

## ТРИХИНЕЛЛЕЗ

### (ЗАРАЖЕНИЕ *TRICHINELLA SPP.*)

---

#### РЕЗЮМЕ

У человека трихинеллез возникает вследствие употребления в пищу сырого или недостаточно приготовленного зараженного трихинеллой мяса домашних животных или дичи. Животные заражаются при скармливании зараженной трихинеллой мышечной ткани. Попавшие в организм личинки созревают, и взрослые особи спариваются в тонком кишечнике хозяйских видов, к которым относятся люди, свиньи, крысы, медведи, моржи, многие другие плотоядные млекопитающие и иногда лошади, а также птицы и рептилии. Взрослые трихинеллы живут менее 1-го месяца. Полученные личинки мигрируют и персистируют в мышцах своих хозяев, выступая в качестве источника заражения для новых восприимчивых хозяев.

**Обнаружение возбудителя:** Диагностические тесты для обнаружения видов *Trichinella* делятся на две категории: 1) прямое обнаружение личинок первой стадии, инкапсулированных или свободно паразитирующих в ткани поперечнополосатых мышц, и 2) не прямое обнаружение инфекции с использованием тестов для выявления специфических антител.

Для прямого обнаружения личинок трихинеллы в тканях используются методы компрессии или переваривания мышечной ткани. Личинки трихинеллы обычно локализируются в предпочитаемых ими областях мышц, и эти области могут отличаться у разных видов хозяев. В целях максимального увеличения чувствительности тестов важно отбирать пробы предпочитаемых областей мышц. Например, у свиней предпочитаемыми местами являются диафрагма (ножка), и мышцы языка, в то время как большая часть червей у лошадей находится в языке и жевательной мышце, далее в мышцах диафрагмы и шеи.

Методы искусственного переваривания включают ферментное переваривание отдельных или объединенных в пулы образцов мышечной ткани, подвергаемых механической гомогенизации или измельчению, перемешиванию и инкубации. Вслед за этим следуют процедуры фильтрации и седиментации, призванные выявить и сконцентрировать всех личинок, высвободившихся из тканей во время переваривания. Образцы, переработанные этими методами, изучают с помощью стереомикроскопа на наличие личинок. Методы переваривания позволяют выявлять < 1 личинки на 1 грамм (лг) ткани, но при низком уровне заражения ограничивающими факторами являются количество переваренной мышечной ткани и неравномерное распределение личинок в тканях (также сниженная перевариваемость некоторых тканей, также заморозка или иной вариант повреждения при обработке образцов от диких животных).

Это компенсируется посредством исследования большего объема образца с туши, например, минимум 3-5 г от свиней и 5-10 г от лошадей, дичи и индикаторных диких видов, например, лис. Методы переваривания рекомендованы для инспектирования отдельных туш продуктивных животных, таких как свиньи, лошади и дичь.

Метод компрессии (трихиноскопия) менее чувствителен, чем искусственное переваривание, и не рекомендуется в качестве надежного теста для инспектирования туш, как в целях проверки пищевой безопасности, так и в целях надзора за болезнью.

**Серологические тесты:** Серологические тесты используют наиболее часто для непрямого выявления. Чувствительность и специфичность серологических методов в основном зависят от типа и качества используемого антигена. Большая часть рабочих характеристик серологических тестов (данные валидации) получены при исследовании свиней. Ложноотрицательные результаты серологических тестов могут появиться через 1 неделю или чуть позже: после того, как личинки в мышечной фазе становятся заразными у свиней со слабой или умеренной инфекцией. Ложноположительные результаты также регистрируются при серологических тестах.

Серологические методы приемлемы для надзора или подтверждения свободы стада или регионов от *Trichinella*. В целях инспектирования отдельных туш рекомендуются только прямые методы. Посредством твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) выявляются свиньи с таким низким содержанием личинок, как 1 личинка/ 100 г ткани.

Секреторные антигены, собранные после кратковременного поддержания мышечных личинок *T. spiralis in vitro* (18-20 часов), обеспечивают наиболее специфичный источник. Важно использовать соответствующие положительные и отрицательные контрольные сыворотки с тем, чтобы гарантировать, что разные виды ИФА применяются с минимально допустимым уровнем чувствительности и специфичности. Переваривание 100 или более граммов ткани рекомендовано в качестве подтверждающего теста в отношении серологически положительных животных.

**Требования к вакцинам:** Отсутствуют подходящие вакцины против трихинеллезной инфекции продуктивных животных.

## А. ВВЕДЕНИЕ

Клинические признаки трихинеллеза обычно не распознаются у животных, а он, являясь зоонозом, представляет особую важность. Трихинеллез у людей возникает в результате употребления в пищу сырого или недостаточно приготовленного мяса от зараженных *Trichinella* продуктивных животных или дичи (Gajadhar *et al.*, 2006). Живущие недолго взрослые черви населяют тонкий кишечник хозяев, включая людей, свиней, крыс, медведей, моржей, лошадей и многих поедающих мясо млекопитающих, а также некоторых птиц и рептилий. Паразит имеет прямой жизненный цикл. В течение нескольких часов после потребления инфицированной мышечной ткани подходящим хозяином личинки первой мышечной фазы (L1) высвобождаются в результате переваривания и зарываются в ворсинки тонкого кишечника. Они быстро развиваются во взрослые особи (самцы до 1,8 мм длиной, самки до 3,7 мм) и живут менее 1 месяца. В течение этого времени происходит совокупление и яйцеживородящие самки откладывают новорожденных личинок (NBL), которые через венулы и лимфоциты попадают в общий кровоток. NBL распространяются по всему организму, где они инвазируют поперечнополосатые мышцы, предпочитая особые группы мышц. Например, у свиней в ножке диафрагмы и языке обычно содержатся наивысшие концентрации личинок, затем следует жевательная мышца; а у лошадей за языком следует жевательная мышца, диафрагма и мышцы шеи. Области предпочтения варьируются в зависимости от разных видов хозяев, но, в общем и целом, язык, жевательная мышца и диафрагма являются оптимальными областями для отбора проб. Общеизвестны данные о предпочитаемых областях для нескольких видов животных хозяев (Nockler *et al.*, 2000). В случаях сильной инфекции большая часть произвольных мышц содержит высокие уровни личинок. Личинки большинства видов *Trichinella* инкапсулируются в коллагене в мускулатуре хозяина и остаются инфективными в течение многих лет.

