP-a" (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), čija primjena potiče proizvođače na kontinuirano praćenje i analiziranje procesa proizvodnje od sirovog materijala do finalnog proizvoda i njegove dostave potrošaču („od mora do stola"), te prepoznavanje potencijalne opasnosti koje bi se mogle pojaviti u lancu proizvodnje i opskrbe (97). Sigurnost hrane predstavlja središnje pitanje globalnog prehrambenog lanca i nedjeljiva je s ljudskim zdravljem. Programi osiguranja kvalitete namirnica temelje se na stalnom praćenju sirovina, procesu proizvodnje, skladištenju i distribuciji krajnjih proizvoda, uključujući i svrhu za koju su namijenjeni. Takvi programi predstavljaju važan cilj za proizvođače hrane, ne samo zbog potencijalnog rizika po zdravlje ljudi, već i zbog ekonomskih gubitaka kojima mogu biti izloženi (103).

Nakon što se uoče sve potencijalne opasnosti i mjesta na kojima bi se mogle dogoditi, svaki proizvođač hrane ima obvezu kvalitetne prosudbe njihove važnosti, a radi konačne procjene rizika povezanog s prisutnim opasnostima. Ako je uočena opasnost značajna i s vjerojatnosti da će se ponoviti, to sigurno predstavlja rizik za zdravlje potrošača.

Utemeljeno na analizi procjene rizika implementira se HACCP plan s prikazanim kritičnim kontrolnim točkama duž cijelog lanca, od početka proizvodnje pa do konačnog potrošača. Analiza potencijalnih, prisutnih rizika, kao i sve mjere za njihovo otklanjanje, uz plan nadzora provođenja, mora dokumentirati i zabilježiti odgovorna osoba, a svi podaci moraju biti dostupni nadležnim tijelima za provjeravanje standarda sigurnosti, higijene i zdravlja (97).

Zakonska obveza u EU za sve koji sudjeluju u izlovu, trgovini ili preradi ribe (EU Commission Regulation EC No. 2074/2005) je provedba vizualnog pregleda cijele trbušne šupljine ribe (uključujući unutrašnje organe) od strane kvalificiranih osoba radi kontrole rizika koji predstavlja prisutnost nametnika, a sve radi veće sigurnosti kupaca proizvoda. Ako individualni

pregled nije moguć, potreban je plan uzorkovanja prema postojećim službenim naputcima (HACCP plan) (104).

Osvjetljavanje, odnosno vizualni pregled ribljih fileta ili ribljih proizvoda na osvijetljenom stolu u tamnoj sobi, standardan je način inspekcije proizvoda u tvornicama za preradu ribe, premda rezultat provedene pretrage uvelike ovisi o osposobljenosti osobe zadužene za provođenje (105). Unatoč nedostacima, vizualni pregled ribe se koristi kao rutinska kontrola u svrhu detekcije i eliminacije vidljivih nametnika iz fileta mesa ribe, posebno većih i skupljih riba (losos) prije nastavka daljnje obrade (106). Posljednjih godina, uvođenjem novih, modernijih metoda koje se koriste za inspekciju ribe i ribljih proizvoda radi otkrivanja prisutnosti *Anisakis* ličinki, znatno je povećana učinkovitost detekcije nametnika. Tako je metoda osvjetljavanja u odnosu na dvije novije metode (peptička digestija i UV kompresijska metoda) pokazala znatno lošije rezultate u otkrivanju prisutnosti ličinka parazita u mišićju ribe (104).

Levsen sa suradnicima je u svom istraživanju utvrdio da je metoda osvjetljavanja dokazala samo 7-10% od ukupno prisutnih ličinki nametnika prisutnih u filetima tri riblje vrste u odnosu na broj utvrđen kompresijskom metodom s korištenjem ultraljubičastog svjetla (105). EFSA je također u svom dokumentu 2010. godine naglasila da je nedestruktivna metoda vizualnog pregleda uz osvjetljavanje mesa ribe manje učinkovita, pogotovo za detektiranje ličinki dublje utisnutih u tkivo ribe, nego što su to destruktivne metode umjetne peptičke digestije ili UV-kompresijska metoda (17, 106).

### 1.4.2. Senzibilizacija na *Anisakis* spp. stanovništva

Anisakijaza je kozmopolitska bolest te je prisutna gotovo na svim kontinentima (Azija, Europa, Afrika, Sjeverna i Južna Amerika…) (22).

Iako je vidljivo da su se stope senzibilizacije na *Anisakis* spp. u ljudi diljem svijeta povećale, do danas nisu jasno utvrđeni kvalitetni dijagnostički kriteriji kao ni laboratorijski algoritmi potrebni za detektiranje anisakijaze, pa ta bolest i dalje predstavlja nedovoljno prijavljen zdravstveni problem čije kliničke manifestacije, ako su prisutne, oponašaju znatno češće alergijske ili probavne smetnje. Vrlo je važno postavljanje ispravne dijagnoze radi mogućih javnozdravstvenih intervencija u populacijama s visokim rizikom izloženosti parazitu te prilagodbe zdravstvenih usluga određenim, izloženim skupinama stanovništva jer pogrešne dijagnoze dovode do provođenja niza beskorisnih pretraga povezanih sa značajnim troškovima

zdravstvene zaštite (107). Zbog značajnog povećanja ljudske mobilnosti i globalnog prijevoza svježih proizvoda poput ribe na ledu, prisutan je porast infekcija koje se prenose hranom, a time i potreba edukativnih kampanja u javnosti s obzirom na javnozdravstvene prijetnje prisutne u raznim dijelovima svijeta (108).

U Europi je najveći broj slučajeva zabilježen u Španjolskoj, Italiji, Francuskoj, Nizozemskoj, Velikoj Britaniji, državama koje imaju veliku vrijednost *per capita* konzumacije ribe i ribljih proizvoda (9, 10, 11, 12). Premda su epidemiološki podatci nekonzistentni, iz literature je vidljivo da je do 2010. godine prijavljeno diljem svijeta oko 20.000 slučajeva anisakijaze, od čega više od 90% u Japanu (2.000-3.000 slučajeva godišnje), gdje je bolest učestalija u priobalnoj populaciji i kod ljudi uključenih u riboprerađivačku industriju (17, 109). Prema sustavnom preglednom članku Rahmatija i suradnika, najviša stopa alergijske anisakijaze je zabilježena u Portugalu i Norveškoj s prevalencijom između 18,45% i 22,50%, pa autori smatraju da bi zdravstveni profesionalci trebali uzeti u obzir alergijsku anisakijazu kao važno javnozdravstveno pitanje, posebno u zemljama visokog rizika u kojima je dokazana velika zastupljenost parazita u morskim vrstama (110).

Javnozdravstveni značaj parazitskih bolesti koje se prenose hranom prepoznala je i Svjetska zdravstvena organizacija, te su WHO/FAO još 2012. godine zajednički napravili procjenu rizika i priredili listu prioritetnih parazitskih bolesti koje se prenose hranom, a sve kako bi se uspostavio učinkovit sustav praćenja tih zoonoza na globalnoj razini. Prema prethodno zadanim kriterijima, anisakijaza je rangirana među prvih pet za sjevernu i jugozapadnu Europu, te među prvih deset u svim europskim regijama (111).

Na žalost, u zdravstvenim krugovima većine zemalja anisakijaza je podcijenjena i često neprepoznata, osim u Japanu i Španjolskoj, u čijim nacionalnim kuhinjama središnje mjesto zauzimaju riba i plodovi mora, a koji se konzumiraju najčešće sirovi ili vrlo kratko termički obrađeni. Bao sa suradnicima je prije pet godina proveo prvu kvantitativnu analizu rizika od *Anisakis* infekcije u Španjolskoj, u kojoj je procijenjeno da oko 7.700-8.320 slučajeva anisakijaze ostaje neprepoznato. Za usporedbu, broj službeno godišnje prijavljenih slučajeva u Španjolskoj je između 3,87 do 19,3 na 100.000 stanovnika (112).

Serano-Moliner je s grupom autora u sustavnom preglednom članku o epidemiologiji hranom prenosivih parazitarnih bolesti u EU (2000.-2016.) zabilježio ukupno 236 autohtonih klinički dokazanih anisakijaza, uglavnom u Španjolskoj (66,9%) i Italiji (28,4%) (113). Ipak, prevladava mišljenje da je podcijenjen broj stvarnih slučajeva anisakijaze, što je prisnaženo

podatcima iznesenima u članku Cavallera i suradnika, koji su prikazali 370 kliničkih slučajeva prema podatcima iz kartona bolničkih otpusta u Italiji tijekom deset godina (2005.-2015.) (114).

Autori retrospektivne studije o anisakijazi u Francuskoj (2010.-2014.) su prezentirali podatke o 37 pozitivnih pacijenata prema dostupnim bolničkim kartonima (115). Prema rezultatima brazilske studije, u 19,6% testiranih žena nakon poroda, potvrdio se prethodni kontakt s parazitom (116).

Neprepoznavanju anisakijaze pridonosi nespecifičnost i raznolikost simptoma. Često, prisutna klinička slika u oboljele osobe nije adekvatno popraćena potrebnom dijagnostičkom obradom. Pogrešno protumačene kliničke manifestacije (najčešće simptomi vezani uz gastrointestinalni sustav) kao i najčešće nezabilježeni anamnestički podatci o konzumaciji sirove ili neadekvatno termički obrađene morske hrane, tijekom liječničke obrade dovode do rijetkog dijagnosticiranja anisakijaze, a time i kontinuiranog podprijavljivanja broja oboljelih (17, 117). Anketno istraživanje provedeno među liječnicima obiteljske medicine u Australiji potvrdilo je nisku razinu znanja i osviještenosti zdravstvenih profesionalaca (unatoč dostupnim znanstvenim radovima) o opasnostima po ljudsko zdravlje vezanima uz parazite koji se prenose hranom morskog porijekla (15). Korisne mjere za suzbijanje anisakijaze bile bi uspostava nacionalnog registra slučajeva, pokretanje javnozdravstvenih edukativnih kampanja za javnost te kampanje podizanja svijesti i osposobljavanja zdravstvenih djelatnika (118).

U Hrvatskoj je u medicinskim krugovima bolest uglavnom potpuno nepoznata i zanemarena, iako postoji zabilježena sporadična pojavnost anisakijaze. Do sada su samo dva slučaja opisana u literaturi. Mladineo sa suradnicima je korištenjem molekularnih metoda potvrdila L3 ličinku u parafinskom preparatu sigmoidnog dijela debelog crijeva starije ženske osobe koja je bolovala od maligne bolesti (119). Iako u slučaju 14-godišnjeg dječaka koji je tri dana nakon konzumacije sušija doživio opstrukciju tankog crijeva, s edemom i eozinofilnom infiltracijom u području crvuljka, nije dokazana infektivna L3 ličinka, klinička dijagnoza je bila anisakijaza (120). Pilot istraživanje koje su proveli Mladineo i Poljak na 500 ispitanika Dalmatinske zagore, priobalja i otoka, pokazalo je ukupnu seroprevalenciju titra *Anisakis* spp. IgE antitijela u krvnom serumu zdravih osoba oko 2%, s najvišom prevalencijom na otocima od 3,5% (18). Istraživanja provedena u drugim zemljama Europe dokazala su znatno učestaliji prethodni dodir ispitivanih osoba s nametnikom (Norveška 6,6%, Španjolska do 22,1%, Italija 15,4%) (19, 20, 21). Razloge ipak nešto učestalijeg prijavljivanja anisakijaze posljednjih petnaestak

godina u većem dijelu svijeta možemo pripisati internacionalizaciji jela azijske i drugih egzotičnih kuhinja, s jedne strane, ali i dostupnosti boljih dijagnostičkih alata te većoj osviještenosti javnosti o prisutnosti anisakijaze, s druge strane (39).

### 1.4.3. Profesionalno izložena populacija

Industrija prerade ribe kao i uzgoja ribe i školjkaša zapošljava više od 60 milijuna radnika u svijetu (121). Djelatnici zaposleni u tom industrijskom sektoru svakodnevno su na svojim radnim mjestima izloženi različitim štetnim okolišnim čimbenicima kao što su: hladnoća, pretjerana vlažnost zraka, organski aerosol. Ne smije se zanemariti ni mogućnost kontaktne izloženosti različitim alergenima vezanima uz ribu koja se prerađuje. Kao rezultat profesionalne izloženosti mogu se javiti pojedine bolesti praćene različitom simptomatologijom, od respiratornih smetnji pa do kožnih promjena (122). Smatra se da ta populacija (ribari, radnici u tvornicama, prodavači ribe, kuhari) može imati značajan profesionalni rizik izloženosti parazitu *Anisakis* spp. (123).

Peta po veličini u svijetu je riboprerađivačka industrija Europske unije s godišnjom preradom oko 5 milijuna tona ulovljenih divljih riba, a taj industrijski sektor omogućava posao za više od 275.000 stanovnika. Osim proizvodnje, EU je 2014. godine uvezla ribe i ribljih prerađevina u vrijednosti od oko 21 milijardu eura, što predstavlja više od 40% vrijednosti svjetskog uvoza ribe. Premda zbirni statistički podatci o potrošnji ribljih proizvoda u zemljama članicama EU pokazuju uzlazni trend, godišnja stopa potrošnje po glavi stanovnika varira od 5,3 kg u Mađarskoj, do 56,8 kg u Portugalu (124, 125).

Prema podatcima Državnog zavoda za statistiku (2017.), u Hrvatskoj je 1149 radnika bilo zaposleno u sektoru riboprerađivačke industrije, uglavnom u priobalju (izlov i prerada morske ribe čine oko 2/3 ukupne proizvodnje) (22). Iako znatno manji broj ljudi radi u toj industrijskoj grani u odnosu na druge mediteranske europske zemlje, hrvatska riboprerađivačka industrija je vrijedan segment industrije kako na nacionalnom, tako i na međunarodnom tržištu, s godišnjim prihodima od 112 milijuna dolara (126). Prisutnost ličinki L3 *Anisakis* spp. u ribi koja je ulovljena u Jadranu i predviđena za izvoz iz Hrvatske u druge zemlje, uzrokuje nemogućnost eksporta takve ribe na granicama Europske unije (EC RASFF, 2019) (127).

Porast proizvodnje i prerade hrane morskog porijekla kao odgovora na povećanu globalnu potražnju za kvalitetnim i lako dostupnim izvorom proteina, naglasilo je obvezu učinkovitijeg praćenja zdravlja zaposlenika te grane industrije uz posljedično, učestalije bilježenje njihovih

zdravstvenih problema kao što su rino-konjuktivitis, astma, kožne promjene te anafilaksija, vezanih uz profesionalnu izloženost alergenima iz ribe (123, 128). Povezanost nastanka astme radi profesionalne izloženosti, uzrokovane *A. simplexom*, temeljeno na *in vivo* i *in vitro* testovima, potvrdili su Armentia i suradnici prije više od dvadeset godina (129). Zaposlenici mogu biti neposredno izloženi alergenu (dodirom, zrakom) na svom radnom mjestu tijekom proizvodnog procesa, ali i posredno, konzumacijom sirove ili nedovoljno termički pripremljene hrane (obrok tijekom radnog vremena).

Prema sustavnom pregledu Mazzuca i suradnika objavljenom 2018. godine, do sada je vrlo mali broj istraživanja u fokusu imao profesionalno izloženu populaciju ovom parazitu: svega tri studije su uključile kao ispitanike profesionalno izložene radnike riblje industrije, a jedno istraživanje osim ribara uključivalo je i stanovnike iz dva obalna grada u Maroku (130). Istraživanje provedeno na Siciliji pokazalo je prisutnost specifičnih IgE antitijela u 20,2% ispitanika, uz višu seroprevalenciju u ribara i mornara (6,7 puta) u odnosu na radnike u tvornicama za preradu ribe, dok je učestalost kontakta putem kože bila jednaka (128). Rezultati istraživanja provedenog u Maroku uz seroprevalenciju od 5,1%, nisu pokazali povezanost senzibilizacije među ispitanicima (stanovnici dva grada na obali i ribari) u odnosu na spol, dob ili profesionalnu izloženost (131).

Dosadašnji znanstveni radovi su alergije na *Anisakis* spp. rijetko postavljali kao odgovor na profesionalnu izloženost alergenu na radnom mjestu u odnosu na izloženost nametniku tijekom konzumacije sirove ili nedovoljno termički obrađene hrane morskog porijekla. Svejedno, takva vrsta izlaganja može biti razlog povremenoj radnoj nesposobnosti zbog bolesti, te posljedične odsutnosti s radnog mjesta (132). Posljednje desetljeće industrija prerade ribe diljem svijeta bilježi stalni rast, pa sve više zaposlenika može na svojim radnim mjestima biti izloženo parazitu. Unatoč tome, još uvijek je profesionalna alergija na *Anisakis* spp. nedovoljno istražena i neprepoznata (17, 69).

# 2. HIPOTEZE I CILJEVI

## 2.1. Hipoteze

1. Populacija djelatnika riboprerađivačke industrije koji su profesionalno izloženi (prvenstveno izlovljenim ribama iz mora) vjerojatno ima veću seroprevalenciju anti-*Anisakis* spp. IgE antitijela od radne populacije u Hrvatskoj koja nije profesionalno uključena u ribopreradivačku industriju.

2. Senzibilizacija na *Anisakis* spp. alergene kod djelatnika riboprerađivačke industrije možda je povezana s profesionalnom izloženosti, ali i s aktivnostima tijekom slobodnog vremena (ribolov za osobne potrebe).

## 2.2. Ciljevi

1. Utvrditi seroprevalenciju specifičnih IgE antitijela na *Anisakis* spp. u profesionalno izloženoj populaciji djelatnika riboprerađivačke industrije

2. Utvrditi okolišne rizične čimbenike povezane sa senzibilizacijom radnika na *Anisakis* spp.

3. Utvrditi genetičke čimbenike, alele lokusa HLA razreda II koji su povezani sa senzibilizacijom radnika na *Anisakis* spp. (genetska predispozicija)

# 3. METODE I MATERIJALI

## 3.1. Etička načela

Za provođenje istraživanja dobivena je prethodno suglasnost Etičkog povjerenstva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo (Etičko povjerenstvo Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Klasa: 500-01/14-01/1.). Sudjelovanje u istraživanju bilo je dobrovoljno.

## 3.2. Ustroj istraživanja

Osnova ove doktorske disertacije je provedeno multicentrično, presječno istraživanje s prikupljanjem vlastitih podataka, i dio je znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost, AnGEL projekt (*Anisakis* spp: Genomic, Epidemiology,) broj 5576, voditeljica projekta: prof. dr. sc. Ivona Mladineo, dr. vet. med.

U istraživanje su bili aktivno uključeni: Službe za epidemiologiju i mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, Zavod za transfuziju KBC Split, Medicinski fakultet u Splitu, Departamento de Parasitologia, Universidad Complutense, Madrid, Španjolska, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago-CHUS, Santiago de Compostela, Španjolska. U istraživanju su sudjelovali stručnjaci različitih profila: liječnici specijalisti epidemiologije, infektologije, alergologije, statističar, molekularni biolozi, doktori veterine, diplomirani sanitarni inženjer, laboranti i medicinska sestra.

Samo istraživanje sastojalo se od dva dijela. Terenski dio je obuhvaćao odlaske u tvornice za preradu morske ribe u Splitsko-dalmatinskoj županiji (na Braču i Dalmatinskoj zagori), Zadarskoj županiji (Dugi otok i zaleđe), Istarskoj županiji (Rovinj), te na akcije dobrovoljnog darivanja krvi na istim područjima. Drugi dio istraživanja vezan je uz laboratorijske analize prikupljenih uzoraka krvi osoba uključenih u istraživanje.

## 3.3. Ishod istraživanja

Primarni ishod istraživanja je seroprevalencija IgE antitijela na *Anisakis* spp. određena iz uzorka seruma ispitanika laboratorijskom ELISA metodom. Riječ je o kvalitativnoj (DA/NE) varijabli čija se razdioba izražava postotkom.

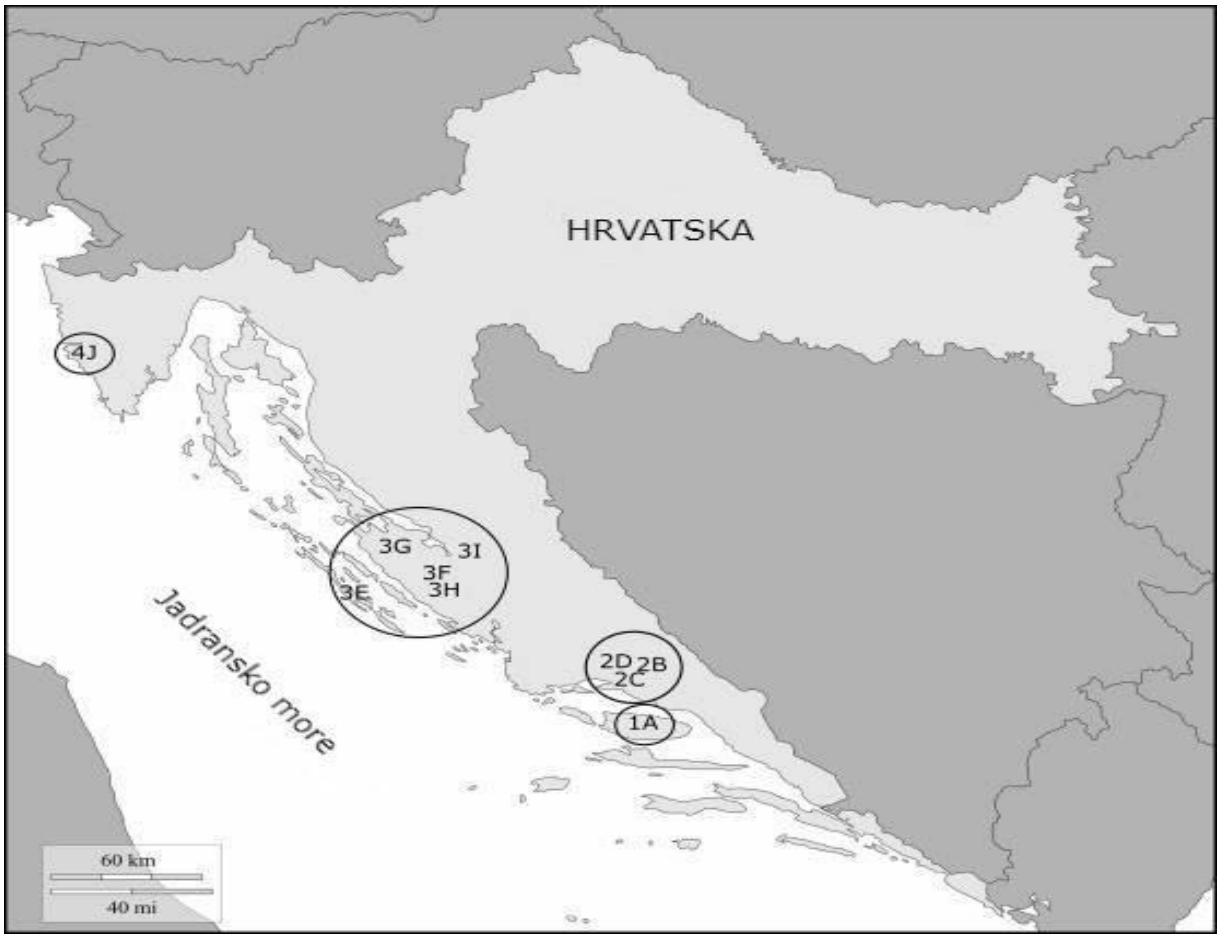
U istraživanju se primarni ishod analizirao u nekoliko različitih konteksta:
a) Utvrđena je razina seroprevalencije IgE antitijela na *Anisakis* spp. u profesionalno izloženoj populaciji djelatnika riboprerađivačke industrije s pripadajućim 95% rasponom pouzdanosti.
b) Analizirana je jakost povezanosti primarnog ishoda sa sljedećim potencijalnim rizičnim čimbenicima za izloženost *Anisakis* spp. Dob je bila jedini kvanititativni čimbenik u analizi, dok su od kvalitativnih čimbenika uključeni: spol, duljina radnog staža u industriji prerade ribe (kategorije s rasponom od po 10 godina), korištenje zaštitne opreme na radu (DA/NE odgovori) - rukavice, maska, naočale, naočale; direktni kontakt s alergenom iz ribe u tvornici (direktan/indirektan/bez fizičkog kontakta), čimbenici vezani uz ponašanje i navike pojedinca - ribarenje u slobodno vrijeme, te tehnike procesuiranja ribe za konzumaciju koju pojedinac koristi kod kuće kao što su mariniranje, usoljavanje, dimljenje, kuhanje, pečenje te konzumacija bez procesiranja (sve DA/NE odgovori); primarno mjesto procesuiranja konzumirane ribe (kod kuće/restoran/trgovina); vrsta prehrane: konzumacija mesa, ribe općenito, konzumacija sirove ribe specifično (DA/NE odgovori); učestalost konzumacije ribe (svakog dana/nekoliko puta tjedno/jednom tjedno/rijetko); vrsta primarno konzumirane ribe (plava riba/bijela riba/slatkovodna riba), te pušenje (pušač/bivši pušač/nepušač). Vrijednosti svih navedenih varijabli, potencijalnih čimbenika rizika, mjerene su upitnikom.
c) Analizirana je jakost povezanosti primarnog ishoda s alelima i haplotipovima HLA lokusa, kao mogućih odrednica genetske predispozicije za anisakijazu. Prisustvo pojedinog alela u ispitaniku (DA/NE) potvrđeno je PCR SSP i SSO metodama u Laboratoriju za HLA tipizaciju tkiva Zavoda za transfuzijsku medicinu KBC-a Split (Križine), dok su se utvrđeni haplotipovi rekonstruirali korištenjem specijaliziranog softvera temeljem utvrđenih alela i vjerojatnosti njihove razdiobe.

### 3.4. Ispitanici

Veličina uzorka je utvrđena putem *EpiTools* softver paketa uz pretpostavku da je anti-*Anisakis* seroprevalencija u djelatnika zaposlenih u sektoru prerade morske ribe u Republici Hrvatskoj oko 2%, kao što je pokazano u prethodnom istraživanju (133).
Prema podatcima Zavoda za statistiku za 2016. godinu, u Republici Hrvatskoj ukupno je zaposleno 1149 radnika u riboprerađivačkoj industriji, od kojih 768 ili 2/3 u preradi morske ribe (134).
Izračunata minimalna veličina uzorka uz marginalnu pogrešku od 1% je 381 ispitanik.

Svi djelatnici su pozvani da se uključe u istraživanje, te se 600 osoba odazvalo sudjelovanju (stopa odgovora 78%). Svi zainteresirani radnici su uključeni u istraživanje kako bi se osigurao dovoljan broj seropozitivnih osoba za sve planirane analize.

U kontrolnu skupinu također je uključeno 446 punoljetnih zdravih osoba iz radno sposobne populacije. Kriterij za uključivanje je bio da ne rade u riboprerađivačkoj industriji, a da žive i rade na području gdje i ispitanici.




Slika 3. Prikaz geografskih područja s oznakama tvornica za preradu ribe čiji su radnici uključeni u istraživanje:

1. Splitsko-dalmatinska županija: A Sardina,
2. Splitsko-dalmatinska županija: B Conex, C Felicita, D Trenton,
3. Zadarska županija: E Sali Mardesic, F Omega Benkovac, G Mislov, H Ostrea, I Noclerius,
4. Istarska županija: J Mirna.

U odabiru osoba za sudjelovanje u istraživanju sudjelovali su djelatnici Nastavnog zavoda za javno zdravstvo te djelatnici Zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Split.

Kriteriji uključenja za djelatnike tvornica za preradu morske ribe bili su: punoljetne osobe koje se smatraju zdravima, žive u jednom od geografskih područja (Splitsko-dalmatinska županija, Zadarska županija i Istarska županija) te rade u nekoj od tvornica za preradu morske ribe. Isključeni su svi oni koji su imali akutnu ili kroničnu zaraznu bolest u vrijeme dok se provodilo istraživanje. Sve osobe uključene u istraživanje su ispunile anonimni upitnik posebno dizajniran za studiju te donirale uzorak krvi radi potrebnih laboratorijskih analiza.

Zdrave, odrasle osobe s boravištem u područjima u kojem žive i ispitanici, a koje su uključene u kontrolnu skupinu, regrutirane su tijekom akcija dobrovoljnog darivanja krvi na spomenutim područjima. Korišten je princip nasumičnog odabira sudionika u istraživanju uz primjenu *SimDis* softvera kojim je stvorena lista od 2500 slučajnih brojeva. Neovisni zdravstveni djelatnici su distribuirali 2500 zatvorenih, neprozirnih omotnica, od kojih je samo polovica sadržavala i poziv za sudjelovanje (donaciju uzorka krvi i ispunjavanje upitnika sa osobnim podatcima i podatcima o zdravstvenom statusu osobe). Kraća verzija upitnika (demografski podatci, štetne navike kao što je pušenje, prisutnost i tip alergijskih manifestacija) bila je predviđena za kontrolnu skupinu ispitanika radi praktičnosti provođenja jer su darivanja krvi događanja s prisutnošću velikog broja ljudi kao i vremenskim ograničenjem.

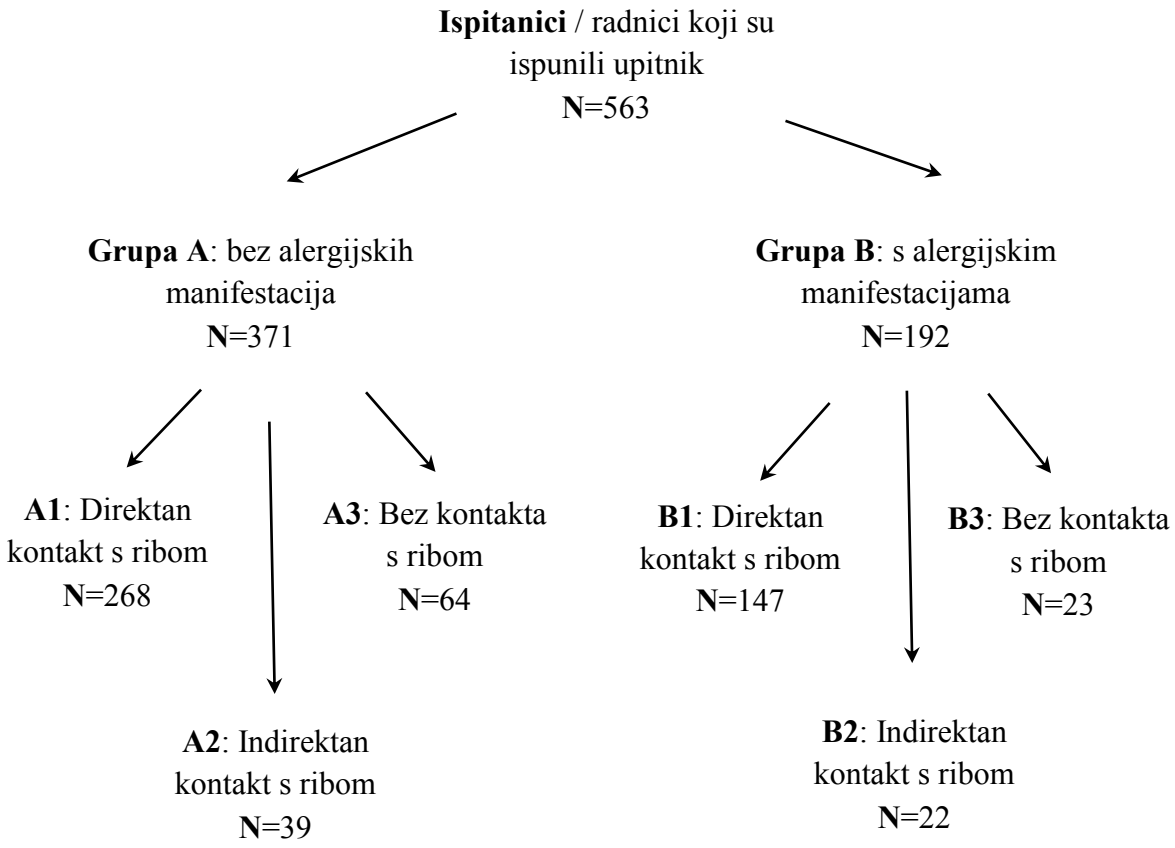
Prikupljanje je prekinuto kada se broj uključenih kontrolnih ispitanika približio broju uzorkovanih radnika u riboprerađivačkoj industriji. Odaziv ispitanika predviđenih za kontrolnu skupinu je bio 36%, što je dvaput više nego u prethodnoj studiji provedenoj u Hrvatskoj.

Istraživanje je provedeno od prosinca 2015. do prosinca 2016. godine. Svaka odrasla osoba uključena u istraživanje pročitala je i potpisala obrazac „Informiranog pristanka za istraživanje“ sa svim potrebnim informacijama vezanima uz sudjelovanje, provođenje i ciljeve istraživanja.

Nakon popunjavanja upitnika (N = 563; 94%), uobličene su dvije skupine ispitanika: grupa A (N = 371; 67%) i grupa B (N = 192; 33%).

Skupina A obuhvatila je ispitanike koji u upitniku nisu prijavili alergijske manifestacije, a skupina B radnike s alergijskim smetnjama. Prema vrstama svakodnevnih radnih zadataka (1 = direktan kontakt s ribom na radnom mjestu; 2 = indirektan kontakt s ribom i 3 = bez kontakta s ribom) podijeljeni su u podskupine: A1 i B1, A2 i B2, A3 i B3.

Dodatno, djelatnici skupine B (s alergijama) podijeljeni su u podskupine prema vrsti alergijskih manifestacija (kožne promjene, rino-konjuktivitis, respiratorne smetnje te dvije i više vrsta alergijskih tegoba) i radnim zadatcima u tvornici gdje rade.




Slika 4. Prikaz po skupinama i podskupinama ispitanika, radnika u tvornicama za preradu ribe, prema samoprijavi alegijskih smetnji i kontaktu s ribom na svom radnom mjestu.

Nakon što su završene laboratorijske analize, svi seropozitivni ispitanici obaviješteni su o rezultatima provedenih pretraga telefonom, te su usmeno upitani (prema sjećanju) jesu li u prošlosti imali probavne tegobe ili alergijske smetnje nakon konzumacije ribe (bilo sirove ili termički obrađene), radi kliničke dijagnoze anisakijaze.

### 3.5. Postupci

Za dokazivanje anti-*Anisakis* IgE antitijela u serumu ispitanika korištene su tri različite vrste testova. Radi pripreme uzoraka za laboratorijske analize, donirana krv osoba uključenih u istraživanje je nakon centrifugiranja 10 minuta / 3.000 okretaja (serumi) smrznuta na -20° C u zamrzivaču u Službi za kliničku mikrobiologiju na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo, te tako čuvana do obrade.

#### 3.5.1. Laboratorijske analize

Radi kvalitativnog utvrđivanja prisutnosti specifičnih anti-*Anisakis* IgE antitijela (na Ani s 1 i Ani s 7 alergene) testirani su serumi svih ispitanika (N = 600) u laboratoriju Universidad de Santiago de Compostela u Španjolskoj, indirektnim *Anisakis simplex* IgE-ELISA (*Trisakis*-170 kit) testom, baziranim na neizravnoj kompetitivnoj tehnici (135).

Navedeni test koristi mikrotititarske ploče s 96 jažica presvučenih s dva glavna rekombinantna alergena: Ani s 1 i Ani s 7. Analiza se sastoji od tri dijela: inkubacija nerazrijeđenim uzorkom humanog seruma, nakon toga inkubacija s florescein-izocijanatom (FITC) označenim s antihumanim IgE monoklonskim konjugatom i kao treći korak, inkubacija s anti FITC poliklonalnim konjugatom. Na kraju testa, intenzitet boje produkta (žuta boja) je proporcionalan količini *Anisakis simplex* specifičnih IgE antitijela u serumu. Analizirani uzorci seruma ispitanika su očitani kao pozitivni svaki put kada su dobivene vrijednosti optičke gustoće bile više od graničnih vrijednosti za r Ani s 1 = 0,09 i r Ani s 7 = 0,05 (18). Postoji razlika u osjetljivosti između korištenih rekombinantnih alergena: *Ani* s 1 je manje osjetljiv (61% uz 95% interval pouzdanosti) u odnosu na *Ani* s 7 (93% uz 95% interval pozdanosti). Važno je napomenuti da je taj test potvrđen kao zlatni standard za utvrđivanje infekcije parazitom uz 100% detekciju gastroalergijske anisakijaze, kao i 95% slučajeva *Anisakis* senzibilizacije povezane s kroničnom urtikarijom (136, 137).

Dokazivanje IgE antitijela na parazit u serumu ispitanika učinjeno je i korištenjem „*Anisaki*s Crude Extract“ (CE); sirove, cjelovite, L3 ličinke. *Anisakis* CE je pripremljen u Departamento de Parasitologia, Universidad Complutense, Madrid, korištenjem *A. simplex s. l.* (sensu lato) L3 stadija nametnika. Infektivne ličinke su u laboratoriju ručno izdvojene iz mišićnog tkiva ribe, zgnječene u mužaru, tretirane različitim kemijskim spojevima te višekratno centrifugirane radi izdvajanja supernatanta (protein). Sam postupak je opetovano ponavljan radi pripreme dovoljne količine startnog materijala koji je bio nužan za kasnije provedenu laboratorijsku

metodu. Jažice na mikrotitrirajućoj ploči za ELISA test prethodno su obložene sa *Anisakis* CE, a kao kontrole korištene su ploče s jažicama bez antigena. Pločice su tretirane puferom i ostavljene tijekom noći na 4°C. Sve su potom napunjene razrijeđenim uzorcima seruma, centrifugirane te na kraju višekratno isprane. Za dokaz IgE anti-CE antijela korišteni su reagensi i procedure predviđene za izvođenje *Trisakis*-170 testa (85, 138).

Dio seruma (76) je testiran i komercijalnim testom *ImmunoCap*, ThermoFisher Scientific, u Complejo Hospitalario Universitario de Santiago-CHUS, Santiago de Compostela u Španjolskoj. Svi uzorci seruma ispitanika koji su se pokazali pozitivnima (11) tijekom *Trisakis*-170 testa su ponovno analizirani, kao i randomizirani serumi (65) iz sve četiri podskupine ispitanika s alergijskim manifestacijama (BA1, BA2, BA3 i BA4). Sam postupak dokazivanja alergen specifičnih IgE antitijela je potpuno automatiziran (135).

### 3.5.2. HLA tipizacija

Za potrebe HLA genotipizacije odabrano je slučajnim odabirom 208 uzoraka seruma: 159 (27%) djelatnika u riboprerađivačkoj industriji, uključivo i svih 11 seropozitivnih sudionika, te 49 (11%) kontrolnih ispitanika. Analize su provedene u laboratoriju za HLA genotipizaciju Odjela za transfuziologiju KBC Split na lokaciji Križine, korištenjem molekularnih metoda određivanja gena sustava HLA. Kao uzorak je korištena izolirana DNA osobe dobivena iz uzorka periferne krvi (2 ml) pohranjena u epruvetu s antikoagulansom EDTA (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostic GmbH). HLA-DRB 1, HLA-DQA 1 i HLA-DQB 1 aleli dokazani su PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction-Seqence Specific Oligonucleotids) i PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer) metodom uz korištenje komercijalnih Immucor Lifecodes HLA-SSO i Olerup SSP kitova za tipiziranje. HLA-aleli i genotipska učestalost određena je direktno brojanjem, a dobiveni rezultati analizirani uobičajenim statističkim metodama.

### 3.5.3. Upitnik

Anonimni upitnik je posebno dizajniran za ovo istraživanje. Ispitivano je niz varijabli: dob, spol, profesionalna izloženost i mjere zaštite na radnom mjestu, ribolov kao moguća rizična aktivnost tijekom slobodnog vremena, prehrambene navike, posebno vezane uz konzumaciju ribe (termički neobrađene ili sirove), zdravstveno stanje (kronične bolesti, alergije), štetne navike (pušenje).

### 3.5.4. Spirometrija

Svim ispitanicima, zaposlenicima u riboprerađivačkoj industriji je nakon doniranja uzorka krvi i ispunjavanja anonimnog anketnog upitnika ponuđena i spirometrija (probirni test) kao dodatna vrijednost provedene epidemiološke studije. Spirometrija je metoda kojom se mjere volumeni i protoci udahnutog i izdahnutog zraka. U tu svrhu korišten je VICATEST P2a spirometar. Postupak je izvođen puhanjem kroz usnik (Shiller) u sjedećem položaju uz upute ispitivača, a prema smjernicama Američkog torakalnog društva i Europskog respiracijskog društva (139). Svaki ispitanik je izvršio tri ponavljajuća mjerenja, (rezultati mjerenja mogu se razlikovati za mjerene varijable FVC i FEV1 za <150 mL odnosno 5%) te je za vrijednost promatranog parametra uzeta najveća izmjerena vrijednost izražena u postotku predviđene vrijednosti s obzirom na dob, spol i tjelesnu visinu. Izmjereni su primarni pokazatelji plućne funkcije: FVC (forsirani vitalni kapacitet) koji mjeri maksimalni volumen zraka koji se forsirano, brzo i snažno izdahne do kraja nakon maksimalnog udaha, te FEV1 (forsirani ekspiracijski volumen u prvoj sekundi) maksimalni volumen zraka koji se izdahne u prvoj sekundi forsiranog izdaha nakon maksimalnog udaha. Rezultati mjerenja uspoređeni su s referentnim vrijednostima koje ovise o spolu, dobi, visini i težini testirane osobe, a dobivene vrijednosti izražene kao postotak normalne vrijednosti (za oba parametra ventilacije 80% i više). Omjer FEV1/FVC je dio forsiranog vitalnog kapaciteta koji može biti izdahnut u prvoj sekundi te je predstavljen u obliku Tiffeneau indeksa čije su normalne vrijednosti iznad 80% (128).

### 3.5.5. Statistički postupci

Statističke usporedbe dobivenih prevalencija anti-*Anisakis* IgE antitijela (zavisne varijable) uzoraka seruma testiranih *Trisakis* 170 ELISA, *Anisakis* CE ELISA ili *ImmunoCAP* laboratorijskim testovima, kao i njihov Fisherov raspon pouzdanosti, računati su putem *WinPepi 11,65* softvera (htpp//www.brixtonhealth.com/pepi4windows.htlm).

Statistička značajnost i moguća povezanost između zavisnih i nezavisnih varijabli (spol, dob, profesionalna izloženost, bihevioralni čimbenici rizika, prehrana, zdravstveni status) utvrđeni su metodom univarijatne logističke regresije, korištenjem „*logistf package, the R software version 3.5*“. Statistička metoda uključuje Bayesian pristup odgovarajućem regresijskom modelu s primjenom Firthove metode otklona pristranosti. Ta metoda se uobičajeno koristi

kako bi se otklonila mogućnost odstupanja rezultata istraživanja prilikom procjene omjera izgleda (*Odds Ratio*, OR) usljed niske stope očekivanih događaja (ishoda) (140).

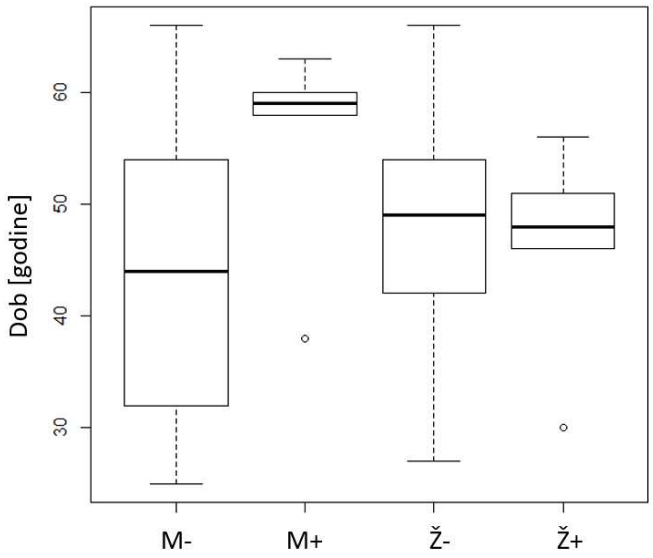
Omjer izgleda smatra se statistički značajnim ako njihov 95% raspon pouzdanosti ne uključuje 1. Statistička značajnost se prisnažila s p-vrijednostima dobivenim putem regresijskog modela logaritamskog omjera vjerojatnosti, putem Fisherovog *exact* testa. Korištenjem Firthove metode uz dovoljan broj promatranih događaja (ishoda) za ispitivane parametre, osiguravaju se pouzdane procjene regresijskih koeficijenata kao i statistička značajnost (141).