В роду *Trichinella* выявлено двенадцать таксонов, девять из которых имеют признанный статус вида (Korhonen et al., 2016; Pozio & Zarlenga, 2013). Таксоны этого рода делятся на две группы (клада); для одного характерна инкапсуляция личинок только в мышечной ткани млекопитающих, для другого характерно отсутствие инкапсуляции личинок в мышечной ткани и их способность заражать как млекопитающих и птиц, так и млекопитающих и рептилий. Инкапсулирующие таксоны включают: *Trichinella spiralis* (Т-1), происхождением из восточной Азии, который в настоящее время распространён по всему миру в регионах с умеренными климатическими условиями благодаря способности к пассивному заносу; обычно ассоциируется с домашними свиньями. Он обладает высоким уровнем инвазивности для домашних и лесных свиней, мышей и крыс, но также его можно выявить у других млекопитающих хищников и лошадей.

*Trichinella nativa* (Т-2) обнаруживают у млекопитающих хищников в арктических и субарктических регионах Северной Америки, Европы и Азии. Он высоко устойчив к заморозке, не был выявлен у свиней или лошадей и в ходе экспериментов показал низкую инфекционность для данных видов хозяев, хотя иногда его обнаруживали у диких кабанов из субарктических областей. *Trichinella britovi* (Т-3) обнаруживают, главным образом, у диких животных и свиней, иногда он встречается у лошадей. Он распространён в регионах Европы и Западной Азии с умеренными климатическими условиями, а также в Северной и Западной Африке. *Trichinella murrelli* (Т-5) выявляют у млекопитающих хищников в Северной Америке. Он обладает низкой инфекционностью по отношению к домашним свиньям, но был выявлен и лошадей. *Trichinella* Т-6 адаптирован к холодным климатическим условиям и, вероятно, близко родственен *T. nativa* на севере Северной Америки и высоко устойчив к заморозке (Pozio & Zarlenga, 2013). *Trichinella nelsoni* (Т-7) выделяют от млекопитающих хищников и от случая к случаю от диких свиней в Восточной и Южной Африке. *Trichinella* Т-8 выявляли у млекопитающих хищников в Намибии и Южной Африке, а *Trichinella* Т-9 у млекопитающих хищников в Японии ((Pozio & Zarlenga, 2013). Т-8 и Т-9 обладают некоторыми промежуточными характеристиками с *T. britovi* и *T. murrelli*, соответственно. *Trichinella patagoniensis* (Т-12) был выделен у горных львов в Аргентине, и в ходе экспериментов показал пониженную инфекционность для свиней и грызунов (Krivokapich et al., 2012). Неинкапсулированные таксоны включают: *Trichinella pseudospiralis* (Т-4), который является космополитом по распространению и был выделен у хищных птиц, диких хищников и всеядных, включая домашних и диких свиней, крыс и сумчатых в Азии, Северной Америке, Европе и Австралии (Pozio, 2016a); *Trichinella papuae* (Т-10) регистрировали у диких и домашних свиней, разводимых на фермах крокодилов и у людей в Папуа Новой Гвинее, Таиланде и Австралии. *Trichinella zimbabwensis* (Т-11) регистрировалась у разводимых на фермах и диких крокодилов в Зимбабве, Южной Африке, Эфиопии и Мозамбике, а также у варанов в Зимбабве и у диких млекопитающих в Южной Африке.

В экспериментальных условиях данный паразит проявляет высокую инфицирующую способность для широкого спектра хозяев-млекопитающих, включая свиней и крыс (Pozio & Zarlenga, 2013). Все виды и генотипы *Trichinella* вызывают болезнь у людей. Общепризнанным является тот факт, что все таксоны *Trichinella* обладают высокой инфицирующей способностью для людей, представляя значительный риск для здравоохранения. Риск установления инфекции *Trichinella* в стадах свиней представляет в основном *T. spiralis*, в меньшей степени *T. britovi*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis* и *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, при этом, отсутствуют доказательства того, что другие виды и генотипы могут играть такую роль.

Трихинеллёз человека может быть изнурительной болезнью, которая может привести к смерти. Короткоживущие взрослые черви в кишечнике могут вызывать транзиторный гастроэнтерит, но тяжёлые признаки и симптомы могут стать результатом миграции

личинки и их присутствия в произвольно сокращающихся мышцах. Болезнь передаётся, прежде всего, в результате употребления в пищу инфицированного мяса, в основном, свинины или мяса дичи, которое было недостаточно проварено или прожарено (или обеззаражено каким-либо другим способом). Несмотря на то, что превалентность *Trichinella* у лошадей низка, употребление в пищу сырой либо недостаточно приготовленной конины является хорошо описанным источником трихинеллеза человека (Boireau *et al.*, 2000). Заражение людей можно предупредить, если инспектировать мясо, перерабатывать его (варкой или жаркой, замораживанием или консервированием) и предохранять продуктивных животных от воздействия инфицированного мяса, включенного в состав недостаточно приготовленных пищевых отходов, от грызунов и других диких животных (Gajadhar *et al.*, 2006; Gamble, 1997; Gamble *et al.*, 2000). Мясо дичи всегда следует считать потенциальным источником инфекции и, поэтому, это мясо необходимо тестировать или тщательно готовить. Трихинеллы, обнаруживаемые в мясе дичи (главным образом, *T. native*, Т-6 и в меньшей степени *T. britovi*), могут быть резистентными к замораживанию и, следовательно, замороженное мясо может представлять опасность для здоровья людей (Pozio, 2016a).

*Trichinella* циркулирует в основном среди диких животных и домашних животных, обычно она поражает свиней, содержащихся на свободном выгуле и на личных подворьях (Pozio, 2014), реже лошадей. Конина, зараженная *Trichinella*, и мясо дичи оказались причастными ко вспышкам болезни, затронувшим международную торговлю (Pozio, 2015). Причиной многих вспышек трихинеллеза был нелегальный провоз свинины и мяса диких кабанов в личном багаже (Pozio, 2015).

Методы тестирования с целью обнаружения *Trichinella* инвазии у свиней и других видов: (а) прямая демонстрация паразитов в тканевых образцах; или (б) опосредованная демонстрация паразитов путём обнаружения специфических антител к *Trichinella* spp. в жидких образцах крови, сыворотки или ткани (Gajadhar *et al.*, 2009).

Лабораторные манипуляции следует проводить с соблюдением надлежащих требований к биобезопасности и процедур биологического сдерживания, определённых в результате анализа биорисков (см. Глава 1.1.4. Биобезопасность и биозащита: Стандарты управления биологическими рисками в ветеринарных лабораториях и вивариях). Риск заражения во время анализа в лаборатории невелик при соблюдении надлежащих лабораторных практик.

Инфекция приобретается при приеме внутрь тканей с мышечными личинками или при их высвобождении при искусственном переваривании. Незащищенная оболочкой личинка быстро погибает при контакте с окружающей средой или широко используемыми дезинфицирующими средствами. Контаминированную лабораторную посуду и другие поверхности следует промыть водой температурой  $\geq 85^{\circ}\text{C}$  с тем, чтобы убить и удалить всех личинок. Лабораторные отходы, включая остатки личинок, следует обрабатывать посредством кипячения, автоклавирования, инсинерации или других подходящих процессов умерщвления личинок и предотвращения повторного заноса в окружающую среду. Это критически важно при исследовании квалификационных образцов, содержащих живых личинок, в эндемических регионах.

## В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

**Таблица 1.** Методы тестирования для выявления *Trichinella* у свиней и цели данных тестов

Метод	Цель
-------	------

	Свобода популяции от заражения	Свобода отдельных особей от заражения перед передвижением	Вклад в стратегию полного искоренения	Подтверждение положительных случаев	Превалентность инфекции-надзор	Иммунный статус отдельных особей или популяции после вакцинации
<b>Идентификация возбудителя<sup>1</sup></b>						
Выделение паразита	n\а	n\а	n\а	+++	+++	n\а
Выявление антигена	n\а	n\а	n\а	n\а	n\а	n\а
Мультиплексная ПЦР	n\а	n\а	n\а	+++	+	n\а
<b>Выявление иммунного ответа</b>						
ИФА	+++	+	+	n\а	+	n\а
Вестерн-блоттинг	++	+	+	n\а	+	n\а

Пояснения: +++ - рекомендованный метод, валидированный для указанной цели; ++ = подходящий метод, который может потребовать дополнительную валидацию, + = можно использовать в некоторых ситуациях, но стоимость, надежность и иные факторы значительно ограничивают сферу применения;  
 - = не подходит для указанной цели; n\а – цель не применима  
 ПЦР - полимеразная цепная реакция; ИФА (ELISA) –иммуоферментный анализ.

## **1. Идентификация возбудителя (тест, предписанный для международной торговли)**

Единственными рекомендованными процедурами для выявления личинок *Trichinella* в мясе являются ферментные анализы переваров. Несколько анализов переваров официально признаны в ряде стран для использования в коммерческих целях. Международная комиссия по трихинеллезу (ICT) (<http://www.trichinellosis.org/>) рекомендует несколько таких анализов, которые являются документально оформленными стандартами в Европейском Союзе (ЕС), Канаде и других странах (Канадское агентство по инспектированию пищевых продуктов, 2010; Европейская Комиссия, 2015). Другие официальные методы не рекомендуются вследствие их недостаточной эффективности или ненадежности. Современные диагностические анализы должны отвечать международно-признанным стандартам обеспечения качества, который включает научно обоснованные данные валидации и схему, позволяющую проводить стандартный мониторинг и документально оформлять критические контрольные точки. Недавно был опубликован стандарт ИСО 18743:2015 о выявлении личинок *Trichinella* у животных. Анализ переваров, рекомендуемый здесь, основан на значительных инновациях, взятых из некоторых анализов переваров, принятых в целях международной торговли.

### **1.1. Рекомендуемая прямая процедура для анализа мышечной ткани**

#### **1.1.1. Чувствительность:**

Чувствительность прямых методов тестирования зависит от количества исследуемой ткани и участка отбора пробы. Прямые методы выявляют инфицированных свиней, лошадей или других животных, инфицированных *T. spiralis* уже через 17 дней после контакта, одновременно с моментом, когда

<sup>1</sup> Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителя, применяемых для одного клинического образца.

личинка в мышце становится инфективной для нового хозяина. Прямые методы наиболее чувствительны при использовании на свежих образцах. Количество личинок, которые можно выделить из образцов, непредсказуемо снижается после длительного хранения, гниения и замораживания. Образцы, исследуемые в целях пищевой безопасности, следует хранить при температуре 4°C, и их необходимо тестировать незамедлительно; в любом случае до возникновения гниения. Что касается диких животных, необходимо исследовать более объемные образцы ( $\geq 10$  г) с тем, чтобы компенсировать возможное снижение чувствительности вследствие неизвестного разнообразия областей предпочтения у этих видов хозяев, и различных условий хранения. Используемые в настоящее время методы тестирования посредством искусственного переваривания образца весом 1 г имеют чувствительность около трех личинок/ г ткани, а исследование образца 5 г повышает чувствительность до 1 личинки/ г ткани (Gamble *et al.*, 2000; Nockler *et al.*, 2000). Если для переваривания имеется большое количество ткани (до 100 г), чувствительность этого теста повышается еще больше.

### **1.1.2. Отбор образцов**

Тесты обычно проводят на образцах, отобранных от туш после убоя. Образцы мышц отбираются от областей предпочтения, обычно от ножек диафрагмы или языка свиней, или от языка или жевательных мышц лошадей. Что касается диких животных, в тех случаях, когда области предпочтения неизвестны, следует отбирать пробы языка (предпочтительно), диафрагмы или жевательных мышц. Областью предпочтения у лис является передняя большеберцовая мышца.

Размеры образцов для инспекционного тестирования туш рассчитываются на основе уверенного выявления животных, содержащих  $\geq 1$  л/г в тканях, но в целях надзора необходима более высокая чувствительность для обеспечения лучших данных по превалентности болезни и во избежание ограничений отбора проб, наблюдаемых в случае с дикими животными. Образцы для проведения надзора должны составлять  $\geq 10$  г, и их следует отбирать в областях предпочтения (если известны). Образцы массой 100 г позволяют выявить 0,01 л/г в исходной ткани, а если образец взят из области предпочтения, то низкий или отрицательный результат будет указывать на низкое содержание личинок в остальной туше, свидетельствуя, таким образом, о низком риске передачи. Для исследований в целях пищевой безопасности или при инспекции туш используют образцы мышечной ткани массой до 100 г.