Budući da nisu potpuno jasni genetski mehanizmi koji su u podlozi moguće povezanosti između HLA alela i senzibilizacije na *Anisakis* spp., primijenjene su statističke analize takve povezanosti na alelski dominantnom i recesivnom modelu. Sam aditivni model ne uključuje više od dvije kategorije genotipova, što povećava broj parametara logističkog modela te indirektno utječe i na pouzdanost regresijskih koeficijenata. Za dokaz moguće povezanosti haplotipova i senzibilizacije korišten je „*Arlequin v 3.5.2.2*“ softver.

Vodeći se time da seropozitivnost na *Anisakis* spp. predstavlja rijedak događaj u uzorku djelatnika zaposlenih u riboprerađivačkoj industriji i da je veliki broj ispitanika uključen u istraživanje, uz činjenicu da replikacijske studije u ovoj populaciji nisu učestale, dodatno se istražila povezanost s 0,1 razinom statističke značajnosti.

# 4. REZULTATI

Ukupno je u istraživanje uključeno 600 radnika riboprerađivačke industrije i 466 kontrola (zdravih darivatelja krvi). Prosječna dob ± standardna devijacija (SD) djelatnika riboprerađivačke industrije bila je 46 ± 10 godina. Većina njih bile su žene (438 ili 73%, p<0.001). Žene su također prevladavale i u kontrolnoj skupini (281 ili 63%, p<0.001), a koje su sveukupno bile mlađe od radnika (prosječna dob ispitanika kontrolne skupine 39 ± 11 godina; srednja razlika: 6 godina, 95% CI 5,0-7,6). Medijan dobi seropozitivnih radnika riboprerađivačke industrije, od kojih pet (45%) su žene, je 56 godina (raspon 30-63) (Slika 5.).




Slika 5. Prikaz razdiobe dobi u radnika riboprerađivačke industrije s obzirom na spol i serološki status na *Anisakis* spp.

M-muško, Ž-žensko, + seropozitivan, - seronegativan

### 4.1. Imunološki odgovor na Ani s 1 i Ani s 7 antigene (alergene) posredovan specifičnim IgE antitijelima

Uključujući i serum s granično pozitivnom reakcijom koji je imao pozitivnu reakciju na *Trisakis*-170 testu na prvom testiranju te graničnu reakciju na drugom testiranju (Tablica 1. i 2.), ukupno je 11 od 600 seruma dobivenih od uzoraka krvi djelatnika riboprerađivačke industrije bilo pozitivno na anti-Ani s 7 specifična IgE antitijela: prevalencija 1,8% (Fisherov egzaktni 95% raspon pouzdanosti (CI) 0,9-3,3%). Od 11 pozitivnih zaposlenika, četvero je imalo seropozitivitet (IgE antitijela) na oba glavna alergena *Anisakis* spp.: anti-Ani s 1 i anti-Ani s 7 (0,7%, Fisherov egzaktni 95% CI 0,2-1,7%).

Tablica 1. Razdioba radnika zaposlenih u riboprerađivačkoj industriji-prema prijavi postojanja alergijskih smetnji i kategoriji alergijskih simptoma, vrsti kontakta s ribom tijekom rada u tvornici i rezultatima *Trisakis*-170 ELISA testa.

| | **Kontakt s ribom u tvornici** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **Direktan rad na proizvodnoj traci** | **Indirektan kontakt sa ribom** | **Bez kontakta sa ribom** | Ukupno |
| **Radnici sa alergijskim smetnjama** | | | | |
| kožni simptomi | 35 (3[a]) | 7 | 5 | 47 |
| rino-konjuktivitis | 43 (2) | 5 | 8 | 56 |
| respiratorni simptomi | 36 | 7 | 4 | 47 |
| ≥ 2 kategorija alergijskih simptoma | 33 (2) | 3 | 6 | 42 |
| Ukupno | 147 (7) | 22 | 23 | 192 (7) |
| **Radnici bez alergijskih smetnji** | | | | |
| Ukupno | 268 (3) | 39 | 64 (1) | 371 (4) |
| **Svi radnici zajedno** | | | | |
| | **415 (10)** | **61** | **87 (1)** | **563[b] (11)** |

[a] Brojevi u zagradama označavaju broj seruma pozitivnih na *Trisakis*-170 testu;

[b] Ukupno je 37 upitnika, u kojima su nedostajali odgovori o alergijskim simptomima, isključeno iz ove analize. Svi serumi koji su pripadali isključenim ispitanicima bili su negativni.

Tablica 2. Značajke radnika zaposlenih u riboprerađivačkoj industriji, seropozitivnih na *Anisakis* spp.

| God. rođ. | Spol | Centar | Naziv /opis radnog mjesta | Ribarenje u slobodno vrijeme | Konzumacija ribe: sirova, slana, marinirana | Učestalost konzumacije ribe | Priprema jela | Vrsta konzumirane ribe | Akutni alergijski simptomi | Kronične bolesti | T-170 test Ani s 1 | T-170 test Ani s 7 | Immuno CAP test |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1959 | M | 1A | prodavač ribe | + | + | nekoliko puta tjedno | K, G, M | PR, BR | U, R | CV | **1,888** | **0,934** | **9,75** |
| 1966 | Ž | 1A | čišćenje i soljenje ribe | - | + | jednom tjedno | K, G, S | PR, BR | U | RA | 0,006 | **0,124** | **0,54** |
| 1969 | Ž | 1A | sortiranje ribe | - | + | svaki dan | K | PR, BR | C | CA | **0,135** | **0,352** | **17** |
| 1959 | M | 2C | vlasnik, obavlja sve poslove po potrebi | + | + | jednom tjedno | G, M | BR | C, R | - | 0,004 | **0,503** | **4,99** |
| 1979 | M | 1A | radnik na preradi ribe | + | + | jednom tjedno | G | PR | - | CV | -0,003 | **0,161** | **1,94** |
| 1954 | M | 3E | sterilizacija | + | + | nekoliko puta tjedno | K, G | PR | - | . | 0.004[a] (0) | **0.06[a]** (0,042) | 0,24 |
| 1971 | Ž | 3E | pakiranje | + | + | nekoliko puta tjedno | K | PR | - | P | **0,873** | **1,212** | **3,66** |
| 1957 | M | 3H | punjenje sirove ribe | + | - | jednom tjedno | G | SR | C, R, SK | CA | -0,003 | **0,105** | 0,23 |
| 1957 | M | 3H | pražnjenje sirove ribe | - | - | jednom tjedno | K, G | PR | U | - | -0,006 | **0,198** | **0,89** |
| 1961 | Ž | 4J | komercijala | - | - | jednom tjedno | K, G | PR, BR | - | - | -0,002 | **0,213** | <0.1 |
| 1987 | Ž | 4J | sortiranje ribe | - | - | nekoliko puta tjedno | G | PR | U | D, T | **0,132** | **0,173** | <0.1 |

Centar 1 Brač: A Sardina; Centar 2 Sinj: B Conex, C Felicita, D Trenton; Centar 3 Zadar: E Sali Mardešić, F Omega Benkovac, G Mišlov, H Ostrea, I Noclerius; Centar 4 Rovinj: J Mirna
F: žene; M: muškarci;
K: kuhana riba; G: riba na roštilju pripremljena; M: marinirana riba; S: sirova riba;

PR: plava riba; BR: bijela riba; SR: slatkovodna riba;

U: urtikarija; R: rinitis; C: konjuktivitis; SK: suhi kašalj; CV: kardiovaskularne bolesti; CA: kronične alergije; P: psihoze; D: dijabetes; T: bolesti štitnjače; RA: reumatoidni artritis.

[a]granično pozitivan serum. U zagradama su Ani s 1 i Ani s 7 OD vrijednosti za drugo testiranje.

Svi serumi u kojima je pojedinom metodom utvrđena pozitivna reakcija na anti-*Anisakis* antitijela označeni su bold fontom.

Vrijednosti u Ani s 1 i Ani s 7 kolonama pokazuju vrijednosti optičke gustoće (OD) dobivene na ELISA testu za svaki serum. Pragovi za identifikaciju pozitivnog testa su bili OD=0,09 za Ani s 1 i OD=0,05 za Ani s 7. Vrijednosti ImmunoCAP testiranja u kolonama pokazuju koncentraciju protutijela (kU/L) dobivenu u pojedinom serumu reakcijom na komercijalni ImmunoCAP test koji sadrži ekstrakt cijele nematode (rezultati pozitivnog testa su označeni bold fontom). Vrijednost praga za ImmunoCAP test je 0,35 kU/L.

Iako je čak 10 od 11 seropozitivnih seruma bilo uzorkovano od zaposlenika koji su obavljali vrste poslova koje zahtijevaju direktan dodir s ribom (7 seruma uzorkovano je od radnika koji su naveli probleme s alergijama i 3 seruma od radnika bez alergija), nije utvrđena značajna povezanost vrste kontakta s ribom tijekom rada u tvornici i seropozitivnosti (OR=4,5; 95% CI 0,6-35,1; p=0,186). No, ono što je zanimljivo, jest da su većinu seropozitivnih (7/11) činili radnici koji su prijavili alergije u upitniku, i to: kožne simptome (3 seruma), rino-konjuktivitis (2 seruma) ili kombinirane simptome (2 seruma). Usporedba prevalencije seropozitivnosti na glavne alergene *Anisakis* spp. u radnika koji su izvijestili o problemima s alergijom u upitniku u odnosu na radnike koji to nisu, pokazala je značajnu povezanost kada se iz analize isključi granično pozitivni serum (OR=4,6; 95% CI 1,2-18,2; p=0,036), odnosno povezanost na razini značajnosti od 0,1 kada se taj pojedini serum uključi u analizu (OR=3,5; 95% CI 1,0-12,0; p=0,052).

Za razliku od seruma uzorkovanih od radnika iz riboprerađivačke industrije, svih 446 seruma kontrolnih ispitanika koji su testirani na Ani s 1 i Ani s 7 alergene bili su seronegativni (0%; Fisherov egzaktni test 95% CI 0-0,8%). Taj je rezultat jasno pokazao da je prevalencija seropozitivnosti na alergene *Anisakis* spp. značajno viša u djelatnika riboprerađivačke industrije nego li u ispitanika kontrolne skupine (Fisherov egzaktni test, p=0,006).

### 4.2. Imunološki odgovor na *Anisakis* CE antigene posredovan specifičnim IgE antitijelima

Imunološki odgovor na *Anisakis* CE antigene posredovan IgE protutijelima ispitan je također u zaposlenika u industriji prerade ribe koji su odgovorili na pitanja o alergijama (n=563; 37 isključenih). Pozitivna reakcija utvrđena je u 21 od 563 testirana seruma. Među njima, 10 ili 5,2% pozitivnih seruma je uzorkovano od radnika koji su izvijestili o problemima s alergijama (n=192 radnika), dok je 11 ili 3% seruma bilo pozitivno u skupini radnika koji nisu imali alergijske tegobe (n=371). Nije utvrđena statistički značajna razlika u prevalenciji seropozitivnosti između ove dvije skupine (Fisherov egzaktni test, p=0,240).

Također je utvrđeno kako svi serumi pozitivni na *Anisakis* CE antigene uzorkovani od radnika s prijavljenim alergijskim simptomima korespondiraju s pojedincima koji rade u direktnom kontaktu s ribom (10 ili 6,9% od ukupno n=146 radnika s alergijama čiji opis radnih zadataka uključuje direktan kontakt s ribom), dok je u skupini radnika bez prijavljenih alergija, 9

seropozitivnih radnika radilo u direktnom kontaktu s ribom (9 ili 3,4% od ukupno 268 radnika bez alergija čiji opis radnih zadataka uključuje direktan kontakt s ribom), a 2 radnika su radila na drugim poslovima (2 ili 3,1% od ukupno 64 radnika bez alergija koji nisu bili u direktnom kontaktu s ribom). Ni ovdje, u skupini radnika u direktnom kontaktu s ribom, nije bilo statistički značajnih razlika u prevalenciji seropozitivnosti s obzirom na prijavu alergijskih simptoma (Fisherov egzaktni test, p=0,140).

Vezano uz pozitivne serume iz uzoraka krvi radnika koji su izvijestili o alergijskim simptomima (10 seruma), 4 su seruma pripadala radnicima s kožnim alergijskim simptomima (8,5% od ukupno 47 radnika koji su prijavili kožne simptome), 3 onima s rino-konjunktivitisom (5,3% od ukupno 56 radnika s problemima s rino-konjunktivitisa), 1 radniku koji je izvijestio o respiratornim simptomima (2,1% od ukupno 47 radnika s respiratornim simptomima) te 2 radnika koji su prijavili simptome u više kategorija (4,8% od ukupno 42 radnika).

Međutim, kada se iz analize isključe serumi koji su bili pozitivni na anti-Ani s 7 IgE protutijela (tj. serumi onih radnika koji su patili od prethodnih infekcija s *Anisakis* spp.), samo je 5/195 (2,6%; 95% CI 0,9-6,0%) seruma bilo pozitivno na *Anisakis* CE antigene u podskupini radnika s alergijama (2 seruma uzorkovana od radnika s kožnim alergijskim simptomima, 1 od radnika s rino-konjunktivitisom, 1 od radnika s respiratornim alergijskim simptomima te 1 od radnika s alergijskim simptomima iz više kategorija). Ti su rezultati slični onima koji su opaženi u podskupini radnika bez alergija, gdje je 7/371 seruma (1,9%; 95% CI 0,8-3,9%) bilo pozitivno na *Anisakis* CE antigene.

Kako je 19 (od ukupno 21 seruma) pozitivnih na *Anisakis* CE antigene bilo od zaposlenika koji su na svom radnom mjestu svakodnevno u direktnom kontaktu s ribom, analizirana je mogućnost da ta podskupina ima statistički značajno veći broj seruma pozitivnih na *Anisakis* CE u odnosu na ostale radnike. No značajna razlika u seropozitivnosti nije utvrđena (OR=0,31; 95% CI 0,072-1,37; Fisherov egzaktni test, p=0,120).

### 4.3. Imunološki odgovor na *Anisakis* spp. antigene posredovan specifičnim IgE antitijelima, mjeren ImmunoCAP testom

Ukupno je 7 od 11 seruma pozitivnih na *Trisakis*-170 testu bilo pozitivno i na *ImmunoCAP* testu (osjetljivost 63%, 95% CI 31-88%), dok su rezultati svih 65 seruma negativnih na *Trisakis*-170 testu bili negativni i na *ImmunoCAP* testu (specifičnost 100%, 95% CI 95-100%). Prema kategorijama, serumi pozitivni na *ImmunoCAP* testu uključivali su isključivo serume radnika u direktnom kontaktu s ribom i to: 5 seruma radnika koji su prijavili različite alergijske smetnje (2 s kožnim alergijskim simptomima, 2 s rino-konjuktivitisom, 1 s kombiniranim simptomima), te 2 uzorka seruma zaposlenika koji nisu imali alergijskih problema. Očitane *ImmunoCAP* vrijednosti (kU/L) su prikazane u Tablici 2.

### 4.4. Čimbenici rizika za seropozitivnost na glavne *Anisakis* spp. alergene (antigene) u djelatnika riboprerađivačke industrije u Republici Hrvatskoj

U Tablici 3. prikazani su rezultati analize povezanosti serološkog statusa na *Anisakis* spp. i različitih sociodemografskih i bihevioralnih značajki radnika te sigurnosnih mjera zaštite na radu na njihovom radnom mjestu.

Tablica 3. Povezanost seropozitivnosti na glavne *Anisakis* spp. alergene s različitim sociodemografskim i bihevioralnim značajkama djelatnika riboprerađivačke industrije u Republici Hrvatskoj te mjerama zaštite na radu na njihovim radnim mjestima (n=600)

| Karakteristike | | OR | 95% CI za OR | | p |
|---|---|---|---|---|---|
| **Sociodemografski čimbenici** | muški spol | 3,4 | 1,1 | 11,1 | **0,042** |
| | starija dob (godine) | 1,1 | 1 | 1,2 | **0,091** |
| **Sigurnosne mjere zaštite na radu i radno mjesto** | zaštitne rukavice | 0,6 | 0,1 | 5,6 | 0,581 |
| | maska za lice | 0,2 | 0,001 | 1,3 | **0,094**[a] |
| | zaštitne naočale | 0,7 | 0,01 | 5,3 | 0,762 |
| | **direktni kontakt sa ribom na radnom mjestu** | 2,6 | 0,6 | 24,4 | 0,152 |
| **Bihevioralni čimbenici** | **ribarenje u slobodno vrijeme** | 11,4 | 3,5 | 38,7 | **<0,001** |
| | **način pripreme ribe kod kuće** | | | | |
| | mariniranje | 6,7 | 1,2 | 25,7 | **0,031** |
| | priprema sirove ribe | 9 | 0,9 | 46 | **0,059**[a] |
| | soljenje | | | NA | |
| | dimljenje | | | NA | |
| | kuhanje | 1,8 | 0,6 | 6,4 | 0,317 |
| | pečenje na grilu | 0,4 | 0,1 | 2,1 | 0,235 |
| | **riba pripremljena i konzumirana** | | | | |
| | kod kuće | 1 | 0,1 | >50 | 0,974 |
| | u restoranu | 4,8 | 0,5 | 22,7 | 0,144 |
| | riba iz supermarketa | 0,7 | 0,01 | 5,6 | 0,977 |
| | **svakodnevna prehrana** | | | | |
| | konzumira mesne namirnice | 0,1 | 0,01 | 0,6 | **0,023** |
| | konzumira ribu manje od jednom tjedno | 0,1 | 0,001 | 0,8 | **0,021** |
| | konzumira ribu (DA/NE) | 0,6 | 0,1 | 82,3 | 0,768 |
| | konzumira termički neobrađenu ribu | 2,3 | 0,7 | 8,1 | 0,162 |
| | **vrsta konzumirane ribe** | | | | |
| | plava riba | 1,1 | 0,3 | 3,6 | 0,835 |
| | bijela riba | 0,6 | 0,2 | 3,2 | 0,508 |
| | slatkovodna riba | 2,4 | 0,3 | 10,7 | 0,376 |
| | **pušenje** | | | | |
| | nepušači vs pušači | 0,6 | 0,2 | 2,4 | 0,510 |
| | bivši pušači vs pušači | 4,5 | 1 | 17,6 | 0,050 |
| | Ukupno, za sve kategorije zajedno | | | | 0,060 |

NA – OR nije izračunat jer niti jedan seropozitivni radnik nije naveo da je koristio takve načine pripreme ribe.[a]U tablici je prikazana p-vrijednost za test omjera izgleda logističkog regresijskog modela. Svi značajni nalazi su dodatno podržani rezultatima Fisherovog egzaktnog testa s p vrijednostima <0,1, izuzev onih označenih s [a], za koje Fischerov egzaktni test pokazuje p-vrijednosti između 0,1 i 0,2. Korištena je razina statističke značajnosti od 0.1.

Čimbenik koji je bio najsnažnije povezan sa seropozitivnošću na glavne alergene *Anisakis* spp. Ani s 1 i Ani s 7 jest ribarenje u slobodno vrijeme, nakon čega slijede načini tradicionalne pripreme ribe korišteni kod kuće (Tablica 3.). Nasuprot tome, povezanost nije uočena za direktni kontakt s ribom na proizvodnoj liniji u tvornici, niti za nošenje rukavica ili zaštitnih naočala. No, potrebno je naglasiti da je većina radnika (92%) nosila zaštitne rukavice čak i ako nisu bili u direktnom kontaktu s ribom, što je moguće ozbiljno smanjilo rizik za senzibilizaciju na *Anisakis* spp. preko kontakta s kožom.

Izuzev pripreme ribe pečenjem na roštilju (gril) i kuhanja, ostale metode pripreme ribe kod kuće su bile rijetko korištene od strane ispitanika (Tablica 4.). Međutim, mariniranje i priprema sirove ribe za konzumaciju (npr. *carpaccio*) pokazale su jaku povezanost sa seropozitivnošću na Ani s 1 i Ani s 7 antigene *Anisakis* spp. (Tablica 3.). Niti jedan seropozitivni radnik nije naveo da soli ili procesuira ribu dimljenjem pa stoga procjena rizika za ove tehnike nije provedena. Potrebno je napomenuti da uz konzumaciju sirove ribe, dimljenje i soljenje ribe spadaju među najrjeđe korištene metode, moguće zbog specifične opreme koju je potrebno imati za ovakvu vrstu prerade ribe.

Tablica 4. Učestalost metoda za pripremu ribe koju djelatnici riboprerađivačke industrije u Republici Hrvatskoj koriste kod kuće

| **Način pripreme** | **N** | **%[a]** |
|---|---|---|
| Pečenje na grilu | 501 | 91 |
| Kuhanje | 267 | 48 |
| Mariniranje | 22 | 4 |
| Soljenje | 17 | 3 |
| Sirova riba | 9 | 2 |
| Dimljenje | 2 | 0,4 |

[a] Odgovori na pitanja o tehnikama procesuiranja ribe nedostaju u 47 upitnika pa su ti upitnici izuzeti iz analize

Rezultati dobiveni za prehrambene navike radnika pokazuju kako je konzumiranje mesnih namirnica i konzumiranje ribe manje od jednom tjedno snažan zaštitni čimbenik protiv nastanka seropozitivnosti na *Anisakis* spp. antigene (Tablica 3.). No, ni konzumacija ribe sama za sebe (DA/NE odgovor) niti konzumacija termički obrađene ribe, nisu identificirani kao značajni čimbenici povezani sa seropozitivnošću na glavne alergene *Anisakis* spp. Ani s 1 i Ani s 7. Također, interesantno je da ni vrsta ribe niti mjesto gdje je riba pripremljena i konzumirana, nisu povezani sa senzibilizacijom na parazit, premda je više od 63% radnika izjavilo da konzumira plavu ribu koja se tradicionalno priprema bez uklanjanja probavnog trakta.