Отдельные образцы массой 100г могут отбирать от одного животного, или многочисленные образцы меньшего объема можно отбирать от нескольких животных для получения пула весом 100 г. Размер образцов, составляющих пул, будет определять чувствительность метода на пробу. Международная комиссия по трихинеллезу рекомендует отбор образца 5 г от каждой свиньи для проведения тестирования в эндемических зонах (Gamble *et al.*, 2000). Для тестирования мяса лошадей требуется минимальный образец 5 г с туши (Gamble *et al.*, 2000). Для лошадей, происходящих из эндемических зон, рекомендуемый вес образца составляет 10 г (Gamble *et al.*, 2000). Тестирование таких объемов мышечной ткани позволяет предотвратить распространение трихинеллеза среди людей, но не сможет предотвратить бессимптомное заражение в результате потребления зараженного мяса с небольшим количеством личинок.

### **1.1.3. Подтверждающее тестирование для пулов образцов, прошедших процедуру переваривания, и в отношении серологически положительных животных**

Если пул из образцов от разных животных подвергают перевариванию, по итогам которого получают положительные результаты, то необходимо использовать дополнительные тесты переваривания для повторного тестирования проб уже от меньшего количества животных и, вероятно, от отдельных животных, чтобы выявить конкретное зараженное животное (животных). Животных, которые оказались положительными по итогам серологических тестов, необходимо протестировать методами переваривания для подтверждения заражения, упрощения процесса выделения личинок и идентификации видов этих личинок.

#### 1.1.4. Переваривание и выявление

- i) Определить объем раствора искусственного желудочного сока, необходимый для переваривания (2000 мл раствора на 100 г мяса и 1000 мл на 50 г или меньше).
- ii) Раствор искусственного желудочного сока: Приготовить соответствующий объем раствора HCl/вода, добавив HCl к водопроводной воде (например, на 2,0 литра использовать 11 мл 37% HCl или 16 мл 25% HCl), но не наоборот. На этом этапе пепсин в раствор не добавлять. Перед использованием данный раствор следует предварительно нагреть до температуры 45°C. (Набор для переваривания Trichinella на основе серин-протеазы, в котором не используют опасные реагенты, в настоящее время имеется в продаже в качестве альтернативы для анализа на основе пепсин/HCl. Данный набор был утвержден в ЕС только для тестирования свиней [дополнительные рекомендации можно получить в референтной лаборатории МЭБ в Риме, Италия]).
- iii) Из каждого образца мяса удалить максимально возможное количество жира и оболочек.
- iv) Взвесить соответствующее количество жилованного мяса от каждого образца. Каждый образец нарезать на куски весом 1-2 г и объединить с другими образцами в пул весом 100 г.
- v) Поместить объединенный образец в блендер. Добавить 50-100 мл раствора вода/HCl в каждый объединенный образец 100 г.
- vi) Измельчить мясо в блендере до однородной консистенции (не должно быть кусков мяса; образец должен иметь консистенцию пюреобразного детского питания). Обычно это достигается после нескольких циклов по 1-3 секунды. Добавить около 100 мл подготовленного раствора вода/HCl и перемешивать в блендере пока смесь не станет однородно жидкой. Для этого может потребоваться 5-10 секунд (может потребоваться дополнительный раствор).
- vii) Облить гомогенат 10 г пепсина (1:10 000 NF/1:12500 BP/2000 FIP; гранулированный или эквивалентным объемом жидкого пепсина), добавить около 200 мл раствора вода/HCl и перемешивать в блендере около 5 секунд.
- viii) Перенести гомогенизированный образец в 3 л лабораторный стакан с магнитной мешалкой. Добавить оставшиеся 2 л раствора вода/HCl, наливая раствор вода/HCl в блендер и вымывая оставшийся гомогенат в 3 л лабораторный стакан. Вымыть из крышки блендера весь прилипший

материал и поместить в лабораторный стакан, используя 10-20 мл раствора искусственного желудочного сока из опрыскивателя.

- ix) Поместить лабораторный стакан на предварительно нагретую плитку магнитной мешалки или в инкубационную камеру, установленную на  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Накрыть лабораторный стакан алюминиевой фольгой. Активировать мешалку на достаточно высокой скорости, чтобы получить глубокую воронку без разбрызгивания. Примечание: Если температура переваривания в начале переваривания не ниже  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ , перед началом отсчета времени переваривания следует дождаться, пока образец нагреется.
- x) Позволить перевариванию длиться в течение 30 минут. Если температура переваривания опустилась ниже  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ , может потребоваться дополнительное время для завершения переваривания. Это можно определить, наблюдая за смесью перевара. Если присутствуют кусочки не переварившейся мышечной ткани, следует продолжать переваривание в течение дополнительных 30 минут или до переваривания кусочков. Следует убедиться, что диапазон температур переваривания не превышен. В качестве альтернативы, переваривание можно проводить при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение более длительного периода времени.
- xi) В течение 5 минут после удаления с плитки магнитной мешалки, перелить жидкость перевара через сито с диаметром ячейки 177-180 мкм в 2 л разделительную воронку с соотношением высоты к ширине 2:1. Промыть лабораторный стакан водопроводной водой комнатной температуры из опрыскивателя и вылить через сито в 2 л разделительную воронку.
- xii) Промыть сито в 2 л разделительную воронку, распылив небольшое количество водопроводной воды комнатной температуры через верхнюю часть сита. На сите не должно оставаться непереваренных кусочков мышц, хотя могут присутствовать остатки жира, оболочек и других тканей; смыть все приставшие личинки в воронку. Оставить жидкость в разделительной воронке в состоянии покоя на 30 минут.
- xiii) Слить 40 мл жидкости перевара из разделительной воронки в 50 мл коническую колбу или мерный цилиндр (колба Пилснера) и оставить на 10 минут.
- xiv) По истечении 10 минут пипеткой удалить 30 мл верхнего слоя жидкости (супернатант), оставив в пробирке нижний слой 10 мл (не отливать верхний слой 30 мл, т.к. это нарушит осадок).
- xv) Слегка взболтать оставшиеся 10 мл жидкости и быстро перенести в мерную чашку Петри или в чашку для подсчета личинок. Вымыть пробирку или цилиндр в чашку Петри дважды, каждый раз используя каждый раз по 5 мл водопроводной воды. Слой жидкости в чашке Петри не может быть больше нескольких миллиметров глубиной.
- xvi) Подождать минимум 1 минуту, чтобы позволить личинкам осесть на дно, затем, используя стереомикроскоп с 10-16-кратным увеличением, систематично исследовать каждую сеточку в чашке Петри на наличие личинок *Trichinella*. Выявление любой подозрительной личинки в ходе систематического исследования должно подтверждаться посредством идентификации морфологических деталей при более сильном увеличении,

например при 40-кратном увеличении. Если осадок мутный или по другой причине его трудно исследовать, потребуется выполнить процедуру дополнительной очистки, описанную ниже (этап хіх).

- xvii) Перевары следует исследовать вскоре после приготовления. Ни при каких условиях не следует откладывать до следующего дня.
- xviii) Если перевары не исследованы в течение 30 минут после приготовления или они слишком замутнены, может потребоваться процедура очистки, описанная ниже.
- xix) Очистка образца: пипеткой переместить содержимое чашки Петри в 50 мл коническую колбу. Тщательно промыть чашку Петри водопроводной водой, сливая воду в коническую колбу. Водопроводной водой довести объем до 45 мл. Оставить колбу в состоянии покоя на 10 минут.

Через 10 минут пипеткой снять супернатант, оставить нижние 10 мл (не выливать супернатант, т.к. это может нарушить осадок). Оставить удаленную жидкость для утилизации или деконтаминации после исследования образца.

Повторить этапы xv и xvi.

- xx) В случае положительного или сомнительного результата от каждой туши следует отобрать дополнительные образцы, сделав объединенный образец. Их следует исследовать отдельно или последовательно из небольших пулов до выявления отдельных инфицированных животных.

#### **1.1.5. Идентификация личинок:**

Личинки первой стадии, полученные из мышц, имеют около 1 мм в длину и 0,03 мм в ширину. Наиболее выдающаяся черта личинок *Trichinella* – стихосома, которая состоит из серии дисковидных клеток, выстилающих пищевод и занимающих первую половину туловища червяка. Личинку *Trichinella* можно наблюдать свернутой в кольцо (когда холодно), подвижной (когда тепло) или S-образной (в случае гибели). В случае сомнений червяки должны быть осмотрены при более высоком увеличении, а затем ткани должны быть проверены перевариванием. Если показатели высокие, то первое, что следует сделать, это выполнить соответствующие разведения.

Личинки, выделенные в результате переваривания мышечной ткани, можно хранить в 90-95% или 70-75% растворе этилового спирта (или 95% для более длительного хранения) для последующего генотипирования с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. Раздел В.1.3.).

#### **1.1.6. Обеспечение качества.**

Лаборатории, использующие методы искусственного переваривания, должны поддерживать соответствующую систему качества для обеспечения чувствительности теста. Компоненты системы качества при тестировании переваривания описаны Международной Комиссией по трихинеллезу (<http://www.trichinellosis.org/>) и в других источниках (Gajadhar & Forbes, 2001; Gajadhar *et al.*, 2009) и должны включать регулярное квалификационное тестирование (Forbes *et al.*, 1998; 2005, Gajadhar *et al.*, 2009).

## **1.2. Другие методы прямого обнаружения**

### **1.2.1. Метод с двумя разделительными воронками**

Данный анализ рекомендуется в качестве альтернативы традиционно используемой процедуре переваривания, описанной выше. Он утвержден ЕС для проверки экспорта. Данный метод был разработан для использования в строгих условиях контроля качества, для снижения технической погрешности, а также в достаточной степени валидирован для использования в отношении свинины и конины (Forbes & Gajadhar, 1999; Forbes *et al.*, 2008). Он включает технику переваривания при вращении и перемешивании, а также последовательное применение разделительных воронок для осаждения личинок. В данной процедуре меньше этапов, она требует меньше времени и здесь реже нужно применять процедуру очистки. Для проведения переваривания используется инкубационная камера, оборудованная прозрачными стеклянными дверцами и установленная на температуру 45°C. Переваривание проводится в 3 литрах искусственного желудочного сока. После переваривания суспензию выливают в 4-литровую разделительную воронку через сито с диаметром отверстия 177-180 мкм, которое тщательно промывают водопроводной водой. Суспензию оставляют на 30 минут и 125 мл дренируют в 500-мл разделительную воронку. Объем доводят до 500 мл, добавив 375 мл водопроводной воды; получившуюся суспензию оставляют еще на 10 минут. В итоге 22-27 мл осадка сцеживают в чашку Петри и наблюдают личинок, как описано выше.

### **1.2.2. Переваривание объединенных образцов механическим способом/технология осаждения**

В данном методе на этапе переваривания используется нагреваемый гомогенизатор Stomacher, а разделительная воронка используется для сцеживания личинок (Европейская Комиссия, 2005). (*Эквивалентный метод 4: Регламент [ЕК] №2075/2005, Европейская Комиссия, 2005*).

### **1.2.3. Метод автоматического переваривания для объединенных образцов до 35 г**

Данный метод включает камеру для автоматического переваривания и мембранный фильтр для извлечения и исследования личинок (*Эквивалентный метод С, Регламент [ЕК] №2075/2005, Европейская Комиссия, 2005*). Критически важные этапы переваривания и извлечения личинок сложно контролировать автоматическим методом, и это не рекомендуется ИСТ.

## **1.3. Другие тесты**

### **1.3.1. Полимеразная цепная реакция**

Ограниченное количество исследований показало, что ПЦР может использоваться для обнаружения нуклеиновых кислот личинок в мышечной ткани зараженных животных. Однако этот метод недостаточно чувствителен, и не является практическим способом для обычного тестирования продуктивных животных. Идентификация вида или генотипа *Trichinella*, выделенной из мышечной ткани, важна для понимания эпидемиологии паразитов у животных и для оценки относительного риска, которому подвергается человек, а также для отслеживания инфекции до фермы происхождения. Были разработаны специфические праймеры, которые позволяют идентифицировать единичные личинки, выделенные из

мышечных тканей по видам и генотипам, используя ПЦР (Pozio & La Rosa, 2010). Подробное руководство по идентификации личинок *Trichinella* в мышечной ткани (по видам и генотипам) было разработано ИСТ (<http://trichinellosis.org>). Запросы для спецификации или генотипирования личинок *Trichinella* можно делать через Референтные Лаборатории МЭБ в Риме, Италия, или в Саскатуне, Канада (см. таблицу, приведенную в Части 4 данного Руководства по наземным животным).