Muški spol i starija životna dob su utvrđeni kao rizični čimbenici senzibilizacije na nametnika. Za muškarce je 3,4 puta izglednije da će biti seropozitivni u odnosu na žene. Također, jedna godina života više povećava izglede za seropozitivnost za 0,1 (Tablica 3.). Utvrđena je i značajna interakcija između spola i godina starosti budući da su seropozitivni muškarci bili značajno stariji od seropozitivnih žena (*Mann-Whitney* test, p =0,002; Slika 5.). No, kako su muškarci više skloni ribarenju u slobodnom vremenu, ovakav je rezultat i moguća posljedica zbunjivanja tim čimbenikom. Kako višestruka regresija nije provediva zbog malog broja seropozitivnih radnika, dodatno je provedena i analiza u kojoj su iz analize isključeni radnici koji su se bavili ribolovom za osobne potrebe u slobodnom vremenu. Takva analiza je pokazala 1% seropozitivnih radnika u oba spola: muškaraca (1 od 111) i žena (4 od 391); no kako se ovo opažanje zasniva na samo pet seropozitivnih radnika, formalno testiranje nije provedeno.

Ukupno je 563 radnika riboprerađivačke industrije odgovorilo na pitanje o kroničnim alergijskim smetnjama, a 32 (6%) zaposlenika su prijavila neku formu kronične alergije. Kronične alergije su pojašnjene radnicima kao postojanje bilo kojeg alergijskog simptoma kojeg su imali prije zapošljavanja u pogonu za obradu ribe (npr. u djetinjstvu, tijekom adolescencije…), dok im je akutna alergija pojašnjena kao pojavnost bilo kojeg alergijskog simptoma kojeg su iskusili nakon što su se zaposlili u djelatnosti prerade ribe. Utvrđeno je da su seronegativni radnici značajno rjeđe prijavljivali kronične alergije od seropozitivnih radnika (6% : 27%; OR 0,2; 95% CI 0,04 - 0,6, p<0,001) ili kontrola (6% : 14%; OR 0,4; 95% CI 0,2-0,6, p<0.001). Kod usporedbe prevalencije isključivo akutnih alergijskih simptoma u radnika iz riboprerađivačke industrije s prevalencijom alergijskih simptoma u kontrolnoj skupini, utvrđeno je kako su urtikarija i rinitis najučestaliji u seropozitivnih radnika, nešto manje učestali u seronegativnih radnika, te su prisutni u samo 2% zdravih kontrola (Tablica 5.).

Tablica 5. Prevalencija simptoma povezanih s akutnim alergijskim smetnjama u seropozitivnih i seronegativnih radnika riboprerađivačke industrije u Hrvatskoj te prevalencija alergijskih simptoma u zdravih kontrola

| | N (%) | | | OR (95% CI)[d] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Akutni alergijski simptomi** | **Seropozitivni, n=8[a]** | **Seronegativni n=501[b]** | **Zdrava kontrola, n=443[c]** | **Seropozitivni vs seronegativni** | **Seropozitivni vs zdravi** | **Seronegativni vs zdravi** |
| Urtikarija | 3 (38%) | 56 (11%) | 7 (2%) | 5,02 (1,14; 19,37)** | 37,0 (7,5;>100)** | 7,38 (3,62; 17,39)** |
| Konjuktivitis | 1 (13%) | 56 (11%) | 6 (1%) | 1,58 (0,16; 7,41) | 13,5 (1,3; 77,3)** | 8,54 (4,03; 21,47)** |
| Rinitis | 2 (25%) | 36 (7%) | 11 (2%) | 4,94 (0,88; 20,01)* | 14,5 (2,5; 64,6)** | 2,95 (1,55; 6,05)** |
| Neproduktivna prehlada | 1 (14%) | 55 (11%) | 4 (1%) | 0,47 (0,00; 3,89) | 5,7 (0,0; 61,1) | 12,14 (5,13; 37,35)** |
| Bronhitis | 0 (0%) | 7 (1%) | 0 (0%) | 3,88 (0,03; 36,74) | Prevalencija 0 za obje kategorije | 13,45 (1,63; >100)** |

[a] Uključuje granično pozitivan serum, te isključuje podatke za 3 radnika koji su prijavili kronične alergije.

[b] Isključuje podatke za 29 radnika s kroničnim alergijama te za 59 za koje su odgovori o akutnim alergijama nedostajali.

[c] Nedostaju odgovori o akutnim alergijama za 3 ispitanika.

[d] Omjer izgleda izračunat je *Firth's bias* redukcijskom metodom;

Značajno na: ** razini 0,05 * razini 0,01

### 4.5. Povezanost serološkog statusa ispitanika na *Anisakis* spp. i rezultata spirometrijskog testiranja u radnika riboprerađivačke industrije (n = 409)

Iako seropozitivni ispitanici nisu često navodili respiratorne probleme kao oblik alergijskih simptoma koje su zamijetili, u uzorku radnika je provedeno i spirometrijsko testiranje kako bi se utvrdilo je li seropozitivnost na glavne antigene *Anisakis* spp. povezana sa promjenama u plućnoj funkciji radnika. Rezultati te analize prikazani su u Tablici 6. Za niti jedan od testiranih parametara: forsirani vitalni kapacitet (FVC), forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), te Tiffenau indeks (TI), izraženih kao postotak referentnih vrijednosti, nije utvrđena značajna razlika u plućnoj funkciji između seropozitivnih i seronegativnih ispitanika.

Tablica 6. Povezanost serološkog statusa ispitanika na *Anisakis* spp. i rezultata spirometrijskog testa u radnika riboprerađivačke industrije (n = 409)

| **Varijable plućne funkcije** | **Seropozitivni, n=11** | | **Seronegativni, n=398** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Medijan** | **Raspon** | **Medijan** | **Raspon** | **p[a]** |
| Forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1), % | 101,1 | 72,9-118,1 | 94,7 | 55,9-172,3 | 0,396 |
| Forsirani vitalni kapacitet (FVC), % | 92,8 | 85,1-118,1 | 94,9 | 61,9-137,6 | 0,963 |
| Tiffenau indeks (TI), % | 98,6 | 78,1-121,5 | 99,6 | 70,3-132,8 | 0,703 |

[a]Mann-Whitney test za nezavisne uzorke

Sve su vrijednosti izražene kao postotak referentnih vrijednosti.

### 4.6. Sustav humanih leukocitnih antigena (HLA) i serološki status ispitanika na *Anisakis* spp.

Kako bi se ispitalo je li alergijski odgovor na alergene *Anisakis* spp. možda posredovan polimorfizmima gena HLA sustava, istražena je povezanost između seropozitivnosti na glavne alergene *Anisakis* spp. Ani s 1 i Ani s 7 i HLA alela na DRB1, DQA1 i DQB1 lokusima za koje je utvrđena visoka razina raznolikosti alela (prevalencija homozigota u rasponu 0 - 4%). Većina alela nije bila povezana sa seropozitivnošću niti u jednom od testiranih genetskih modela (logistička regresija, $p \geq 0{,}110$). Međutim, 6 alela unutar DRB1 gena bilo je povezano s povećanim izgledom za senzibilizaciju na parazit, i to u barem jednom od testiranih modela: dominantnom i/ili recesivnom genskom modelu i/ili modelu alela (Tablica 7.). Sve su takve veze identificirane kao jake ($OR \geq 3{,}46$) i bile su dodatno podržane rezultatima Fisherovog egzaktnog testa koji je bio značajan na razini 0,1. Za ostala dva gena pronašli smo sličnu, iako slabiju i manje značajnu povezanost sa seropozitivnošću na glavne alergene *Anisakis* spp., pa je tako samo jedan alel u DQA1 genu bio povezan s povećanim izgledom za senzibilizaciju na *Anisakis* spp., dok su u DQB1 genu identificirana tri alela povezana sa seropozitivnošću. Od njih je samo jedan alel HLA-DQB1*05:02 bio protektivan, tj. bio je povezan s izostankom specifičnog IgE odgovora na alergene.

Tablica 7. Aleli HLA sustava povezani sa serološkim statusom ispitanika na *Anisakis* spp. (N=208[a])

| | Prevalencija alela | | Model alela | | | Dominantni model | | | Recesivni model | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **HLA alel** | **seropoz.** | **seroneg.** | **p-vrijednost** | **OR** | **95%CI** | **p-vrijednost** | **OR** | **95%CI** | **p-vrijednost** | **OR** | **95%CI** |
| HLA-DRB1*11:01 | 9,1% | 9,4% | | | | | | | 0,082[b] | 7,94 | 0,71-53,86 |
| HLA-DRB1*11:04 | 13,6% | 4,8% | 0,076 | 3,46 | 0,86-10,70 | 0,045 | 4,53 | 1,04-16,43 | | | |
| HLA-DRB1*13:02 | 27,3% | 8,6% | 0,057 | 3,87 | 0,96-12,14 | 0,053 | 4,25 | 0,98-15,31 | | | |
| HLA-DRB1*3:01 | 9,1% | 6,3% | | | | | | | 0,082[b] | 7,94 | 0,72-53,86 |
| HLA-DRB1*4:04 | 18,2% | 3,0% | 0,029 | 7,29 | 1,28-30,72 | 0,028 | 7,75 | 1,29-35,76 | | | |
| HLA-DRB1*7:01 | 18,2% | 8,9% | | | | | | | 0,010 | 56,43 | 2,84->100 |
| HLA-DQA1:2:01 | 18,2% | 7,9% | 0,090 | 2,81 | 0,83-7,79 | | | | | | |
| HLA-DQB1:2:02 | 18,2% | 7,9% | 0,090 | 2,81 | 0,83-7,80 | | | | | | |
| HLA-DQB1:5:02 | 0,0% | 11,4% | 0,098 | 0,17 | 0,00-1,27 | | | | | | |
| HLA-DQB1:6:05 | 9,1% | 0,0% | 0,010 | 55,05 | 2,85->100 | 0,010 | 56,43 | 2,84->100 | | | |

[a] U analizu je uključeno ukupno 208 uzoraka krvi uzorkovanih od 11 radnika riboprerađivačke industrije u Hrvatskoj seropozitivnih na glavne alergene *Anisakis* spp. Ani s 1 i Ani s 7, te iz slučajno odabranih 148 seronegativnih radnika i 49 kontrola.

[b] U tablici je prikazana p-vrijednost za test omjera izgleda logističkog regresijskog modela. Svi značajni nalazi su dodatno podržani rezultatima Fisherovog egzaktnog testa s p-vrijednostima <0,1, izuzev onih označenih s [b] za koje Fischerov egzaktni test pokazuje p-vrijednosti između 0,1 i 0,2.

Korištena je razina statističke značajnosti od 0,1. Za pojašnjenje oko odabira razine značajnosti vidjeti poglavlje Metode.

Glede povezanosti haplotipova HLA sustava i seropozitiviteta zaposlenika riboprerađivačke industrije na glavne alergene nametnika, identificirano je pet haplotipova koji su bili značajno povezani sa seropozitivnošću (Tablica 8.). Oni su ujedno sadržavali glavninu alela HLA prethodno identificiranih u Tablici 7. kao oni aleli koji su značajno povezani sa seropozitivnošću. Iznimke su bili aleli HLA: HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*11:01 i HLA-DQB1*05:02.

Tablica 8. Povezanost haplotipova HLA sustava sa serološkim statusom ispitanika na *Anisakis* spp. (N=208[a])

| **Haplotipovi HLA (DRB1 DQA1 DQB1)** | **Prevalencija haplotipova** | | **p-vrijednost[b]** | **p-vrijednost Fischer** |
|---|---|---|---|---|
| | **seropoz.** | **seroneg.** | | |
| **7:01 2:01 2:02** | 18,2% | 6,6% | 1,09E-14 | 0,064 |
| **11:04 5:05 3:01** | 13,6% | 3,6% | 3,33E-16 | 0,054 |
| **4:04 3:01 3:02** | 9,1% | 0,8% | 1,11E-16 | 0,024 |
| **13:02 1:02 6:05** | 4,5% | 0,0% | 0 | 0,053 |
| **13:02 3:01 6:04** | 4,5% | 0,0% | 0 | 0,053 |

Korištena je razina statističke značajnosti od 0.1. Za pojašnjenje oko odabira razine značajnosti vidjeti poglavlje Metode.

[a] U analizu je uključeno ukupno 208 uzoraka krvi uzorkovanih od 11 radnika riboprerađivačke industrije u Hrvatskoj seropozitivnih na glavne alergene *Anisakis* spp.Ani s 1 i Ani s 7, te od slučajno odabranih 148 seronegativnih radnika i 49 kontrola.

[b] Prikazana je p-vrijednost za test omjera izgleda logističkog regresijskog modela. Svi su nalazi dodatno podržani rezultatima Fischerova egzaktnog testa s p-vrijednošću od p <0,01.

# 5. RASPRAVA

Ovo je prvo, sveobuhvatno istraživanje rizika izloženosti *Anisakis* spp. alergenima s korištenjem visoko specifičnog i osjetljivog serodijagnostičkog testa, na reprezentativnom uzorku od 600 zaposlenika u tvornicama za preradu morske ribe, te 466 odraslih dobrovoljnih darivatelja krvi. Težište provedene studije je na proučavanju povezanosti *Anisakis* spp. seropozitivnosti radnika s nizom sociodemografskih, bihevioralnih, zdravstvenih, genetičkih i profesionalnih atributa. Znanstvene spoznaje o rizičnim čimbenicima koji utječu na *Anisakis* seropozitivnost su još uvijek nepotpune, ponekad kontradiktorne i često nejasne. Iako su pojedina dosadašnja istraživanja pokazala učestaliju pojavu alergijskih simptoma bez prethodne infekcije (bilo inhalacijom ili neposrednim dodirom) u osoba s profesionalnom izloženosti (ribari, prodavači ribe, kuhari, djelatnici u pogonima za preradu ribe), korištene dijagnostičke metode nisu imale jednaku osjetljivost te nisu mogle ukazati je li primarna izloženost uslijedila izlaganjem živim infektivnim ličinkama ili se radi o izloženosti alergenu drugim putevima.

Vrlo je važno napomenuti da je istraživanje obuhvatilo gotovo sve radnike koji rade u riboprerađivačkim pogonima za preradu morske ribe u Hrvatskoj, te da dobiveni rezultati predstavljaju osnovu za daljnje praćenje zaposlenika ove grane djelatnosti koji su svakodnevno izloženi velikom broju različitih alergena.

## 5.1. Rizični čimbenici za seropozitivnost *Anisakis* spp. u djelatnika riboprerađivačke industrije

U istraživanju je potvrđena značajno viša anti-*Anisakis* seroprevalencija u radnika (1,8%; 95% CI 0,9-3,3%) u odnosu na kontrolnu skupinu (0,0%; 95% CI 0,0-0,8%), što ukazuje na povećan rizik od nastanka seropozitivnosti zaposlenih u preradi morske ribe. Istraživanje provedeno na uzorku ribara, mornara i zaposlenika u tvornicama za preradu ribe u zapadnom dijelu Sicilije, također je pokazalo prisutnost specifičnih IgE antitijela u 20% uključenih osoba. (128).

Slične spoznaje prikazalo je u svojim radovima više autora, ali uz niz ograničenja u provedenim istraživanjima (prigodan ili mali uzorak ispitanika, prikaz slučaja…) (129, 142)

Slučaj pojavnosti generalizirane urtikarije i alergijske astme radi profesionalne izloženosti *Anisakis* alergenima u iste osobe opisali su Scala i suradnici, te istaknuli činjenicu da izloženost antigenima nametnika na radnom mjestu može dovesti do nastanka bolesti (123). Istraživanje senzibilizacije na alergene nametnika provedeno u Italiji među 28 ribara i prodavača ribe pokazalo je da su oni populacija u riziku za senzibilizaciju na *Anisakis simplex* i da je nužno nastaviti istraživanja u širem opsegu (143).

Naše istraživanje istaklo je ribolov u slobodno vrijeme i za osobne potrebe kao najveći čimbenik rizika za senzibilizaciju na parazit u radnika riboprerađivačke industrije u Hrvatskoj (OR 11,4).

Stoga je vidljivo da profesionalna izloženost ispitivanih radnika u radnom okruženju ne predstavlja glavni rizik za seropozitivnost kada su primijenjene mjere osobne zaštite u vidu nošenja rukavica, zaštitnih naočala ili maski na licu.

U ovom istraživanju radnika zaposlenih u sektoru ribopređivačke industrije u Hrvatskoj, povezanost IgE senzibilizacije i ribolova kao aktivnosti u slobodno vrijeme praćena je s pet puta učestalijom konzumacijom sirove ribe u podskupini amaterskih ribara, u odnosu na ispitanike koji se nisu bavili ribarenjem kao hobijem. Učestalost konzumacije ribe se pokazala značajnom u odnosu na seropozitivnost, dok konzumacija ribe sama za sebe ili konzumacija termički obrađene ribe nisu bile važne za senzibilizaciju na istraživanog nametnika. Mazzucco i suradnici su u svom istraživanju zabilježili obrnuto proporcionalan odnos između učestalosti konzumacije ribe i seroprevalencije, što su objasnili moguće namjernom, osobnom odlukom o manjoj prisutnosti ribe u svakodnevnoj prehrani pojedinaca (radnika u riboprerađivačkoj industriji) s alergijama. Činjenica da je većina ispitanika iz studije Mazzocca i suradnika (ribari/pomorci i radnici u tvornicama) na svom radnom mjestu bila u direktnom kontaktu s ribom (417:148), mogla je u ovom slučaju ipak dovesti do pristranosti u zaključivanju (128).

Konzumacija mesa kao i konzumacija ribe manje od jednom tjedno bili su značajni zaštitni čimbenici u odnosu na nastanak seropozitivnosti radnika.

Potrebno je istaknuti da su svi seropozitivni radnici uključenih tvornica u Hrvatskoj testirani *Trisakis*-170 testom, (koji u sebi sadrži Ani s 1 i Ani s 7 antigene), bili pozitivni na Ani s 7 antigen, koji je pravi biljeg prethodne infekcije, anisakijaze (136).

Iz toga proizlazi da su dokazana anti-*Anisakis* IgE antitijela u serumu zaposlenika rezultat prethodne neprepoznate infekcije, a ne profesionalne izloženosti radnika alergenima

parazita na radnom mjestu. Ovo istraživanje je pokazalo da iako radnici zaposleni u preradi ribe na svojim radnim jedinicama svakodnevno mogu biti izloženi različitim alergenima, učestalije nego u općoj populaciji, ta vrsta izloženosti nije primarna za nastanak senzibilizacije na glavne sekretorne antigene oblića *Anisakis* spp. Ani s 1 i Ani s 7.

Tome u prilog govore zapažanja iz prethodno navedenog istraživanja skupine talijanskih autora, u kojem je, premda niže razine kvalitete dokaza, utvrđena seroprevalencija među ribarima i mornarima bila veća (6,7 puta) nego u radnika riboprerađivačke industrije, uz jednaku učestalost kontakta kože ispitanika s ribom (128).

Anadon i drugi autori su zaključili da pozitivne reakcije na Ani s 7 protein (prepoznat u 100% inficiranih osoba) mogu biti velika pomoć u razlikovanju specifičnih imunoglobulinskih E antitijela nastalih kod prave *Anisakis* infekcije u odnosu na lažno pozitivne, nastalih radi križnih reakcija alergena *Anisakisa* spp. i drugih uzročnika (npr. parazit *Pseudoterranova decipiens)* (136).

Kako bi se potpuno razjasnio nedostatak povezanosti *Anisakis* IgE senzibilizacije i izloženosti alergenima parazita u ispitivanoj populaciji radnika riboprerađivačke industrije, svi uključeni u istraživanje su testirani i drugim laboratorijskim testom. Budući da *Trisakis*-170 test nije adekvatan za potvrdu moguće senzibilizacije zaposlenika drugim putevima (preko kože ili respiratorno), serumi svih radnika su radi detekcije IgE antitijela na *Anisakis* CE antigene testirani dodatno, indirektnim ELISA testom. Usporedba rezultata ta dva testa pokazala je veći broj pozitivnih radnika na *Anisakis* CE (3,9%; 95% CI 2,4-6,0%) u odnosu na *Trisakis*-170 (1,8%; 95% CI 0,9-3,3%). Objašnjenje za to može biti dvojako: radnici su moguće senzibilizirani na neke druge važne *Anisakis* alergene prisutne u sirovoj, cjelovitoj L3 ličinki (CE) ili neki antigeni prisutni u *Anisakis* CE možda pokazuju križnu reakciju s nekim drugim alergenima na koje su pojedini radnici osjetljivi. Kako bi se to istražilo, učestalost IgE seropozitivnosti na *Anisakis* CE je uspoređena između podskupina radnika s prijavljenim alergijskim smetnjama i onih bez prijavljenih alergijskih tegoba, kao i među zaposlenicima koji su na svojim radnim mjestima svakodnevno u direktnom kontaktu s ribom i onih koji rade na drugim vrstama poslova. Prema rezultatima testova, nisu utvrđene značajne razlike u *Anisakis* IgE senzibilizaciji među uspostavljenim podskupinama. Veći broj pozitivnih na *Anisakis* CE, u odnosu na *Trisakis*-170 (samo Ani s 1 i Ani s 7), vjerojatno je rezultat križne reaktivnosti s drugim alergenima nego senzibilizacije na *Anisakis* preko kože ili inhalacijom.

Dodatno objašnjenje za činjenicu da su dominantni bihevioralni rizični čimbenici u odnosu na profesionalnu izloženost, može biti zbog toga što ljudi koji se bave ribolovom za osobne potrebe pokazuju češće naviku konzumacije kod kuće sirove male plave ribe (tradicijski pripremljene), koja za razliku od one za preradu u tvornici ne podliježe nikakvim kontrolama (veterinarska inspekcija). Pravilno korištenje osobne zaštitne opreme (naočale, maske i rukavice), koja je propisana za radnika na radnom mjestu kao i zakonska obaveza implementacije pravila HACCP sustava (*Hazard Analysis of Critical Control Points*), sigurno imaju određeni protektivni učinak (144). Prema rezultatima ovog hrvatskog istraživanja, radnici koji nose masku na licu vjerojatno su zaštićeni ($p<0,1$). Kako su svi anketirani seropozitivni radnici nosili rukavice, ali samo 20% od svih su svakodnevno nosili masku na radnom mjestu, nije bilo moguće precizno determinirati rizik koji nekorištenje osobne zaštitne opreme ima u odnosu na *Anisakis* seropozitivitet. Korist od pravilnog korištenja zaštitne opreme u odnosu na pojavnost alergijskih tegoba pojedinca radi profesionalne izloženosti nije u potpunosti definirana, pa tako može biti beznačajna u odraslih s atopijskim dermatitisom ili čak može biti uzrokom profesionalno povezanih alergijskih tegoba (alergija na lateks rukavice) (145).