### 1.3.1. Трихиноскопия.

Данный метод включает сжимание многочисленных кусочков мышечной ткани размером 2 x 10 мм между двумя стеклянными пластинами (компрессорий), пока они не станут полупрозрачными, затем их исследуют через микроскоп. Имеются многочисленные сравнительные данные, указывающие, что трихиноскопия не настолько чувствительна, как анализы переваров, поэтому она **не рекомендуется** ИСТ, ЕС или МЭБ для стандартного исследования туш (Европейская Комиссия, 2015\1375; <http://www.trichinellosis.org/>).

## 2. Серологические тесты

Описан ряд иммунологических тестов для диагностики трихинеллеза у домашних и диких животных (Gamble *et al.*, 2004). Эти методы включают иммунофлуоресцентный анализ (IFA), иммуноэлектроблоттинг (IEBT), вестерн-блоттинг, ферментный иммуногистохимический анализ и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Только ИФА и вестерн-блоттинг были валидированы в соответствии со стандартами МЭБ (Gomez Morales *et al.*, 2012, 2014, 2015, 2016). Заявки на референтные сыворотки свиней можно сделать через Референтную лабораторию МЭБ в Риме, Италия (Gomez Morales *et al.*, 2015).

ИСТ представила стандартный ряд рекомендаций по разработке и использованию серологических тестов для выявления циркулирующих антител (Gamble *et al.*, 2004). ИФА – единственный иммунологический анализ, который принят ИСТ. Он утвержден только в качестве инструмента для эпизоотологического надзора для выявления антител к *Trichinella* у свиней; он не надежен при выявлении инфекции *Trichinella* у отдельных животных с целью обеспечения пищевой безопасности и с иными целями.

Несмотря на то, что другие серологические тесты могут иметь некоторое практическое применение, ИФА считается лучшим выбором по причине своей экономичности, надежности, адаптируемости к практикам обеспечения качества, обширного объема данных по валидации, хорошего уровня чувствительности и специфичности при проведении в соответствующих условиях. Он является полезным инструментом для тестирования поголовья и стандартно используется в программах надзора и при расследовании вспышек болезни.

Для подтверждения положительных результатов в ИФА рекомендуется проводить тестирование валидированным вариантом вестерн-блоттинга (Gomez Morales *et al.*, 2012).

### 2.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

#### 2.1.1. Чувствительность и специфичность

Настолько низкий уровень инфекционности как одна личинка/100 г ткани выявляется с помощью ИФА у свиней (Gamble *et al.*, 2004). Такой высокий уровень

чувствительности делает серологическое тестирование с помощью ИФА полезным для выявления непрерывной передачи инфекции *Trichinella* на фермах или для более масштабных программ надзора. Недостатком серологии при обнаружении *Trichinella* инфекций является низкий процент ложноотрицательных результатов, наблюдаемый у зараженных животных и ложноположительные результаты, которых может быть довольно много в частных подворьях, у свиней на открытом выгуле и диких кабанов.

Ложноотрицательные результаты имеют место из-за запаздывания кинетики ответов антител после приема внутрь личинки, а ложноположительные связаны с перекрёстными реакциями с другими микроорганизмами.

Выявляемые уровни антител обычно не проявляются у свиней до 3-5 недель или более после контакта (Gamble, 1996; Gamble *et al.*, 1996).

По этой причине серологическое тестирование не рекомендуется для проверки отдельных туш. Серологические ответы у свиней сохраняются в течение длительного времени после заражения без снижения титров, однако, как было описано, у лошадей уровень антител снижается в течение нескольких месяцев после заражения (Nockler *et al.*, 2000). Серологические тесты имеют малое практическое значение при исследовании лошадей, т.к. титры антител в конечном итоге падают ниже диагностических уровней, несмотря на присутствие личинок в мышцах (Hill *et al.*, 2007; Pozio *et al.*, 2002). Недостаточно данных об ответах антител при заражении *Trichinella* среди видов дичи, но следует получать высококачественные образцы сывороток для снижения вероятности ложноположительных результатов.

Имеются сведения о валидации серологических тестов для домашних свиней, но для других видов животных сведения ограничены, включая исследования по ИФА и вестерн-блоттингу для диких кабанов и собак (Gomez Morales *et al.*, 2014, 2016).

### **2.1.2. Образцы**

Использование ИФА для выявления присутствия паразит-специфичных антител представляет собой быстрый метод, который может применяться на сыворотках, цельной крови, плазме или тканевой жидкости, отобранных до или после убоя (Gamble & Patrascu, 1996). Используемые разведения отличаются при применении для сыворотки и тканевой жидкости, поскольку концентрация антител выше в сыворотке, чем в тканевой жидкости (Nockler *et al.*, 2005).

### **2.1.3. Антигены**

Специфичность и чувствительность ИФА в основном зависит от использованных в тесте антигенов. TSL-1 антигены являются основными компонентами экскреторно-секреторных (ES) антигенов и являются специфически выделенными из стихоцитных клеток живых личинок L1. TSL-1 имеют общий иммунодоминантный углеводный эпитоп, который распознается всеми животными, зараженными *Trichinella*.

ES-антигены *T. spiralis*, используемые в ИФА, сохраняются у всех видов и генотипов *Trichinella* (Ortega-Pierres *et al.*, 1996), несмотря на ряд выявленных отличий, поэтому инфекцию можно выявить у свиней и других животных, являющихся носителями любого из этих двенадцати таксонов. Разработаны

препараты антигена, которые обеспечивают высокую степень специфичности при исследовании инфекции *Trichinella* у свиней (Gamble *et al.*, 1988).

#### 2.1.4. Получение антигена

Диагностика инфекции *Trichinella* посредством ИФА может проводиться с использованием ES-продуктов от личинок *Trichinella* в культуре (Gamble *et al.*, 1988). Из соображений стандартизации рекомендуется использовать *T. spiralis* для производства антигенов при проверке продуктивных животных. Однако было показано, что антиген, приготовленный из какого-либо вида *Trichinella*, может быть использован для обнаружения антител у зараженных животных независимо от инфицирующего вида (Kapel & Gamble, 2000). Паразиты, предполагаемые к использованию для антигенных препаратов, могут поддерживаться с помощью серийных пассажей на мышах, крысах или морских свинках.