Stoga, mjerenje protektivnog učinka kod pravilne uporabe osobne zaštitne opreme na radnom mjestu, potrebno je pažljivo provesti u nekom, drugačije osmišljenom istraživanju. Različito od ostalih prijavljenih akutnih alergijskih simptoma, pojavnost urtikarije i rinitisa je bila značajno viša u seropozitivnih nego u seronegativnih (OR od 4,9 do 5,0) i kontrolnih ispitanika (OR od 14,5 do 37,0). Poznato je da je urtikarija povezana s humanim infekcijama helmintima ili člankonošcima koji sišu krv, premda njena patogeneza nije u potpunosti jasna (146). Prema sustavnom preglednom članku Kolkhira i suradnika, kronična urtikarija je učestalije zabilježena u pacijenta s toksokarijazom, *Anisakis simplex* senzibilizacijom i infekcijama protozoama u odnosu na zdrave kontrolne ispitanike (147). U podlozi te alergijske reakcije je mehanizam aktivacije mastocita koji omogućava otpuštanje histamina i drugih vazoaktivnih tvari. Okidač može biti i produkcija Th2 citokina tijekom parazitske infekcije, uz porast periferne eozinofilije (u koži) (147).

Ovo istraživanje radnika u Hrvatskoj pokazalo je i različit utjecaj prisutnih, drugih alergena jer su seronegativni radnici učestalije prijavili akutne alergijske simptome nego kontrolni ispitanici. Slično su primijetili Jeebhay i suradnici u svom istraživanju, koji su radi

vjerojatne izloženosti alergenima radnika u svom radnom okolišu ustanovili češću pojavnost astme i rino-konjuktivitisa u zaposlenika tvornica za preradu morske ribe (148).

Radi svoje kompleksnosti, još uvijek odnos kliničke slike alergije i senzibilizacije s multiplim alergenima u slučaju *Anisakis* spp. parazita nije do kraja razriješen. Daschner i suradnici su na osnovi rezultata svog istraživanja iznijeli zapažanje o vjerojatnom postojanju različitih atopijskih fenotipova. Utvrdili su da su *Anisakis* seropozitivni pacijenti s kroničnom urtikarijom u odnosu na kontrolnu skupinu imali visoku prevalenciju senzibilizacije na pelud i plijesan. U toj skupini pacijenata bila je niža prevalencija senzibilizacije na grinje kućne prašine u odnosu na skupinu pacijenata s prisutnim alergijskim rino-konjuktivitisom i bronhijalnom astmom, čak i u regijama s manjim opterećenjem alergenima grinja (149).

Interesantno, ova studija radnika riboprerađivačke industrije Hrvatske nije pokazala razlike u senzibilizaciji na parazit između pušača i nepušača, ali su bivši pušači imali značajno viši rizik za seropozitivitet u odnosu na trenutne pušače, moguće radi promjena mukocilijarnog epitela karakterističnih za bivše pušače. Iako je eliminacija cigaretama unešenih iritansa u respiratorni sustav preko cilija sluznice neučinkovita, cigarete izazivaju kašalj koji poboljšava taj proces. U bivših pušača potrebno je vrijeme, najčešće godina dana ili više, za oporavak funkcije respiratorne sluznice i mukocilijarnog epitela, što povećava prijemčivost za respiratorne infekcije (150). Moguća uloga prethodno navedenih promjena izazvanih pušenjem cigareta u senzibilizaciji na *Anisakis* spp. ostaje za daljnja istraživanja.

U odnosu na dob i spol, stariji radnici muškog spola su bili u višem riziku za *Anisakis* spp. seropozitivnost. Suprotno od toga, rezultati retrospektivnog istraživanja incidencije anisakijaze u francuskim bolnicama prikazali su viši rizik u žena i mlađe dobne skupine oboljelih (115). Međutim, potonji znanstveni rad je obuhvatio širi rang vrsta (rodove *Pseudoterranova* i *Anisakis*) te je istraživao različite oblike bolesti, dok je hrvatska studija svoj fokus usmjerila prema seropozitivnosti na parazit *Anisakis* spp.. Iako je, prema istraživanjima iz Japana i Južne Koreje ženski spol bio dominantan za seropozitivnost, a što je povezano ne samo s povećanom konzumacijom sirove ribe nego i sudjelovanjem više žena nego muškaraca u pripremi ribe, to nije pokazano u prethodno provedenom hrvatskom istraživanju Mladineo i suradnika, kao ni u istraživanjima iz SAD-a (133, 151, 152).

Rezultati prethodno navedenih studija upućuju na činjenice da se korelacija dobi/spola i prijemčivosti na parazit treba promatrati u odnosu na dodatne, specifične sociodemografske, geografske, bihevioralne i druge, za sad nepoznate čimbenike, ovisno o praćenoj populacijskoj skupini.

### 5.2. Seroprevalencija anti-*Anisakis* IgE antitijela

Ani s 7 alergen je bio prisutan u svih seropozitivnih radnika, što je sukladno s prethodno provedenim studijama koje su također potvrdile Ani s 7 kao najvažniji *Anisakis* antigen, uključivo i kod pacijenata s *Anisakis* induciranom kroničnom urtikarijom (86, 137).
Iako je na Ani s 1 antigen bilo pozitivno samo četvero ispitanika, prisutnost i ovog alergena u ELISA testu *Trisakis*-170 je korisna zato što IgE antitijela na Ani s 1 mogu biti prisutna i u nekom slučaju anisakijaze koja nije detektirana s Ani s 7 (137). Mjerenje IgE odgovora na ove alergene važno je radi činjenice da IgE senzibilizacija na *Anisakis* spp. alergene može trajati godinama, pa su specifična IgE antijela u nekih pacijenata dokazana i nakon više od osam godina od alergijske epizode. Razina specifičnih prisutnih IgE antitijela na antigene parazita se može i povećati radi povremene oralne izloženosti *Anisakis* spp. alergenima prisutnim u proizvodima ribarstva (84).
Tijekom testiranja *ImmunoCAP* testom (koji sadrži sve antigene nematode) uzoraka seruma podskupine djelatnika tvornica (n=76; radnici koji su bili Ani s 1 ili Ani s 7 seropozitivni ili seronegativni, ali sa jednim ili više alergijskih simptoma), pozitivna reakcija je potvrđena u samo sedam *Trisakis*-170 seropozitivnih uzoraka seruma radnika. Na prvi pogled djeluje iznenađujuće, ali radi sadržaja antigena parazita u *ImmunoCAP* testu, razna druga cirkulirajuća antitijela mogu se vezati na njih, te dati lažno pozitivni rezultat (153). Razumno objašnjenje za takve rezultate je da Ani s 1 i/ili Ani s 7 glavni alergeni mogu biti neadekvatno zastupljeni u postojećem sastavu antigena koji se koriste u *ImmunoCAP* testu, što može proizvesti negativan rezultat testa kada je odgovor na te alergene dominantan. Relativno nizak IgE odgovor zamijećen kod nekih uzoraka seruma radnika testiranih *ImmunoCAP* u odnosu na *Trisakis*-170 u skladu je s ovom hipotezom. Dodatno, činjenica da su svi pozitivni serumi na *ImmunoCAP* testu bili pozitivni i na *Trisakis*-170 testu, osnažuje zaključak da profesionalno okruženje (tj. okoliš na radnom mjestu u tvornici za preradu ribe) samo za sebe nije povezano s rizikom od *Anisakis* seropozitivosti. Da nije

tako, bio bi očekivan značajan broj radnika koji su u kontaktu s *Anisakis* spp. antigenima (npr. kroz konzumaciju prerađene ribe ili putem aerosola na radnom mjestu) s pozitivnim *ImmunoCAP* i negativnim*Trisakis*-170 testom. Sve seropozitivne radnike epidemiolog je obavijestio telefonom o rezultatima testa te su tijekom razgovora dodatno anketirani o tome jesu li nekad prije, nakon obroka koji je uključivao ribu ili glavonošce, imali gastrointestinalne tegobe ili/i alergijske smetnje. Većina se prisjetila (8 osoba) i povezala konzumaciju ribe s pojavom probavnih odnosno alergijskih smetnji nakon tog obroka.

Razlike u seroprevalenciji zdrave populacije između studije Mladineo i suradnika (2,0%) i ovog istraživanja (0,0%) vjerojatno su povezane s različitom strukturom te dvije skupine (133). Ranije istraživanje je regrutiralo osobe koje su imale obvezu profesionalnih sistematskih pregleda uz korištenje stratificiranog odabira ispitanika, dok je ovo istraživanje za kontrolnu skupinu koristilo darivatelje krvi s prebivalištem na područjima s tvornicama, a koji pripadaju najzdravijoj populaciji, te bolje odgovaraju dobi ispitivane skupine radnika u tvornicama za preradu ribe. U odnosu na kontrolne ispitanike iz istraživanja provedenog 2014. godine, sudionici zadnje studije su bili prosječno 19 godina mlađi (95% CI 17-21).

### 5. 3. HLA i *Anisakis* spp. senzibilizacija

HLA proteini razreda I i razreda II igraju ključnu ulogu u prilagodbi humanog imunološkog sustava, dok potonji posreduju u specifičnoj imunizaciji na antigen. U ovom istraživanju identificirano je nekoliko lokusa HLA razreda II snažno povezanih s *Anisakis* spp. seropozitivnosti, većinom povećavajući rizik od nastanka seropozitivnosti. To ukazuje da bi identificirani HLA aleli mogli biti uključeni u funkcionalno poboljšanje antigen prezentirajuće uloge razreda, npr. trajnom prezentacijom antigena, a prema prethodno opisanoj preosjetljivosti na ovaj parazit (137). Slično rezultatima ove studije, Sánchez-Velasco sa suradnicima je ukazao da je HLA-DRB1*04:04 povećao rizik za nastanak alergije na parazit 4,9 puta, dok je prisutnost DQB1*02:02 bila vezana isključivo uz pacijente s *Anisakis* spp. izazvanim alergijama (76). Osim prethodno detektiranih HLA alela, istraživanje uključenih radnika riboprerađivačke industrije u Hrvatskoj identificiralo je sedam drugih, moguće rizičnih, HLA alela prikazanih prethodno u rezultatima. Iako neki od tih alela mogu predstavljati lažnu povezanost, niz spoznaja potvrđuje njihovu identifikaciju. Tako je poznato da je uočeni DRB1*11:01 alel uključen i u prezentaciju grupe 2 alergena *Dermatophagoides* spp., a na koje su svi *Anisakis* spp. alergični pacijenti

prethodno pokazali senzibilizaciju (154, 155). U ovom istraživanju, DQB1*05:02 je identificiran kao snažan protektivan čimbenik u odnosu na *Anisakis* spp. seropozitivnost, te je ujedno zaštitni čimbenik za nastanak alergijskog rinitisa uzrokovanog grinjem kućne prašine (156). Lista važnih HLA alela i haplotipova za *Anisakis* spp. senzibilizaciju, dokazanih u istraživanju i povezanih s drugim kliničkim entitetima prikazana je u dodatnim materijalima disertacije. Odnos HLA i *Anisakis* senzibilizacije, zbog svega navedenoga, treba radije promatrati u svjetlu generalne osjetljivosti (atopijske predispozicije) seropozitivne osobe, što uključuje alergije na glavne alergene, radi promjena (oštećenja) u njenom imunološkom sustavu nego samog za sebe parazita.

### 5.4. Spirometrijsko testiranje profesionalno izložene populacije

Više do sada objavljenih znanstvenih radova ukazalo je na povezanost izloženosti bioaerosolu radnika u tvornicama za preradu ribe, inhalacije čestica raspršenih u zraku tijekom procesa prerade ribe i pojave respiratornih simptoma, uključujući bronhijalnu hiperreaktivnost ili astmu zaposlenika. (148, 157, 158).

Istraživanje Žuškin i suradnika, koje je obuhvatilo 98 radnica zaposlenih u tvornici za preradu ribe na hrvatskoj obali Jadrana i 95 kontrolnih ispitanika, pokazalo je nakon analize rezultata provedenih spirometrijskih mjerenja da su kronični respiratorni simptomi bili značajno više prisutni u zaposlenih u preradi ribe u usporedbi s kontrolama. U ispitivanoj skupini radnika pušači i nepušači imali su sličnu prevalenciju kroničnih respiratornih simptoma. Ovi nalazi upućuju na to da su radnici u preradi ribe, moguće radi profesionalne izloženosti, skloni razvoju akutnih i kroničnih respiratornih simptoma, kao i promjenama plućne funkcije (159). Kako bi utvrdili povezanost između seropozitivnosti na *Anisakis* spp. i postojanja promjena u plućnoj funkciji, tijekom ovog istraživanja provedeno je u skupini zaposlenika u tvornicama za preradu ribe spirometrijsko mjerenje slijedećih parametara: forsirani vitalni kapacitet (FVC), forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1) te Tiffenau indeks (TI). Rezultati mjerenja nisu pokazali značajnu razliku u plućnoj funkciji između seropozitivnih i seronegativnih ispitanika, a prema samoprijavljenim alergijskim manifestacijama, seropozitivni radnici nisu često navodili respiratorne simptome. Potrebno je napomenuti da su sve tvornice u Hrvatskoj, čiji su radnici uključeni u istraživanje, uz korištenje financijskih sredstava europskih fondova (IPARD programa) restrukturirane u

moderne pogone s najvišim standardima, kako u proizvodnji i preradi ribe, tako i u zaštiti zdravlja zaposlenika, što sigurno nije slučaj svugdje u svijetu. Tako je istraživanje provedeno u Južnoj Africi u radnika (578) dvije tvornice za preradu ribe, pokazalo značajnu senzibilizaciju zaposlenika na *Anisakis* spp. povezanu sa simptomima dermatitisa i nespecifičnom bronhijalnom hiperreaktivnosti, potvrđene spirometrijom i metakolinskim testom, koja je značajno rasla s konzumacijom ribe (69). Scala sa suradnicima je opisao slučaj astme kao posljedice profesionalne izloženosti u radnice zaposlene u tvornici za preradu ribe, praćene generaliziranom urtikarijom i visokim vrijednostima specifičnih IgE antitijela na *Anisakis simplex*. Autori su zaključili da parazit može biti značajan čimbenik za nastanak astme ili urtikarije radi profesionalne izloženosti alergenima nametnika (inhalacijom ili putem kontakta s kožom) u osoba zaposlenih u preradi ribe (123).

# 6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje predstavlja do sada najveću provedenu seroepidemiološku studiju koja evaluira rizik od izloženosti *Anisakis* spp. alergenima zaposlenika u riboprerađivačkoj industriji, testirajući povezanost u odnosu na brojne sociodemografske, bihevioralne, i zdravstvene značajke, profesionalnu izloženost na radnom mjestu, i seroprevalenciju anisakijaze.

Iako je utvrđena značajno veća seroprevalencija u radnika riblje industrije u odnosu na zdrave, kontrolne ispitanike, kao glavni čimbenik rizika za senzibilizaciju na parazit pokazao se hobi ribolov u slobodno vrijeme, a ne profesionalna izloženost na radnom mjestu u tvornici za preradu ribe. Glavno ograničenje ovog istraživanja se odnosi na mali broj seropozitivnih radnika, kao i neravnotežu između broja zaposlenika koji su na svojim radnim jedinicama svakodnevno u direktnom kontaktu s ribom u odnosu na druge zaposlenike tvornica. Bez obzira na navedene limite, korištena metodologija tijekom analize podataka provedene studije omogućila je vjerodostojne procjene, uz optimalan omjer troškova i koristi istraživanja. Budući da je istraživanje obuhvatilo gotovo sve zaposlenike riboprerađivačke industrije, rezultati istraživanja reflektiraju trenutnu *Anisakis* spp. seroprevalenciju zaposlenika tog sektora industrije, te predstavljaju kvalitetnu osnovu za daljnja istraživanja.

# 7. SAŽETAK

Ovo je prva studija koja sistematski i sveobuhvatno evaluira rizik od senzibilizacije na *Anisakis* spp. i potencijalne genetske prijemčivosti za anisakijazu. Radi procjene seroprevalencije anisakijaze i mogućih čimbenika rizika uključeno je u studiju 600 zaposlenika tvornica za preradu morske ribe i glavonožaca u Hrvatskoj, kao i 466 zdravih kontrolnih ispitanika koje su činili dobrovoljni darivatelji krvi. Izuzeti uzorci krvi svih osoba uključenih u istraživanje testirani su različitim laboratorijskim testovima: indirektnim ELISA testom koji sadrži rekombinantne Ani s 1 and Ani s 7 alergene, drugim testom koji je baziran na *Anisakis* sirovom pripravku, te komercijalnim *ImmunoCAP* testom. Svi su anketirani putem pripremljenog upitnika, a genetska prijemčivost je ispitana metodom genotipizacije humanih leukocitnih alela (HLA sustav). Zaključno, opažena anti-*Anisakis* seroprevalencija utvrđena indirektnim ELISA testom bila je značajno viša u radnika riboprerađivačke industrije (1,8%; 95% CI 0,9-3,3%) u odnosu na kontrolne ispitanike (0,0%; 95% CI 0,0-0,8%). Svi seropozitivni radnici (11) su nakon provedenog istraživanja telefonom obaviješteni o rezultatima testa uz upit o pojavi tegoba nakon ribljeg obroka u prošlosti te je većina (8) radnika povezala konzumaciju ribe i probavne ili alergijske smetnje. Sedam od 11 prethodno pozitivnih radnika na *Trisakis* 170 testu (Ani s 1 i Ani s 7 antigeni) imalo je pozitivne rezultate *ImmunoCAP* testa (alergeni cijelog parazita), a nitko od 65 odabranih, prethodno negativnih radnika (na *Trisakis 170* testu) nije imao pozitivan rezultat. Rezultati testa u kojem je korišten prethodno pripremljeni sadržaj sirove nematode detektirao je seropozitivnost u 3,9% radnika, od kojih je troje (14%) ujedno pokazalo IgE reaktivnost na proteine mlijeka. Najviši rizik povezan sa senzibilizacijom na parazit bio je hobi ribolov kao oblik aktivnosti tijekom slobodnog vremena, u odnosu na bilo koji čimbenik povezan sa svakodnevnim poslom u tvornici za preradu ribe. Iako nije opažena povezanost između seropozitivnosti radnika i nošenja zaštite maske ili rukavica, većina radnika je tijekom posla (92%) nosila rukavice te je time smanjila mogućnost senzibilizacije na nametnika preko kože, tijekom procesuiranja ribe. Šest HLA alela na DRB1 genu pokazalo je značajnu povezanost sa seropozitivnošću, bilo na dominantnom ili recesivnom modelu. Istraživanjem su obuhvaćeni gotovo svi zaposlenici u riboprerađivačkom sektoru Hrvatske, koji su inače izloženi utjecaju različitih alergena na radnom mjestu, pa rezultati pokazuju trenutno stanje seroprevalencije anisakijaze u radnika ove grane industrije.

# 8. SUMMARY

We undertook the first study systematically evaluating the risk of *Anisakis*-sensitization in Croatian fish-processing workers and potential genetic susceptibility to anisakiasis. Anti-*Anisakis* IgE seroprevalence and risk factors for 600 employees of Croatian fish processing facilities and 466 blood donor controls, were assessed by indirect ELISA targeted with: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens, an *Anisakis* Crude Extract, the commercial *ImmunoCAP* kit, and questionnaires. Genetic susceptibility to anisakiasis was evaluated by genotypization of human leukocytes alleles (HLA). Overall, the observed anti-*Anisakis* seroprevalence inferred by indirect ELISA was significantly higher in fish processing workers (1.8%; 95% CI 0.9-3.3%) compared to the controls (0.0%; 95% CI 0.0-0.8%). All seropositive workers (11) were contacted by telephone and notified about results of the test, and also asked about any occurance of discomfort after a fish meal they had in the past. Majority of the workers (8) combined fish consumption with digestive or allergic problems. Seven out of 11 Ani s 1 and Ani s 7 - positives and none of selected 65 negative sera, tested positive on whole-*Anisakis* extract (*ImmunoCAP*), whereas *Anisakis C*rude Extract ELISA detected 3.9% seropositives in fish processing workers, three (14%) of which showed IgE reactivity to milk proteins. The highest risk associated with *Anisakis* sensitization among workers was fishing in the free time, rather than any of attributes related to the occupational exposure. Although no association was observed between anti *Anisakis* seropositivity and wearing gloves or protective goggles, the majority of workers (92%) wore protective gloves, minimizing the risk for *Anisakis* sensitization via skin contact. Six HLA alleles within DRB1 gene were significantly associated with seropositivity under dominant, allelic or recessive models. The study exhaustively covered almost all marine fish processing workers in Croatia, reflecting real-time *Anisakis* seropositivity status within the industry, already under the influence of wide array of allergens.

# 9. POPIS LITERATURE


1. Dorny P, Praet N, Deckers N, Gabriel S. Emerging food-borne parasites. Vet Parasitol. 2009;163(3):196-206.
2. Pozio E. How globalization and climate change could affect foodborne parasites. Exp Parasitol. 2020;208:107807.
3. Gutiérrez NL, Hilborn R, Defeo O. Leadership, social capital and incentives promote successful fisheries. Nature. 2010;470(7334):386-9.
4. Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality-results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Med. 2013;11(1):1-12.
5. Román G, Jackson R, Gadhia R, Román A, Reis J. Mediterranean diet: The role of long-chain ω-3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. Rev Neurol. 2019;175(10):724-41.
6. Commission E. Facts and Figures on the Common Fisheries Policy. Basic statistical data. Bruxelles: European Commission; 2018.
7. WHO. Control of foodborne trematode infections. World Health Organ Tech Rep Ser. 1995;849:1-157.
8. World Health Organization. Soil-transmitted helminthiases: eliminating as public health problem soil-transmitted helminthiases in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. Geneva: WHO; 2012.
9. Pampiglione S, Rivasi F, Criscuolo M, De Benedittis A, Gentile A, Russo S, et al. Human anisakiasis in Italy: a report of eleven new cases. Pathol Res Pract. 2002;198(6):429-34.
10. Mattiucci S, Nascetti G. Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with Implications for their Evolutionary Ecology and Host-Parasite Co-evolutionary Processes. Adv Parasitol. 2008;66:47-148.
11. Verma R, Gogia JS, Khalili M. Ceviche and Abdominal Pain, A Rare Case of Anisakis simplex in the United States. Am J Gastroenterol. 2005;100:S191.
12. Karl H, Roepstorff A, Huss HH, Bloemsma B. Survival of Anisakis larvae in marinated herring fillets. Int J Food Sci Technol. 1994;29(6):661-70.

13. Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL. Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes. 2014;28(4):167-74.
14. Del Rey Moreno A, Valero A, Mayorga C, Gómez B, Torres MJ, Hernández J, et al. Sensitization to Anisakis simplex s.l. in a healthy population. Acta Trop. 2006;97(3):265-9.
15. Seal A, Harding C, Shamsi S. A preliminary report on the awareness and knowledge of seafood-borne parasitic diseases among medical doctors in Australia. Parasitol Int. 2020;74:101993.
16. Buchmann K, Mehrdana F. Effects of anisakid nematodes Anisakis simplex (s.l.), Pseudoterranova decipiens (s.l.) and Contracaecum osculatum (s.l.) on fish and consumer health. Food Waterborne Parasitol. 2016;4:13-22.
17. Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Collins JD, Griffin J, Havelaar A, et al. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel Biol Hazards. 2010;8(4):1543.
18. Cavallero S, Nadler SA, Paggi L, Barros NB, D'Amelio S. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. Parasitol Res. 2011;108(4):781-92.
19. Grabda J. Studies on the life cycle and morphogenesis of Anisakis simplex (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured in vitro. Acta Ichthyol Piscat. 1976;6(1):119-41.
20. Mattiucci S, Nascetti G. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus Anisakis Dujardin, 1845: an update. Parasite. 2006;13(2):99-113.
21. Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L. Electrophoretic studies on the Anisakis simplex complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. Int J Parasitol. 1986;16(6):633-40.
22. Mattiucci S, Cipriani P, Levsen A, Paoletti M, Nascetti G. Molecular Epidemiology of Anisakis and Anisakiasis: An Ecological and Evolutionary Road Map. Adv Parasitol. 2018;99:93-263.
23. Hemmingsen W, Lysne DA, Eidnes T, Skorping A. The occurrence of larval ascaridoid nematodes in wild-caught and in caged and artificially fed Atlantic cod, Gadus morhua L., in Norwegian waters. Fish Res. 1993;15(4):379-86.

24. Smith JW. Anisakis simplex (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878): length distribution and viability of L3 of known minimum age from herring Clupea harengus L. J Helminthol. 1984;58(4):337-40.
25. Levsen A, Berland B. Anisakis species. Fish Parasites Pathobiol Prot. 2011;298-309.
26. Mladineo I. Anisakis simplex in the Adriatic Sea. Period Biol. 2003;105(4):389-92.
27. Mladineo I, Poljak V. Ecology and genetic structure of zoonotic Anisakis spp. from adriatic commercial fish species. Appl Environ Microbiol. 2014;80(4):1281-90.
28. Abollo E, Gestal C, Pascual S. Anisakis infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. Parasitol Res. 2001;87(6):492-9.
29. Serracca L, Battistini R, Rossini I, Carducci A, Verani M, Prearo M, et al. Food safety considerations in relation to Anisakis pegreffii in anchovies (Engraulis encrasicolus) and sardines (Sardina pilchardus) fished off the Ligurian Coast (Cinque Terre National Park, NW Mediterranean). Int J Food Microbiol. 2014;190:79-83.
30. Aibinu IE, Smooker PM, Lopata AL. Anisakis nematodes in fish and shellfish-from infection to allergies. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2019;9:384-93.
31. Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S. Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. PLoS One. 2011;6(12):e28642.
32. Petrić M, Mladineo I, Šifner SK. Insight into the Short-Finned Squid Illex coindetii (Cephalopoda: Ommastrephidae) Feeding Ecology: Is There a Link Between Helminth Parasites and Food Composition? J Parasitol. 2011;97(1):55-62.
33. Mladineo I, Šimat V, Miletić J, Beck R, Poljak V. Molecular identification and population dynamic of Anisakis pegreffii (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (Engraulis encrasicolus L.) in the Adriatic Sea. Int J Food Microbiol. 2012;157(2):224-9.
34. Leuckart R, Hoyle WE. The parasites of man, and the diseases which proceed from them: a text-book for students and practitioners. Edinburgh:Young J. Pentland;1886.
35. Fumarola L, Monno R, Ierardi E, Rizzo G, Giannelli G, Lalle M, et al. Anisakis pegreffi Etiological Agent of Gastric Infections in Two Italian Women Foodborne Pathog Dis. 2009;6(9):1157-9.

36. Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, Paoletti M, Marcer F, Bellisario B, et al. Genetic and Morphological Approaches Distinguish the Three Sibling Species of the Anisakis simplex Species Complex, with a Species Designation as Anisakis berlandi n. sp. for A. simplex sp. C (Nematoda: Anisakidae). J Parasitol. 2014;100(2):199-214.
37. Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, et al. Anisakidae and Anisakidosis. Prog Clin Parasitol. 1993;3:43-102.
38. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Anisakis-A food-borne parasite that triggers allergic host defences. Int J Parasitol. 2013;43(12-13):1047-57.
39. Ivanovic J, Baltic MZ, Boskovic M, Kilibarda N, Dokmanovic M, Markovic R, et al. Anisakis Infection and Allergy in Humans. Procedia Food Sci. 2015;5:101-4.
40. Yorimitsu N, Hiraoka A, Utsunomiya H, Imai Y, Tatsukawa H, Tazuya N, et al. Colonic Intussusception Caused by Anisakiasis: A Case Report and Review of the Literature. Intern Med. 2013;52(2):223-6.
41. Audicana MT, Kennedy MW. Anisakis simplex: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin Microbiol Rev. 2008;21(2):360-79.
42. Rosales MJ, Mascaró C, Fernandez C, Luque F, Sanchez Moreno M, Parras L, et al. Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage Anisakis simplex larva. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(6):823-6.
43. Kassai T, Cordero Del Campillo M, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe T, Himonas CA. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). Vet Parasitol. 1988;29(4):299-326.
44. Hochberg NS, Hamer DH, Hughes JM, Wilson ME. Anisakidosis: Perils of the Deep. Clin Infect Dis. 2010;51(7):806–12.
45. Moneo I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M. New Perspectives on the Diagnosis of Allergy to Anisakis spp. Curr Allergy Rep. 2017;17(5):1-11.
46. Kang DB, Oh JT, Park WC, Lee JK. Small Bowel Obstruction Caused by Acute Invasive Enteric Anisakiasis. Korean J Gastroenterol. 2010;56(3):192-5.
47. Schuster R, Petrini JL, Choi R. Anisakiasis of the colon presenting as bowel obstruction. Am Surg. 2003;69(4):350.
48. Kikuchi Y, Ishikura H, Kikuchi K. Pathology of Intestinal Anisakiasis. U: Ishikura H, Kikuchi K. (eds.) Intestinal Anisakiasis in Japan: infected fish, sero-immunological diagnosis and prevention. Tokyo:Springer; 1990. p.129-43.

49. Moore DA, Girdwood RW, Chiodini PL. Treatment of anisakiasis with albendazole. Lancet. 2002;360(9326):54.
50. Gómez-Mateos M, Arrebola F, Navarro MC, Romero MC, González JM, Valero A. Acute Anisakiasis: Pharmacological Evaluation of Various Drugs in an Animal Model. Dig Dis Sci. 2021;66(1):105-13.
51. Bouree P, Paugam A, Petithory JC. Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1995;18(2):75-84.
52. Nieuwenhuizen NE. Anisakis-immunology of a foodborne parasitosis. Parasite Immunol. 2016;38(9):548-57.
53. Gutiérrez R, Cuéllar C. Immunoglobulins anti-Anisakis simplex in patients with gastrointestinal diseases. J Helminthol. 2002;76(2):131-6.
54. Fujisawa K, Matsumoto T, Yoshimura R, Ayabe S, Tominaga M. Endoscopic Finding of a Large Vanishing Tumor. Endoscopy. 2001;33(09):820.
55. Jeon CH, Kim JH. Pathogenic potential of two sibling species, Anisakis simplex (s.s.) and Anisakis pegreffii (Nematoda: Anisakidae): in Vitro and in Vivo Studies. Biomed Res Int. 2015;2015:983656.
56. Tanabe M, Miyahira Y, Okuzawa E, Segawa M, Takeuchi T, Shinbo T, et al. A case report of ectopic anisakiasis. Jpn J Parasitol. 1990;39(4):397-9.
57. Takano K, Okuni T, Murayama K, Himi T. A Case Study of Anisakiasis in the Palatine Tonsils. Adv Otorhinolaryngol. 2016;77:125-7.
58. Corcuera MT, Rodríguez-Bobada C, Zuloaga J, Gómez-Aguado F, Rodríguez-Perez R, Mendizabal Á, et al. Exploring tumourigenic potential of the parasite Anisakis: a pilot study. Parasitol Res. 2018;117(10):3127-36.
59. Yoo HJ, Kim SH, Lee JM, Kim MA, Han JK, Choi BI. The Association of Anisakiasis in the Ascending Colon with Sigmoid Colon Cancer: CT Colonography Findings. Korean J Radiol. 2008;9(Suppl):S56-60.
60. Sonoda H, Yamamoto K, Ozeki K, Inoye H, Toda S, Maehara Y. An anisakis larva attached to early gastric cancer: report of a case. Surg Today. 2014;45(10):1321-5.
61. Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Alcântara L, Almeida MC, Schriefer A, et al. Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma. J Infect Dis. 2004;190(10):1797-803.

62. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. J Exp Med. 2005;202(9):1199-212.
63. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002;296(5567):490-4.
64. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(5):995-1000.
65. van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverijn JH, et al. Long-Term Treatment of Intestinal Helminths Increases Mite Skin-Test Reactivity in Gabonese Schoolchildren. J Infect Dis. 2004;189(5):892-900.
66. Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ, Shi HN, Nagler-Anderson C. An Enteric Helminth Infection Protects Against an Allergic Response to Dietary Antigen. J Immunol. 2002;169(6):3284-92.
67. Palmer LJ, Celedón JC, Weiss ST, Wang B, Fang Z, Xu X. Ascaris lumbricoides Infection Is Associated with Increased Risk of Childhood Asthma and Atopy in Rural China. Am J Respir Crit Care Med. 2012;165(11):1489-93.
68. Daschner A, Cuéllar C. The hidden sense of symptoms: Urticaria can be beneficial. Med Hypotheses. 2010;75(6):623-6.
69. Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite Anisakis causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(5):1098-105.
70. Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, Suarez-de-Parga JM, López-Serrano MC. Gastroallergic anisakiasis: Borderline between food allergy and parasitic disease-Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by Anisakis simplex. J Allergy Clin Immunol. 2000;105(1):176-81.
71. Gonzalez-Munoz M, Rodriguez-Mahillo AI, Moneo I. Different Th1/Th2 responses to Anisakis simplex are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. Parasite Immunol. 2010;32(1):67-73.
72. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M , Taradi M, i sur. Andreis I. (ur.), Imunologija. 6. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.

73. Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. Transpl Immunol. 2005;14(3-4):175-82.
74. Howell WM, Carter V, Clark B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. J Clin Pathol. 2010;63(5):387-90.
75. Kasuya S, Hamano H, Izumi S. Mackerel-induced urticaria and Anisakis. Lancet. 1990;335(8690):665.
76. Sánchez-Velasco P, Mendizábal L, Antón EM, Ocejo-Vinyals G, Jerez J, Leyva-Cobián F. Association of hypersensitivity to the nematode Anisakis simplex with HLA class II DRB1∗ 1502-DQB1∗ 0601 haplotype. Hum Immunol. 2000;61(3):314-9.
77. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Cross-reactivity of Anisakis simplex: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. Int J Dermatol. 2007;46(2):146-50.
78. Anibarro B, Seoane FJ, Mugica MV. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. J Investig Allergol Clin Immunol. 2007;17(3):168-72.
79. Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF, Kennedy MW. Anisakis simplex: dangerous-dead and alive? Trends Parasitol. 2002;18(1):20-5.
80. Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. Front Immunol. 2014;5:61.
81. Audicana MT, de Corres LF, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA, del Pozo MD. Recurrent anaphylaxis caused by Anisakis simplex parasitizing fish. J Allergy Clin Immunol. 1995;96(4):558-60.
82. Morishima R, Motojima S, Tsuneishi D, Kimura T, Nakashita T, Fudouji J, et al. Anisakis is a major cause of anaphylaxis in seaside areas: An epidemiological study in Japan. Allergy. 2020;75(2):441-4.
83. Armentia A, Martin-Gil FJ, Pascual C, Martín-Esteban M, Callejo A, Martinez C, et al. Anisakis simplex allergy after eating chicken meat. J Investig Allergol Clin Immunol. 2006;16(4):258-63.
84. Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M. Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite Anisakis spp. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(7):e0004864.
85. Moneo I, Caballero ML, Gómez F, Ortega E, Alonso MJ. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite Anisakis simplex. J Allergy Clin Immunol. 2000;106(1):177-82.

86. Rodríguez E, Anadón AM, García-Bodas E, Romarís F, Iglesias R, Gárate T, et al. Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the Anisakis simplex Ani s 7 major allergen. Allergy. 2008;63(2):219-25.
87. de Las Vecillas L, Muñoz-Cacho P, López-Hoyos M, Monttecchiani V, Martínez-Sernández V, Ubeira FM, et al. Analysis of Ani s 7 and Ani s 1 allergens as biomarkers of sensitization and allergy severity in human anisakiasis. Sci Rep. 2020;10(1):1-10.
88. Tripodi S, Pingitore G, Calvani M, Scala G, Rodriguez-Perez R, Sfika I, et al. Anisakis Sensitivity in Italian Children: A Prospective Study. J Investig Allergol Clin Immunol. 2017;27(2):142-3.
89. Consortium A-IA. Anisakis hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. Allergy. 2011;66(12):1563-9.
90. Daschner A, Alonso-Gómez A, López Serrano C. What does Anisakis simplex parasitism in gastro-allergic anisakiasis teach us about interpreting specific and total IgE values? Allergol Immunopathol. 2000;28(2):67-70.
91. Caballero ML, Asero R, Antonicelli L, Kamberi E, Colangelo C, Fazii P, et al. Anisakis allergy component-resolved diagnosis: clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. Int Arch Allergy Immunol. 2013;162(1):39-44.
92. Llarena-Reino M, Abollo E, Regueira M, Rodríguez H, Pascual S. Horizon scanning for management of emerging parasitic infections in fishery products. Food Control. 2015;49:49-58.
93. Fiorenza EA, Wendt CA, Dobkowski KA, King TL, Pappaionou M, Rabinowitz P, et al. It'sa wormy world: Meta-analysis reveals several decades of change in the global abundance of the parasitic nematodes Anisakis spp. and Pseudoterranova spp. in marine fishes and invertebrates. Glob Chang Biol. 2020;26(5):2854-66.
94. Broglia A, Kapel C. Changing dietary habits in a changing world: emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. Vet Parasitol. 2011;182(1):2-13.
95. Deardorff TL, Overstreet RM. Seafood-transmitted zoonoses in the United States: the fishes, the dishes, and the worms. In: Ward DR, Hackney C, ed. Microbiology of marine food products. New York: Springer; 1991. p. 211-265.
96. Caldeira AJR, Alves CPP, Santos MJ. Anisakis notification in fish: an assessment of the cases reported in the European Union Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) database. Food Control. 2021;124:107913.

97. Mercken E, Van Damme I, Serradell A, Gabriël S. Presence of Anisakidae in commercial fish species imported into the Belgian food markets: A systematic review and meta-analyses. Int J Food Microbiol. 2020;318:108456.
98. D'amico P, Malandra R, Costanzo F, Castigliego L, Guidi A, Gianfaldoni D, et al. Evolution of the Anisakis risk management in the European and Italian context. Food Res Int. 2014;64:348-62.
99. Karl H. Nematode larvae in fish on the German market 20 years of consumer related research. Arch Lebensmittelhyg. 2008;59(3):107-19.
100. Cipriani P, Acerra V, Bellisario B, Sbaraglia GL, Cheleschi R, Nascetti G, et al. Larval migration of the zoonotic parasite Anisakis pegreffii (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, Engraulis encrasicolus: Implications to seafood safety. Food Control. 2016;59:148-57.
101. Bao M, Pierce GJ, Strachan NJC, Martínez C, Fernández R, Theodossiou I. Consumers' attitudes and willingness to pay for Anisakis-free fish in Spain. Fish Res. 2018;202:149-60.
102. Codex Alimentarius Commision. Proposed draft standard for ready-to-eat smoked fish. EC. Geneva; 2004.
103. Visciano P, Schirone M. Rapid Methods for Assessing Food Safety and Quality. Foods. 2020;9(4):533.
104. Llarena-Reino M, González ÁF, Vello C, Outeiriño L, Pascual S. The accuracy of visual inspection for preventing risk of Anisakis spp. infection in unprocessed fish. Food Control. 2012;23(1):54-8.
105. Levsen A, Lunestad BT, Berland B. Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. J Food Prot. 2005;68(4):828-32.
106. Karl H, Leinemann M. A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. Arch Leb. 1993;44(5):124-5.
107. Miles S, Fordham R, Mills C, Valovirta E, Mugford M. A framework for measuring costs to society of IgE-mediated food allergy. Allergy. 2005;60(8):996-1003.
108. Morozinska-Gogol J. Anisakis spp. as etiological agent of zoonotic disease and allergy in European region-an overview. Ann Parasitol. 2019;65(4):303-14.

109. Asaishi K, Nishino C, Hayasaka H. Geographical distribution and epidemiology. In: Hajime I, Masayoshi N, eds. Gastric anisakiasis in Japan. Tokyo: Springer; 1989. p. 3-6.
110. Rahmati AR, Kiani B, Afshari A, Moghaddas E, Williams M, Shamsi S. World-wide prevalence of Anisakis larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. Parasitol Res. 2020;1-10.
111. Bouwknegt M, Devleesschauwer B, Graham H, Robertson LJ, van der Giessen JW; The Euro-Fbp Workshop Participants. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. Euro Surveill. 2018;23(9):17-161.
112. Bao M, Pierce GJ, Pascual S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, et al. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. Sci Rep. 2017;7(1):1-17.
113. Serrano-Moliner M, Morales-Suarez-Varela M, Valero MA. Epidemiology and management of foodborne nematodiasis in the European Union, systematic review 2000-2016. Pathog Glob Health. 2018;112(5):249-58.
114. Cavallero S, Martini A, Migliara G, De Vito C, Iavicoli S, D'Amelio S. Anisakiasis in Italy: Analysis of hospital discharge records in the years 2005-2015. PLoS One. 2018;13(12):e0208772.
115. Yera H, Fréalle É, Dutoit E, Dupouy-Camet J. A national retrospective survey of anisakidosis in France (2010-2014): decreasing incidence, female predominance, and emerging allergic potential. Parasite. 2018;25:23.
116. Figueiredo I, Vericimo M, Terra L, Ferreira T, São Clemente SC, Teixeira G. Association between immunoreactivity to Anisakis spp. antigens and high-risk pregnancy. Acta Parasitol. 2015;60(4):609-13.
117. Toro C, Caballero ML, Baquero M, García-Samaniego J, Casado I, Rubio M, et al. High prevalence of seropositivity to a major allergen of Anisakis simplex, Ani s 1, in dyspeptic patients. Clin Vaccine Immunol. 2004;11(1):115-8.
118. Adroher-Auroux FJ, Benítez-Rodríguez R. Anisakiasis and Anisakis: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. Res Vet Sci. 2020;132:535-45.

119. Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. A case report of Anisakis pegreffii (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. BMC Infect Dis. 2015;16(1):1-5.
120. Jurić I, Pogorelić Z, Despot R, Mrklić I. Unusual cause of small intestine obstruction in a child: small intestine anisakiasis: report of a case. Scott Med J. 2013;58(1):e32-36.
121. FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. FAO: Rome; 2016.
122. Jeebhay MF, Cartier A. Seafood workers and respiratory disease: an update. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2010;10(2):104-13.
123. Scala E, Giani M, Pirrotta L, Guerra EC, Cadoni S, Girardelli CR, et al. Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to Anisakis simplex. Eur J Dermatology. 2001;11(3):249-50.
124. Europska komisija. Činjenice i slikovni prikazi o politici usuglašenih mjera EU-a namijenjenih opstanku i održivosti europske ribarstvene industrije. Osnovni statistički podaci. Bruxelles: Europska komisija; 2016.
125. Levsen A, Svanevik CS, Cipriani P, Mattiucci S, Gay M, Hastie LC, et al. A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds-Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. Fish Res. 2018;202:4-21.
126. Državni zavod za statistiku. Statistički ljetopis Republike Hrvatske 2015. Zagreb: DZZS; 2016. str. 289-90.
127. European Commission. The Rapid Alert System for Food and Feed-Annual Report 2019. European Commission: Bruxelles; 2020.
128. Mazzucco W, Lacca G, Cusimano R, Provenzani A, Costa A, Di Noto AM, et al. Prevalence of sensitization to Anisakis simplex among professionally exposed populations in Sicily. Arch Environ Occup Health. 2012;67(2):91-7.
129. Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Martin Santos JM, Gil FJ, Vega J, et al. Occupational asthma by Anisakis simplex. J Allergy Clin Immunol. 1998;102(5):831-4.
130. Mazzucco W, Raia DD, Marotta C, Costa A, Ferrantelli V, Vitale F, et al. Anisakis sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. PLoS One. 2018;13(9):e0203671.