Для приготовления антигена, предполагаемого к использованию в ИФА (Gamble *et al.*, 1988), личинки *T. spiralis* (Т-1) на первой стадии, выделяют из освобожденных от шкурки, нутрованных тушек земляных мышей или крыс путем переваривания в 1% пепсине с 1% HCl в течение 30 минут при 37°C (как описано выше). Этим личинок промывают (три раза по 20 минут каждый цикл) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с пенициллином (500 ед/мл) и стрептомицином (500 ед/мл), а затем помещают (при плотности 5000 L1/мл) в DMEM, дополненную NEPES (N-2- гидроксипиперазин, N-2-этансульфоновая кислота) (10мМ), глутамином (2мМ), пируватом (1мМ), и пенициллином (250 ед/мл)/стрептомицином (250 мкг/мл) (полная DMEM) при 37°C в 10% CO<sub>2</sub> на открытом воздухе.

Среду для культивирования удаляют не позднее, чем через 18-20 часов, червей удаляют фильтрацией, а жидкость концентрируют под давлением с использованием мембраны, задерживающей молекулярный вес в 5000 Да. Высвобождающиеся таким образом экскреторно-секреторные (ES) антигены могут храниться замороженными при -20° С короткий промежуток времени или более длительный при -70°C; они содержат приблизительно 25 белковых компонентов, как определено SDS/PAGE (додецил сульфат натрия/электрофорез в полиакриламидном геле), многие из которых содержат диагностический TSL-1 углеводный антигенный эпитоп.

Чистота антигена является важной для специфичности ИФА. Должны быть предприняты определенные шаги для отслеживания роста бактерий либо визуально, либо с помощью фазового микроскопа, либо с помощью культивирования образца среды. Культуры, в которых наблюдается рост бактерий, должны быть отбракованы. Личинки не должны поддерживаться более 18 часов; порча червяка после этого времени способствует утечке соматических антигенов, что снижает специфичность теста. Антиген, полученный описанным способом, должен иметь 280:260 нм соотношение абсорбции >1.0. Антигены, полученные при *in vitro* сохранении личинок *Trichinella*, должны быть проверены против панели известных сывороток, как положительных и как отрицательных.

#### 2.1.5. Процедура теста

Пример ИФА для обнаружения *Trichinella* инфекции у свиней приводится ниже. Особенно важно, чтобы все реагенты, используемые в анализе, были стандартизированы для оптимальной концентрации с целью получения достоверных результатов. В примере показаны самые типовые значения.

- i) Сенсibilизировать 96-луночные титрационные микропланшеты 100 мкл/мл ES антигенами *T. spiralis*, разведенными до 5 мкг/мл в покрывающем буфере (50мМ буфера карбонат/бикарбонат, рН 9.6). Сенсibilизация проводится в течение 60 минут при 37°C или в течение ночи при 4°C.
- ii) Трижды отмыть сенсibilизированные антигеном лунки с помощью промывочного буфера, содержащего 50мМ Tris, рН 7.4, 150 мМ NaCl, 5,0% порошка обезжиренного молока и 1,0% Triton X-100. После каждой отмывки планшеты промокнуть.
- iii) Развести сыворотку свиней в промывочном буфере до 1/50 или 1/100. Альтернативными источниками антител, которые могут быть использованы вместо сывороток, являются цельная кровь или тканевая жидкость в разведении 1/5 или 1/10 (Nockler *et al.*, 2005). Добавить 100 мкл разведенных сывороток в сенсibilизированные антигеном лунки. Известные положительные и отрицательные пробы сывороток должны быть использованы на каждом планшете в том же самом разведении, что и тестируемая сыворотка. Инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут.
- iv) Отмыть лунки трижды как на этапе ii.
- v) Добавить 100 мкл/лунку очищенного по аффинности кроличьего антисвиного IgG-пероксидазного конъюгата при соответствующем разведении в промывочном буфере. После добавления второго антитела инкубировать планшеты в течение 30 минут при комнатной температуре.
- vi) Отмыть лунки трижды как на этапе ii. Смыть один раз дистиллированной водой.
- vii) Добавить 100 мкл соответствующего пероксидазного субстрата (напр. 5'-аминосалициловой кислоты 0,8 мг/мл с 0,005% перекисью водорода, рН 5,6-6,0).
- viii) Спустя 5-15 минут считать планшеты на плотность цвета при длине волны 450 нм на автоматическом ридере для микропланшетов. Значения, полученные в ИФА, превышающие пороговые значения считаются положительными (Jacobson, 1998).

Так же в продаже имеются адаптированные варианты ИФА. Производитель должен валидировать набор до подачи заявления о регистрации, а пользователь до использования должен также оценить производительность набора, применив отобранные отрицательные и положительные эталонные сыворотки.

Тест следует проводить в условиях, в которых применяются признанные на международном уровне стандарты обеспечения качества, например ISO 17025.

Стандартные эталонные сыворотки от свиней доступны в Референтной лаборатории МЭБ, Рим, Италия (Gomez Morales *et al.*, 2015). Кроме использования международных стандартных сывороток (при наличии) все коммерческие и внутренние ИФА следует оценивать, используя банк отрицательных контрольных

сывороток, представляющих исследуемое поголовье и группу положительных животных на разных стадиях инфекции в соответствии с руководствами ИСТ.

### **С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ И ДИАГНОСТИЧЕСКИМ БИОПРЕПАРАТАМ**

Отсутствуют вакцины против *трихинеллеза* у продуктивных животных и дичи.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- BOIREAU P., VALLEE I., ROMAN T., PERRET C., MINGYUAN L., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.*, 93, 309–320.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (2010). *Meat Hygiene Manual of Procedures*, Chapter 5, Sampling and Testing, Section 5.5.2.7.6, Double Separatory Funnel.
- EUROPEAN COMMISSION (2005). Commission Regulation (EC) No. 2075/2005 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. European Union*, L338, 60–82 (Regulation as last amended by Commission Regulation (EC) No 1245/2007: *Off. J. European Union*, L 281, 19–20).
- EUROPEAN COMMISSION (2015). Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Off. J. European Union*, L212/7, 11.8.2015, 7–34
- FORBES L.B., HILL D.E., PARKER S., TESSARO S.V., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A.A. (2008). Complete validation of a unique digestion assay to detect *Trichinella* larvae in horse meat demonstrates its reliability for meeting food safety and trade requirements. *J. Food Prot.*, 71, 558–563.
- FORBES L.B. & GAJADHAR A.A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.*, 62, 1308–1313.
- FORBES L.B., PARKER S., & SCANDRETT W.B. (2003). Comparison of a modified digestion assay with trichinoscopy for the detection of *trichinella* larvae in pork. *J. Food Prot.*, 66, 1043–1046.
- FORBES L.B., RAJIC A. & GAJADHAR A.A. (1998). Proficiency samples for quality assurance in *Trichinella* digestion tests. *J. Food Prot.*, 61, 1396–1399.
- FORBES L.B., SCANDRETT W.B. & GAJADHAR A.A. (2005). A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*. *Vet. Parasitol.*, 132, 173–177.
- GAJADHAR A.A. & FORBES L.B. (2001). An internationally recognized quality assurance system for diagnostic parasitology in animal health and food safety with example data on trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, 103, 133–140.
- GAJADHAR A.A., POZIO E., GAMBLE H.R., NOCKLER K., MADDOX-HYTTEL C., FORBES L.B., VALLEE I., ROSSI P., MARINCULIC A. & BOIREAU P. (2009).

Trichinella diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet. Parasitol.*, 159, 197–205.

GAJADHAR A.A., SCANDRETT W.B. & FORBES L.B. (2006). Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 25, 595–606.

GAMBLE H.R. (1996). Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot.*, 59, 295–298.

GAMBLE H.R. (1997). Parasites associated with pork and pork products. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, 16, 496–506.

GAMBLE H.R., BESSONOV A.S., CUPERLOVIC K., GAJADHAR A.A., VAN KNAPEN F., NOECKLER K., SCHENONE H. & ZHU X. (2000). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.*, 93, 393–408.

GAMBLE H.R., GAJADHAR A.A. & SOLOMON M.B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. *J. Food Prot.*, 59, 420–425.

GAMBLE H.R. & PATRASCU I.V. (1996). Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *J. Food Prot.*, 59, 1213–1217.

GAMBLE H.R., RAPIC D., MARINCULIC A. & MURRELL K.D. (1988). Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, 30, 131–137.

GAMBLE H.R., POZIO E., BRUSCHI F., NÖCKLER K., KAPEL C.M.O. & GAJADHAR A.A. (2004). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the Use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. *Parasite*, 11, 3–13.

GÓMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M., BANDINO E., CAPELLI G., CORRIAS F., GELMINI L., NARDI A., SACCHI C., CHERCHI S., LALLE M. & POZIO E. (2014). Indirect versus direct detection methods of *Trichinella* spp. infection in wild boar (*Sus scrofa*). *Parasit. Vectors.*, 7, 171.

GÓMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M., BLAGA R., ZIVOJINOVIC M., RIBICICH M. & POZIO E. (2012). A distinctive Western blot pattern to recognize *Trichinella* infections in humans and pigs. *Int. J. Parasitol.*, 42, 1017–1023.

GÓMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M. & POZIO E. (2015). Candidates for reference swine serum with anti-*Trichinella* antibodies. *Vet. Parasitol.*, 208, 218–224.

GÓMEZ-MORALES M.A., SELMI M., LUDOVISI A., AMATI M., FIORENTINO E., BREVIGLIERI L., POGLAYEN G. & POZIO E. (2016). Hunting dogs as sentinel animals for monitoring infections with *Trichinella* spp. in wildlife. *Parasit. Vectors.*, 9, 154.

HILL D.E., FORBES L.B., KRAMER M., GAJADHAR A.A. & GAMBLE H.R. (2007). Larval viability and serological response in horses with long-term infection of *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasit.*, 146, 107–116.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, (2015). ISO 18743: Microbiology of the food chain - Detection of *Trichinella* larvae in meat by artificial digestion method. en ve witzerland.

JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 17, 469–486.

KAPEL C.M.O. & GAMBLE H.R. (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. Int. J. Parasitol., 30, 215–221.

KORHONEN P.K., POZIO E., LA ROSA G., CHANG B.C., KOEHLER A.V., HOBERG E.P., BOAG P.R., TAN P., JEX A.R., HOFMANN A., STERNBERG P.W., YOUNG N.D. & GASSER R.B. (2016). Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. Nat. Commun., 7, 10513.

KRIVOKAPICH S.J., POZIO E., GATTI G.M., PROUS C.L., RIBICICH M., MARUCCI G., LA ROSA G. & CONFALONIERI V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. Int. J. Parasitol., 42, 903–910.

NOCKLER K., POZIO E., VOIGT W.P. & HEIDRICH J. (2000). Detection of *Trichinella* infection in food animals. Vet. Parasitol., 93, 335–350.

NOCKLER K., SERRANO F.J., BOIREAU P., KAPEL C.M. & POZIO E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. Vet. Parasitol., 132, 85–90.

ORTEGA-PIERRES M.G., YEPEZ-MULIA L., HOMAN W., GAMBLE H.R., LIM P., TAKAHASHI Y., WASSON D.L. & APPLETON J.A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: A platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunol., 18, 273–284.

POZIO E. (2014). Searching for *Trichinella*: not all pigs are created equal. Trends Parasitol., 30, 4–11.

POZIO E. (2015). *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. Vet. Parasitol., 213, 46–55.

POZIO E. & LA ROSA G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. Methods Mol. Biol., 216, 299–309.

POZIO E., SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L., GOMEZ MORALES M.A., BOIREAU P. & NÖCKLER K. (2002). Evaluation of ELISA and Western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. Vet. Parasitol., 108, 163–178.

POZIO E. & ZARLENGA D.S. (2013). New pieces of the *Trichinella* puzzle. Int. J. Parasitol., 43 (12–13), 983–997.

\*

\* \*

**NB:** Существуют Справочные лаборатории МЭБ по трихинеллезу (см. Таблицу в Части 3 данного *Руководства по наземным животным* или можно обратиться на сайт МЭБ и изучить последний список: [www.oie.int](http://www.oie.int)).