131. Abattouy N, Valero A, Martín-Sánchez J, Peñalver MC, Lozano J. Sensitization to Anisakis simplex species in the population of Northern Morocco. J Investig Allergol Clin Immunol. 2012;22(7):514-9.
132. Jeebhay MF, Robins TG, Lopata AL. World at work: fish processing workers. Occup Environ Med. 2004;61(5):471-4.
133. Mladineo I, Poljak V, Martinez-Sernandez V, Ubeira FM. Anti-Anisakis IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2):e2673.
134. Croatian Bureau of Statistics (CBS). Average monthly gross earning per person in paid employment in legal entities, according to NKD 2017. Activity sections-period, results from JOPPD forms (in Croation and English form). Zagreb: Croatian Bureau of Statistics; 2018.
135. Anadón AM, Rodríguez E, Gárate MT, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, et al. Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. Clin Vaccine Immunol. 2010;17(4):496-502.
136. Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, et al. The Anisakis simplex Ani s 7 major allergen as an indicator of true Anisakis infections. Clin Exp Immunol. 2009;156(3):471-8.
137. Cuéllar C, Daschner A, Valls A, De Frutos C, Fernández-Fígares V, Anadón AM, et al. Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct Anisakis simplex-associated allergic clinical disorders. Arch Dermatol Res. 2012;304(4):283-8.
138. Junior IF, Vericimo MA, Cardoso LR, São Clemente SC, Do Nascimento ER, Teixeira GA. Cross-sectional study of serum reactivity to Anisakis simplex in healthy adults in Niterói, Brazil. Acta Parasitol. 2013;58(3):399-404.
139. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. Eur Respir J. 2005;26(2):319-38.
140. Heinze G, Schemper M. A solution to the problem of separation in logistic regression. Stat Med. 2002;21(16):2409-19.
141. Vittinghoff E, McCulloch CE. Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. Am J Epidemiol. 2007;165(6):710-8.

142. Barbuzza O, Guarneri F, Galtieri G, Gangemi S, Vaccaro M. Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by Anisakis simplex. Contact Dermatitis. 2009;60(4):239-40.
143. Purello-D'Ambrosio F, Pastorello E, Gangemi S, Lombardo G, Ricciardi L, Fogliani O, et al. Incidence of sensitivity to Anisakis simplex in a risk population of fishermen/fishmongers. Ann Allergy Asthma Immunol. 2000;84(4):439-44.
144. Croatian Chamber of Commerce (HGK). Vodič za dobru higijensku praksu u industriji proizvoda ribarstva. [In Croatian] (A guide for good hygiene practices in fish processing industry). 2015. [Internet]. Dostupno na : https://www.hgk.hr/documents/vodiczadobru.
145. Wei J, Gerlich J, Vogelberg C, von Mutius E, Windstetter D, Genuneit J, et al. Do young adults with atopic dermatitis avoid harmful workplace exposure at their first job? A prospective cohort study. Int Arch Occup Environ Health. 2016;89(3):397-406.
146. Yilmaz EA, Karaatmaca B, Sackesen C, Sahiner UM, Cavkaytar O, Sekerel BE, et al. Parasitic infections in children with chronic spontaneous urticaria. Int Arch Allergy Immunol. 2016;171(2):130-5.
147. Kolkhir P, Balakirski G, Merk HF, Olisova O, Maurer M. Chronic spontaneous urticaria and internal parasites-a systematic review. Allergy. 2016;71(3):308-22.
148. Jeebhay MF, Robins TG, Miller ME, Bateman E, Smuts M, Baatjies R, et al. Occupational allergy and asthma among salt water fish processing workers. Am J Ind Med. 2008;51(12):899-910.
149. Daschner A, Rodero M, De Frutos C, Valls A, Cuellar C. Chronic urticaria is associated with a differential helminth-arthropod-related atopy phenotype. J Dermatol. 2010;37(9):780-5.
150. Utiyama DM, Yoshida CT, Goto DM, de Santana Carvalho T, de Paula Santos U, Koczulla AR, et al. The effects of smoking and smoking cessation on nasal mucociliary clearance, mucus properties and inflammation. Clinics. 2016;71(6):344-50.
151. Sohn WM, Na BK, Kim TH, Park TJ. Anisakiasis: Report of 15 gastric cases caused by Anisakis type I arvae and a brief review of Korean anisakiasis cases. Korean J Parasitol. 2015;53(4):465-70.
152. Shiferaw B, Verrill L, Booth H, Zansky SM, Norton DM, Crim S, et al. Sex-based differences in food consumption: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) population survey, 2006-2007. Clin Infect Dis. 2012;54(Suppl 5):453-7.

153. Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, Cherchi S, Pezzotti P, Pozio E. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. Clin Vaccine Immunol. 2008;15(11):1723-9.
154. Verhoeff A, Higgins JA, Thorpe CJ, Marsh SG, Hayball JD, Lamb JR. Clonal analysis of the atopic immune response to group 2 allergens of Dermatophagoides spp: identification of HLA-DR and-DQ restricted T cell epitopes. Int Immunol. 1993;5:1589-97.
155. Fæste CK, Jonscher KR, Dooper MM, Egge-Jacobsen W, Moen A, Daschner A, et al. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite Anisakis simplex. EuPA open proteom. 2014;4:140-55.
156. Zhao Y, Zhao Y, Li J, Zhang Y, Zhang L. HLA-DRB1*08:03:02 and HLA-DQB1*06:01:01 are associated with house dust mite-sensitive allergic rhinitis in Chinese subjects. Int Forum Allergy Rhinol. 2016;6(8):854-61.
157. Bang B, Aasmoe L, Aamodt BH, Aardal L, Andorsen GS, Bolle R, et al. Exposure and airway effects of seafood industry workers in northern Norway. J Occup Environ Med. 2005;47(5):482-92.
158. Bønløkke JH, Thomassen M, Viskum S, Omland Ø, Bonefeld-Jørgensen E, Sigsgaard T. Respiratory symptoms and ex vivo cytokine release are associated in workers processing herring. Int Arch Occup Environ Health. 2004;77(2):136-41.
159. Žuškin E, Kern J, Mustajbegović J, Pucarin-Cvetković J, Doko-Jelinić J, Bradić T. Respiratorni simptomi u radnica na preradi riba na obali Jadrana u Hrvatskoj. Arh Hig Rada Toksikol. 2012;63(2):199-204.

## 10. DODATNI MATERIJALI

### 10. 1. Upitnik

Osobni podatci

Spol: M Ž

Godina rođenja:

Adresa stanovanja:

Mobitel:

1. Od kada radite u industriji prerade ribe:

2. Status zaposlenja:
   a) puno radno vrijeme
   b) pola radnog vremena
   c) sezonski posao

3. Kakav posao radite (molimo navedite točno):

4. Je li se bavite ribolovom u slobodno vrijeme:
   a) da
   b) ne

5. Je li solite ribu za vlastite potrebe:
   a) da
   b) ne

6. Je li na radnom mjestu nosite zaštitnu opremu:
   a) ne
   b) gumene rukavice
   c) zaštitnu masku
   d) zaštitne naočale

7. Jeste li na radnom mjestu izloženi udisanju vodenih kapljica ili pare:

a) da

b) ne

8. Pušenje:

a) ne pušim

b) bivši pušač (ne pušim već više od mjesec dana)

c) pušim svakodnevno

9. Ako ste pušač, koliko dnevno pušite cigareta:

Prehrana:

10. Je li jedete meso?

a) da

b) ne

11. Je li jedete ribu i riblje proizvode:

a) da

b) ne

12. Koliko često jedete ribu i riblje proizvode:

a) svakog dana

b) nekoliko puta tjedno

c) jednom tjedno

d) rijetko

13. Je li jedete termički neobrađenu ribu (sirovu, usoljenu ili mariniranu ribu):

a) da

b) ne

14. Ukoliko jedete ribu, kako je najčešće pripremate:

a) kuham je

b) pečem je

c) mariniram je

d) solim je

e) dimim je

f) jedem je sirovu (inćun, papalina, sushi..)

15. Riba koju najčešće jedete je:

a) plava riba

b) bijela riba

c) slatkovodna riba

16. Riblja jela koja koristite:

a) pripremate u kući

b) kupujete već pripremljeno u trgovini

c) jedete u restoranu

Zdravstvena anamneza:

17. Je li bolujete od neke kronične bolesti:

a) da

b) ne

18. Ukoliko bolujete, od koje:

a) bolesti pluća

b) bolesti srca i krvnih žila

c) maligne bolesti

d) alergijske bolesti ( kožne promjene,upala nosne i očne sluznice, bronhitis, astma..)

e) bolesti imunološkog sustava ( reumatoidni artritis..)

f) drugo

19. Je li uzimate lijekove i koje:

20. Je li imate alergijske smetnje:

a) urtikarija, crvenilo kože (najčešće na rukama)

b) konjuktivitis (crvenilo očiju, suzenje, svrbež očiju)

c) rinitis (svrbež nosa, slinjenje)

d) nadražajni kašalj, kihanje, kratkoću daha

e) bronhitis, astma

f) gingivitis

21. Koliko često imate simptome alergija:

a) više puta mjesečno

b) jednom u mjesec dana

c) jednom u 3 mjeseca

d) jednom u 6 mjeseci

e) jednom godišnje

f) rijetko

g) nikada

22. Ukoliko imate simptome alergija, kad ste zadnji put imali takve smetnje:

23. Je li se smetnje koje imate:

a) pojačaju tijekom radnog vremena

b) pojačaju tijekom neradnih dana (vikend, godišnji odmor..)

c) jednako

24. Ukoliko ste alergični da li znate na što:

a) kućna prašina

b) jaja

c) riba

d) ambrozija

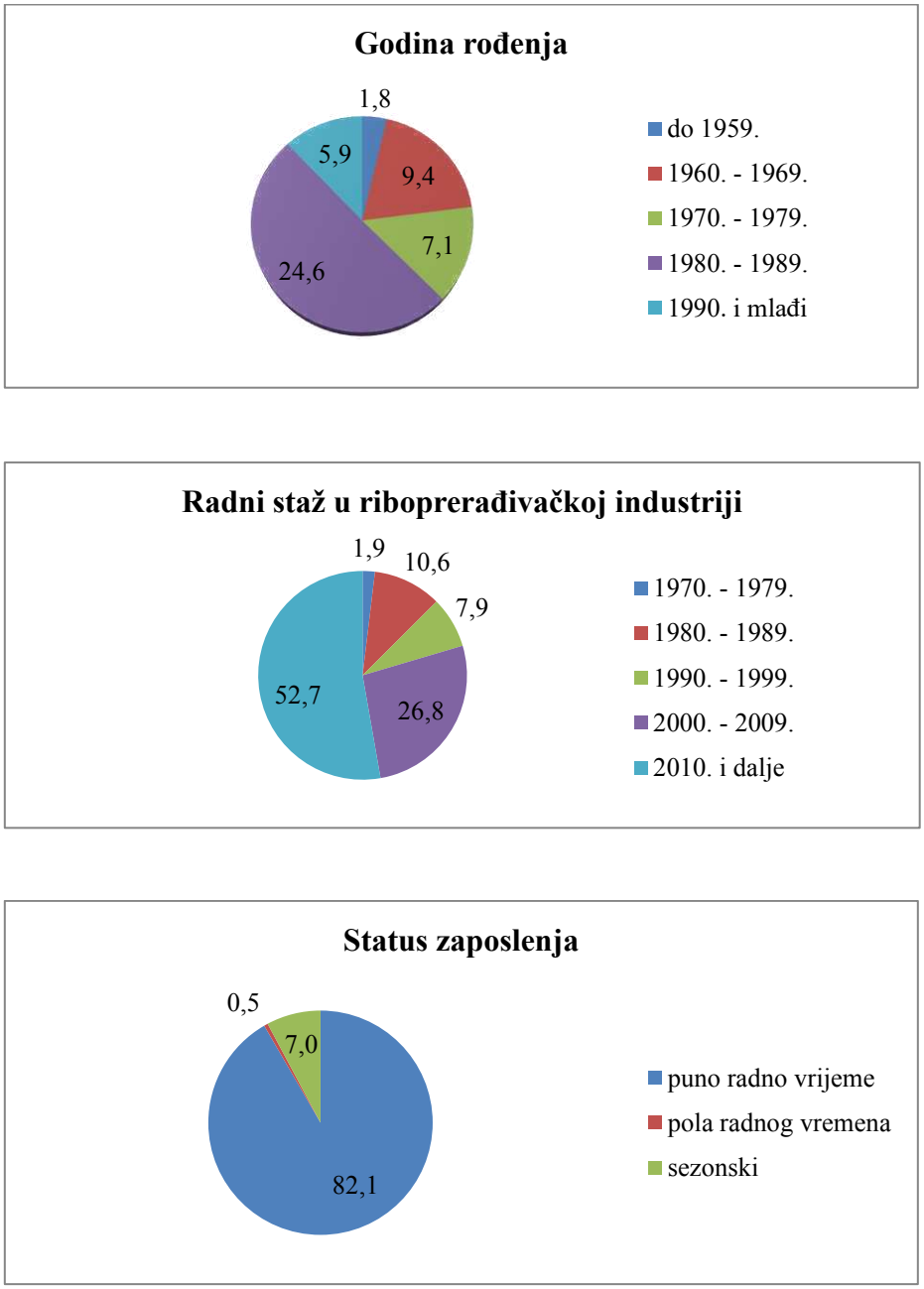
e) kikiriki, lješnjaci...

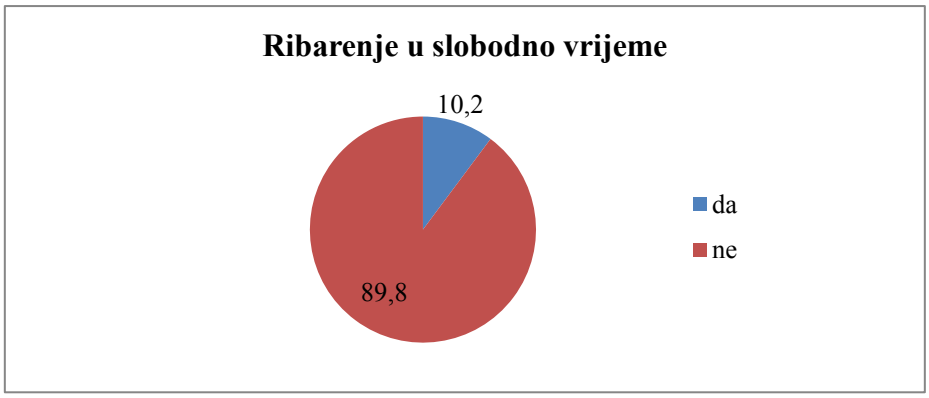
25. Je li je u obitelji netko imao/ ima alergijske smetnje:

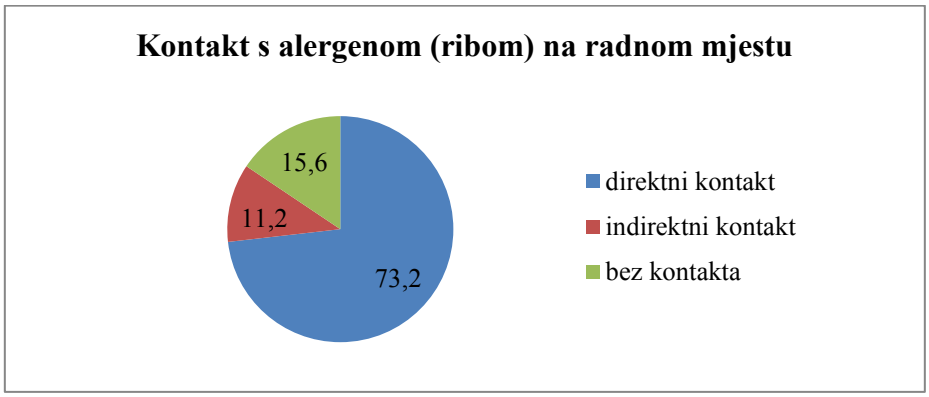
a) da

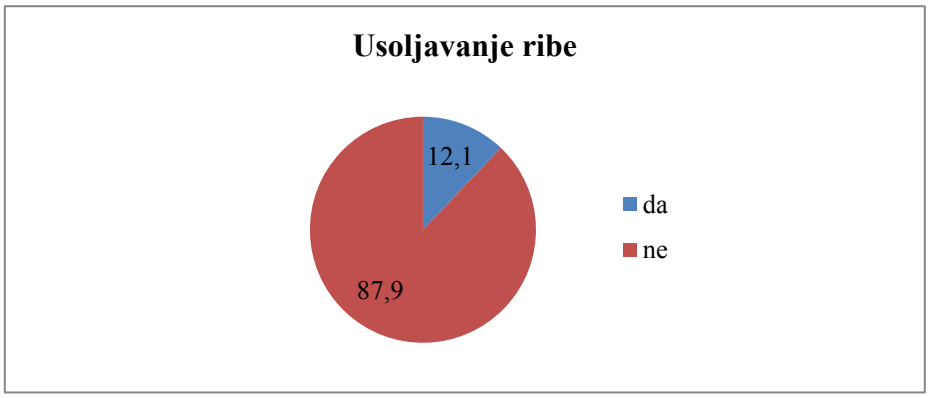
b) ne

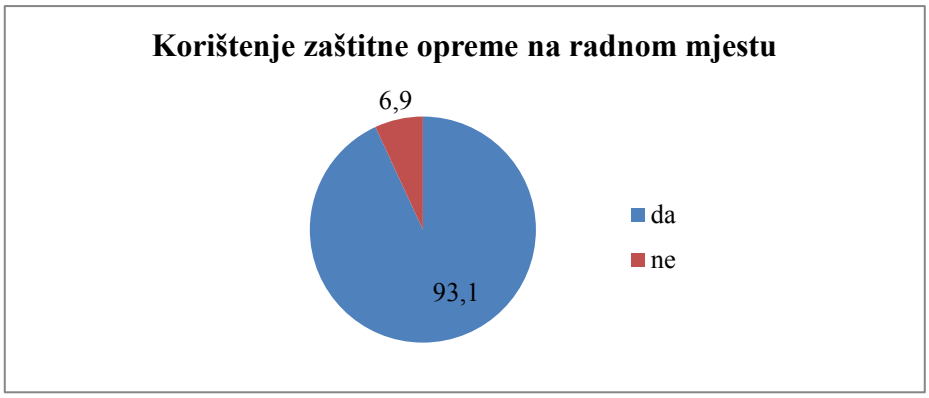
Slika 1. Grafički prikaz odgovora na pitanja iz upitnika

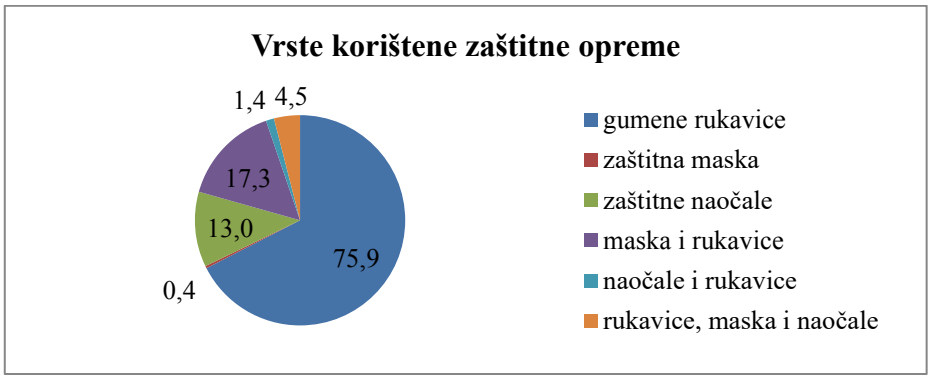


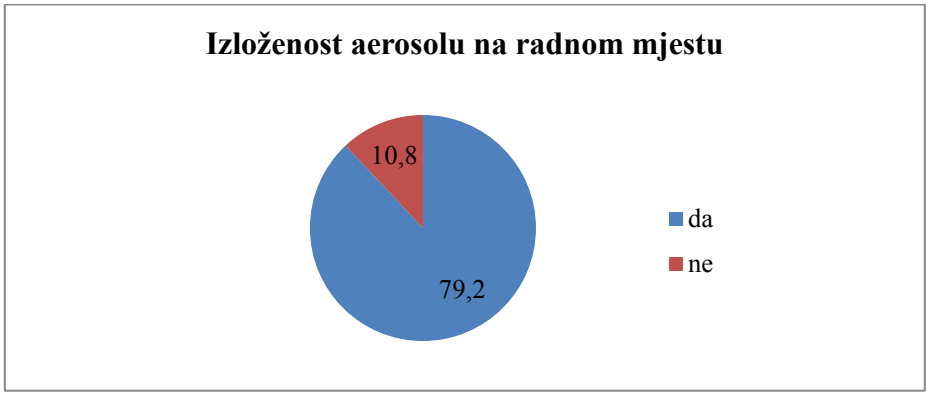

Ribarenje u slobodno vrijeme
10,2
89,8
da
ne

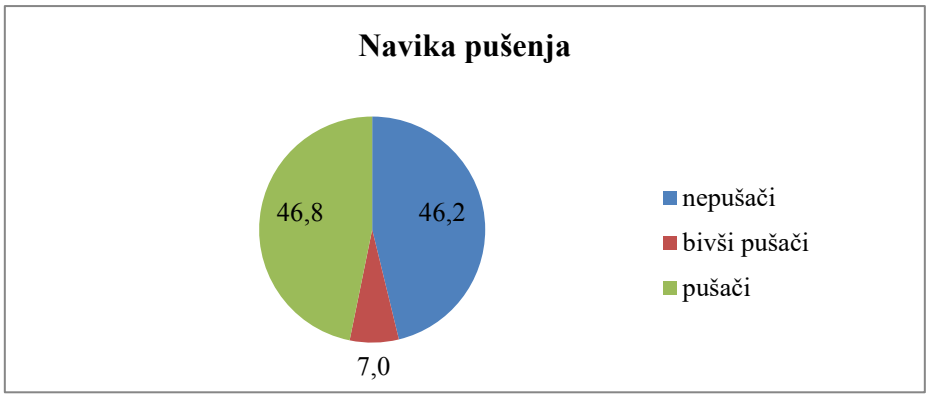

Kontakt s alergenom (ribom) na radnom mjestu
15,6
11,2
73,2
direktni kontakt
indirektni kontakt
bez kontakta

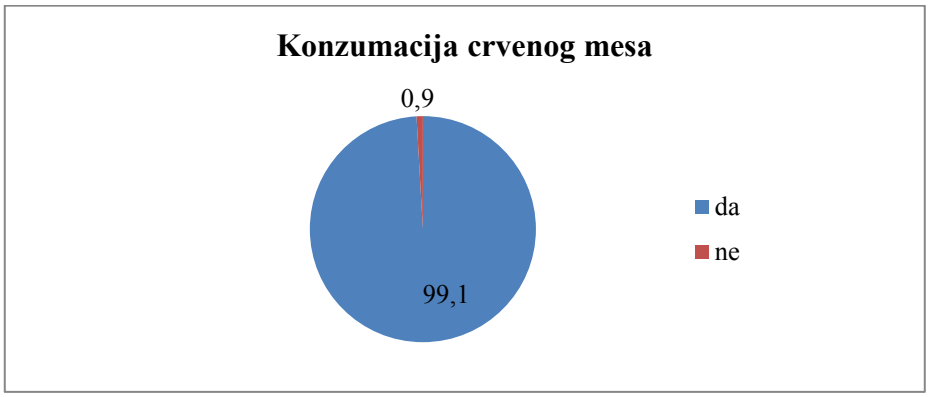

Usoljavanje ribe
12,1
87,9
da
ne

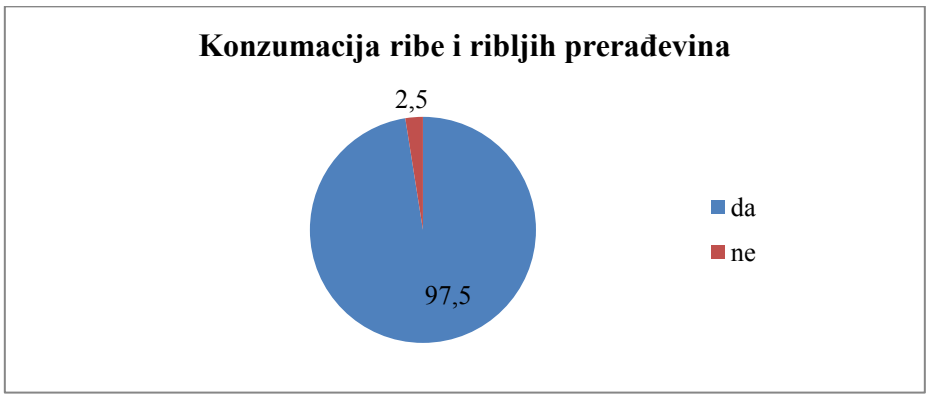

Korištenje zaštitne opreme na radnom mjestu
6,9
93,1
da
ne

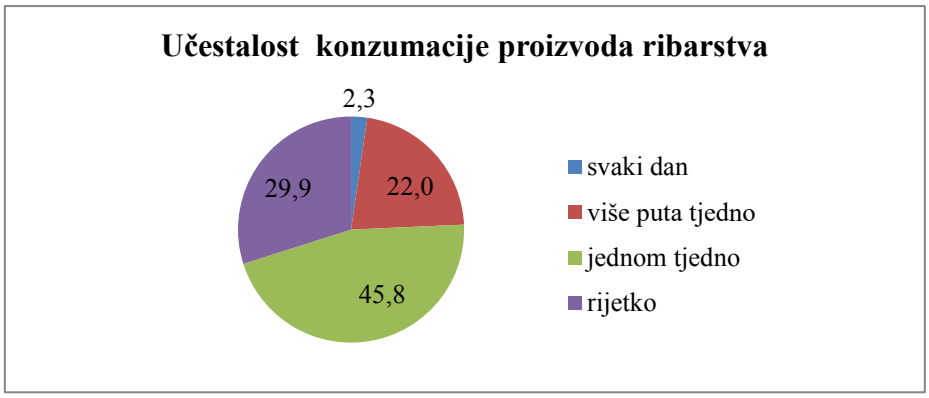

Vrste korištene zaštitne opreme
1,4
4,5
17,3
13,0
75,9
0,4
gumene rukavice
zaštitna maska
zaštitne naočale
maska i rukavice
naočale i rukavice
rukavice, maska i naočale

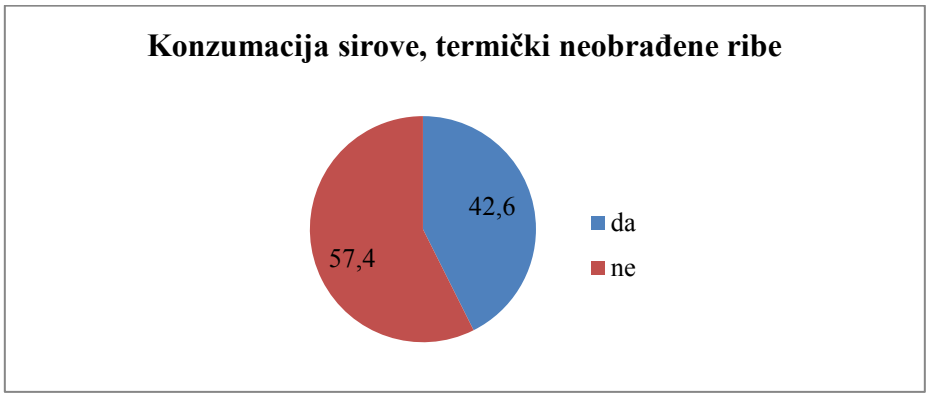

Izloženost aerosolu na radnom mjestu
10,8
79,2
da
ne

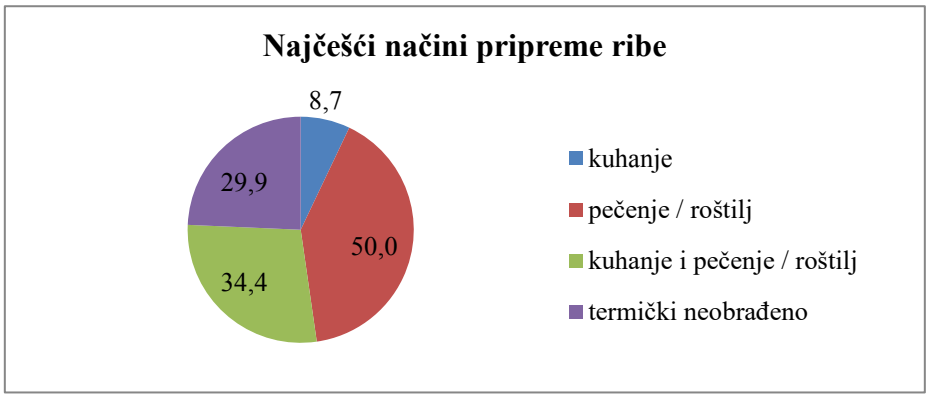

Navika pušenja
46,8
46,2
7,0
nepušači
bivši pušači
pušači

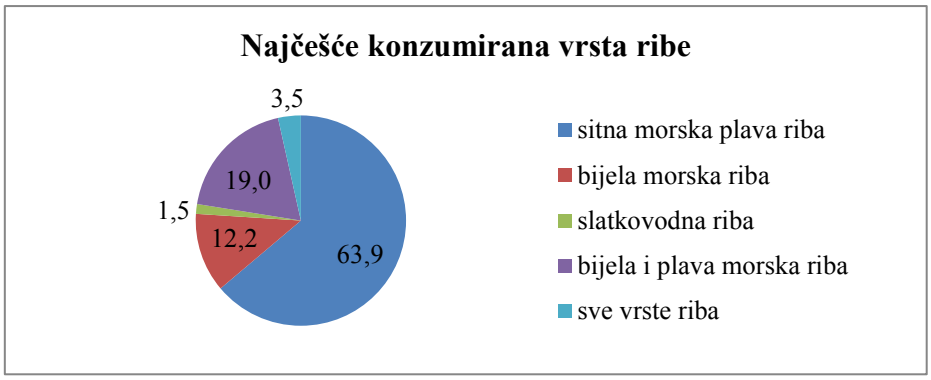

Konzumacija crvenog mesa
0,9
99,1
da
ne

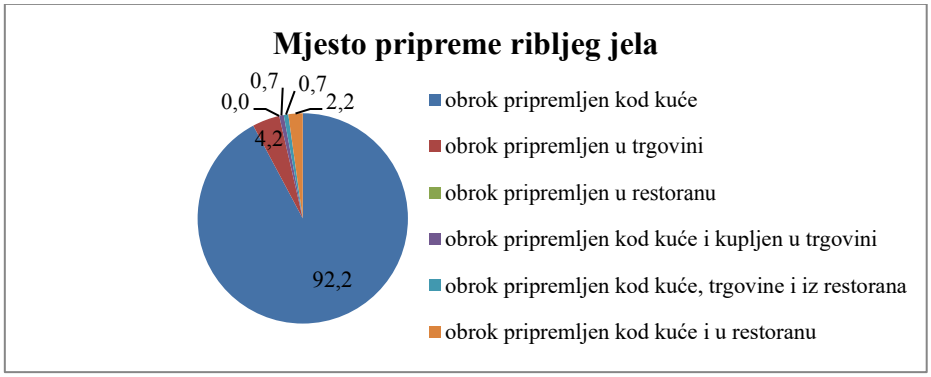

Konzumacija ribe i ribljih prerađevina
2,5
97,5
da
ne

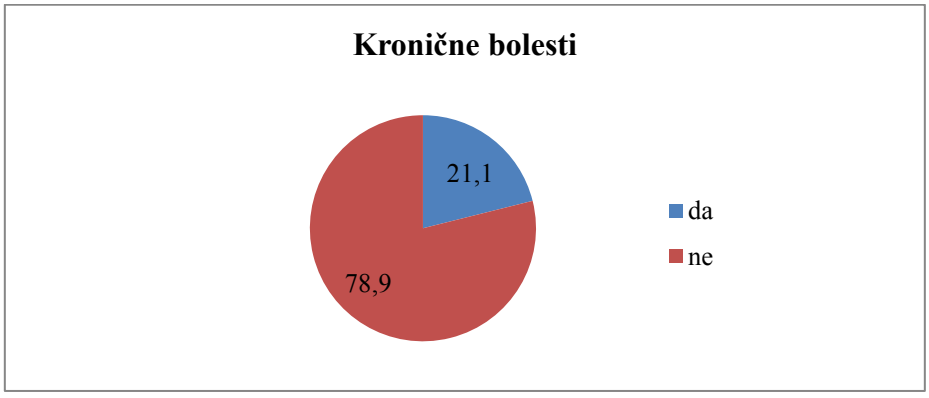

Učestalost konzumacije proizvoda ribarstva
2,3
22,0
45,8
29,9
svaki dan
više puta tjedno
jednom tjedno
rijetko

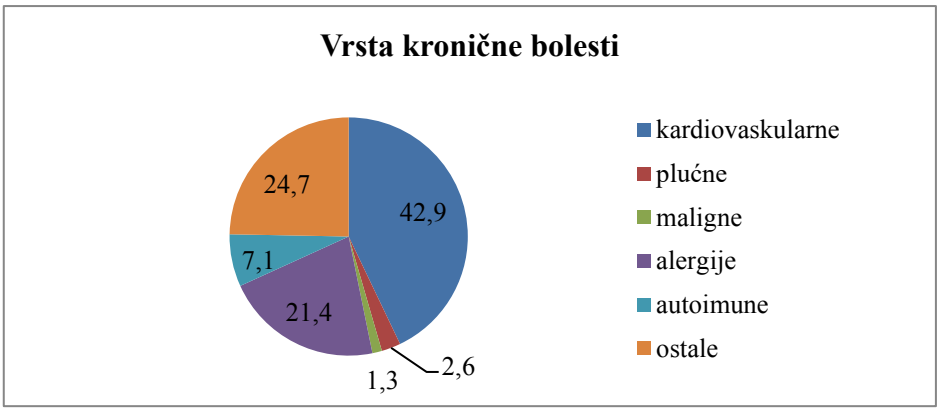

Konzumacija sirove, termički neobrađene ribe
42,6
57,4
da
ne

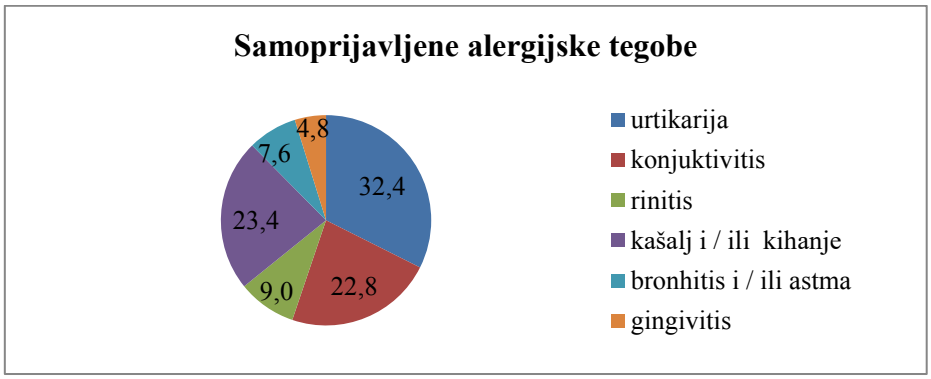

Najčešći načini pripreme ribe
8,7
50,0
34,4
29,9
kuhanje
pečenje / roštilj
kuhanje i pečenje / roštilj
termički neobrađeno

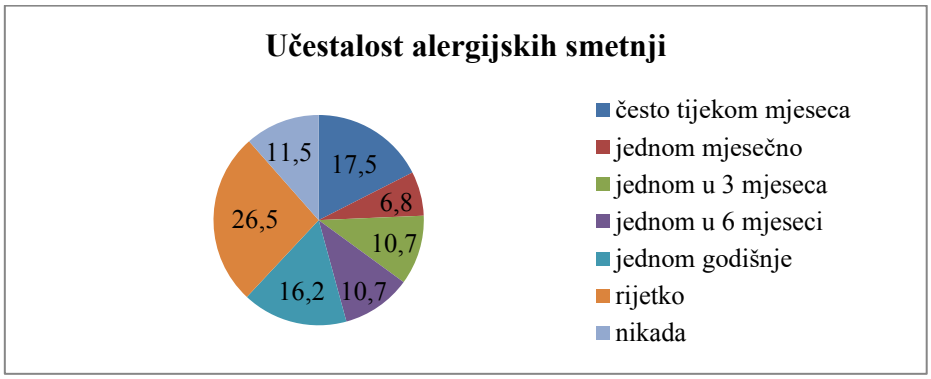

Najčešće konzumirana vrsta ribe
3,5
19,0
1,5
12,2
63,9
sitna morska plava riba
bijela morska riba
slatkovodna riba
bijela i plava morska riba
sve vrste riba


Mjesto pripreme ribljeg jela
0,7
0,7
0,0
2,2
4,2
92,2
obrok pripremljen kod kuće
obrok pripremljen u trgovini
obrok pripremljen u restoranu
obrok pripremljen kod kuće i kupljen u trgovini
obrok pripremljen kod kuće, trgovine i iz restorana
obrok pripremljen kod kuće i u restoranu


Kronične bolesti
21,1
78,9
da
ne


Vrsta kronične bolesti
42,9
2,6
1,3
21,4
7,1
24,7
kardiovaskularne
plućne
maligne
alergije
autoimune
ostale


Samoprijavljene alergijske tegobe
32,4
22,8
9,0
23,4
7,6
4,8
urtikarija
konjuktivitis
rinitis
kašalj i / ili kihanje
bronhitis i / ili astma
gingivitis


Učestalost alergijskih smetnji
17,5
6,8
10,7
10,7
16,2
26,5
11,5
često tijekom mjeseca
jednom mjesečno
jednom u 3 mjeseca
jednom u 6 mjeseci
jednom godišnje
rijetko
nikada

## 10. 2. Popis HLA alela i haplotipova identificiranih u istraživanju

Tablica 1. HLA aleli i haplotipovi, identificirani u studiji i povezani sa seropozitivnosti na *Anisakis* spp., koji su povezani s drugim bolestima

| HLA haplotip | aleli | rizik / bolest | referenca |
|---|---|---|---|
| DRB1, DQA1, DQB1 | 07:01 02:01<br>02:02 | visoki rizik za pojavu asparaginaza preosjetljivosti u akutnoj limfoblastičnoj leukemiji | (1) |
| | 07:01 02:01<br>02:03 | visoki rizik imune disregulacije u nefrotskom sindromu osjetljivom na steroide | (2) |
| | 11:04 05:05<br>03:01 | zaštitni čimbenik za tip 1 dijabetesa | (3) |
| DQB1 | 05:02 | čimbenik rizika za reaktivaciju latentne varicella-zoster virusne infekcije | (4) |
| | 05:02 | diseminirane netuberkuloznim mikobakterijama izazvane (dNTM) infekcije | (4) |
| | 05:02 | klozapinom inducirana agranulocitoza / granulocitopenija (CIAG) | (5) |
| DRB1 | 03:01 07:01 | niska serumska razina IgE antitijela u pacijenata s astmom | (6) |
| | 11:01 | visoka serumska razina IgE antitijela u pacijenata s astmom | (6) |
| | 13:02 | u pacijenata s aspirin induciranom urtikarijom | (7) |
| DQA1 | 02:01 | visoka serumska razina IgE antitijela u pacijenata s astmom | (6) |

1. Kutszegi N, Yang X, Gézsi A, Schermann G, Erdélyi DJ, Semsei AF, et al. HLA-DRB1*07:01–HLA-DQA1*02:01–HLA-DQB1*02:02 haplotype is associated with a high risk of asparaginase hypersensitivity in acute lymphoblastic leukemia. Haematologica 2017;102:1578–86.
2. Debiec H, Dossier C, Letouzé E, Gillies CE, Vivarelli M, Putler RK, et al. Transethnic, genome-wide analysis reveals immune-related risk alleles and phenotypic correlates in pediatric steroid-sensitive nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol. 2018;29:2000-13.
3. Guérin V, Léniaud L, Pédron B, Guilmin-Crépon S, Tubiana-Rufi N, Sterkers G. HLA-associated genetic resistance and susceptibility to type I diabetes in French North Africans and French natives. Tissue Antigens 2007;70:214-8.
4. Mladineo I, Poljak V, Martínez-Sernández V, Ubeira FM. Anti-IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2673.
5. Goldstein JI, Jarskog LF, Hilliard C, Alfirevic A, Duncan L, Fourches D, et al. Clozapine-induced agranulocytosis is associated with rare HLA-DQB1 and HLA-B alleles. Nat Comm. 2014;5:4757.
6. Movahedi M, Moin M, Gharagozlou M, Aghamohammadi A, Dianat S, Moradi B, et al. Association of HLA class II alleles with childhood asthma and total IgE levels. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2008;7:215-20.
7. Kim S-H, Choi J-H, Leew K-W, Kim S-H, Shinz E-S, Oh H-B, et al. The human leucocyte antigen-DRB1*1302-DQB1*0609-DPB1*0201 haplotype may be a strong genetic marker for aspirin-induced urticaria. Clin Exp Allergy. 2005;35:339–44.

## 11. KRATKI ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:
Ime: Diana
Prezime: Nonković rođ. Vrgoč
Datum rođenja: 20. studenoga 1966. godine
Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

OBRAZOVANJE I STRUČNO USAVRŠAVANJE:
Osnovnu i srednju školu završila sam u Splitu. Studij medicine završila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Studij u Splitu, 1994. godine, a 2006. godine nakon specijalističkog usavršavanja stekla sam naziv specijalistice epidemiologije. Završila sam znanstveni poslijediplomski magistarski studij Klinička medicina na Medicinskom fakultetu u Splitu 2005. godine, te 2011. godine stekla akademski naziv magistrice znanosti, s magistarskim radom "*Kliničko-epidemiološke značajke akutnog koronarnog sindroma u žena hospitaliziranih u KBC-u Split*".
2014. godine završila sam poslijediplomski doktorski studij: „Klinička medicina utemeljena na dokazima" na Medicinskom fakultetu u Splitu.
2020. godine stekla sam naziv primarijusa.
Aktivno sam sudjelovala na više znanstvenih projekata i to: Hrvatska zdravstvena anketa 2003.-2004., 10 001 Dalmatinac: projekt Biobanke, te dva projekta Hrvatske zaklade za znanost Hrvatske koja se bave istraživanjem *Anisakis* parazita.

POSAO:
Od 1994. pa do 2003. godine radila sam u Domu zdravlja Split na određeno vrijeme u više ordinacija primarne zdravstvene zaštite, kao i na HMP u Splitsko-dalmatinskoj županiji.
Neprekidno radim od 2003. godine u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, a od 2006. godine radim kao specijalistica epidemiologije. Imam ukupno 24 godine radnog staža.
Od 2011. godine voditeljica sam Odjela za nadzor nad prijavama zaraznih bolesti pri Službi za epidemiologiju zaraznih bolesti Nastavnog zavoda za javno zdravstvo.

Od 2018. godine i nadalje, voditeljica sam Službe za epidemiologiju zaraznih bolesti Nastavnog zavoda Splitsko-dalmatinske županije.
Tijekom 2021. godine izabrana sam za pomoćnicu ravnatelja za kvalitetu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije.

AKTIVNOSTI:
Od 2015. godine članica sam Etičkog povjerenstva, a od listopada 2019. godine sam predsjednica Etičkog povjerenstva Nastavnog zavoda za javno zdravstvo. Članica sam Stručnog vijeća Nastavnog zavoda (od 2011. godine).
U studenom 2019. godine izabrana sam za članicu Upravnog odbora Hrvatskog epidemiološkog društva (HED).
Sudjelovala sam aktivno u organizaciji više stručnih i znanstvenih skupova, kao i u organizaciji kongresa Hrvatskog epidemiološkog društva.
Vanjska sam suradnica u izvođenju nastave na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu te na Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu. Mentorica sam specijalizantima epidemiologije.
Od početka rada u Službi za epidemiologiju zaraznih bolesti aktivno sudjelujem na brojnim stručnim i znanstvenim skupovima u zemlji i inozemstvu iz domene javnog zdravstva i epidemiologije. Kontinuirano sudjelujem u edukaciji zdravstvenih djelatnika kako u ustanovi u kojoj sam zaposlena, tako i izvan nje. Do sada sam imala veći broj kongresnih priopćenja, objavljenih radova u indeksiranim i drugim časopisima, zbornicima, kao i poglavlja u više priručnika.