

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»

Аграрно-технологический институт
Департамент ветеринарной медицины

«Допустить к защите»

Директор учебного департамента
«Ветеринарной медицины»

Ватников Ю.А.

« ____ » _____ 2022 г.

Выпускная квалификационная работа магистра

Направление 36.04.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

**ТЕМА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ
СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ТРИХИНЕЛЛЕЗА У
СВИНЕЙ И ДИКИХ КАБАНОВ**

Выполнил студент: Пименов Илья Александрович

Группа: СВЭмд-01-20

Студ. Билет № 1032202271

Руководитель выпускной
квалификационной работы:
к.в.н., доцент Петров А. К.

Автор: _____

г. Москва

2022 г.

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Историческая справка.....	7
1.2 Морфология.....	8
1.2.1 Половозрелые трихинеллы.....	13
1.2.2 Развитие и инкапсуляция в мышцах.....	15
1.3 Виды и генотипы нематод рода <i>Trichinella</i>	24
1.3.1 <i>Trichinella spiralis</i> (генотип Т1).....	27
1.3.2 <i>Trichinella nativa</i> (генотип Т2).....	29
1.3.3 <i>Trichinella britovi</i> (генотип Т3).....	30
1.3.4 <i>Trichinella pseudospiralis</i> (генотип Т4).....	32
1.4 Смешанные трихинеллезные инфекции.....	32
1.5 Восприимчивые к трихинеллезу животные.....	33
1.6 Эпидемиология.....	34
1.6.1 Трихинеллез людей.....	34
1.6.2 Трихинеллез домашних свиней.....	35
1.6.3 Трихинеллез лошадей.....	37
1.6.4 Трихинеллез диких животных.....	38
1.7 Влияние окружающей среды на <i>Trichinella</i> spp.....	39
1.8 Биологические свойства природных изолятов <i>Trichinella</i> spp.....	41
1.9 Профилактика трихинеллеза в звероводческих хозяйствах.....	42
1.10 Ветеринарно-санитарная экспертиза в системе мер борьбы с трихинеллезом.....	48
Заключение.....	50
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	52
2.1 Материалы и методы	52
2.1.1 Компрессорная трихинеллоскопия и анализ морфометрия капсул трихинелл.....	55
2.1.2 Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС.....	58

2.1.3 Таксономическая идентификация природных изолятов трихинелл методом ПЦР.....	61
2.1.4 Иммуноферментный анализ.....	69
2.1.5 Иммунохроматографический анализ.....	73
2.2 Результаты исследований и обсуждения.....	75
2.2.1 Компрессорная трихинеллоскопия и анализ морфометрия капсул трихинелл.....	75
2.2.2 Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС.....	81
2.2.3 Таксономическая идентификация природных изолятов трихинелл методом ПЦР.....	85
2.2.4 Иммуноферментный анализ.....	86
2.2.5 Иммунохроматографический анализ.....	91
ВЫВОДЫ.....	94
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДОЖЕНИЯ.....	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

ВВЕДЕНИЕ

Трихинеллез — острое антропозоонозное заболевание человека и животных, вызываемое паразитированием в кишечнике, миграцией в организме и сопровождается инкапсулированием личинок нематод (трихинелл) в поперечнополосатых мышцах инвазированного млекопитающего. Трихинеллез относится к гельминтозоозам, так как источником инвазии являются многие домашние и промысловые животные. Чаще всего заражение трихинеллами происходит при поедании мышц теплокровных животных, содержащих инвазионных личинок. Однако заражение может произойти и при участии ряда беспозвоночных животных и птиц, являющимися «механическими» передатчиками трихинелл как в наземных, так и водных биоценозах [2].

Trichinella spp являются возбудителями трихинеллеза человека, заболевания, которое не только представляет опасность для здоровья населения, поражая людей, но и представляет экономическую проблему в животноводстве и безопасности пищевых продуктов [41, 5, 9, 3].

Трихинеллез человека был зарегистрирован в 55 (27,8%) странах по всему миру. Однако в некоторых из этих стран трихинеллезом заражаются только этнические меньшинства, а иногда и туристы. Коренные жители не заражаются, так как не употребляют сырое мясо. Заражение *Trichinella spp* было зарегистрировано у домашних животных (в основном свиней) и у диких животных в 43 (21,9%) и 66 (33,3%) странах, соответственно [12]. Из 198 стран мира примерно 40 (20%) представляют собой небольшие острова, удаленные от основных континентов, или города-государства, где *Trichinella spp* не может циркулировать среди животных из-за отсутствия местной фауны (как домашней, так и дикой) [9].

Наконец, информация о распространенности инфекции *Trichinella spp* у домашних животных и/или диких животных по-прежнему отсутствует в 92 странах [14].

Сегодня в этом роде распознано тринадцать таксонов, разделенных на два типа [12]. Один тип включает шесть видов и три генотипа, которые инкапсулируются в мышечных тканях хозяина после перепрограммирования мышечных клеток, а второй тип включает три вида, которые не инкапсулируются [21].

Шесть видов (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni* и *T. patagoniensis*) и три генотипа (*Trichinella* T6, T8 и T9) первого типа паразитируют только на млекопитающих [84, 37, 11].

Среди трех видов, относящихся ко второму типу, один заражает млекопитающих и птиц (*T. pseudospiralis*), а два паразитируют на млекопитающих и рептилиях (*T. papuae* и *T. zimbabwensis*) [29].

Учитывая современное состояние исследований по филогении трихинелл, можно задаться вопросом: какие еще филогенетические задачи остаются неразрешенными. До сих пор остаются актуальными вопросы внутривидового генетического разнообразия. Особенно это актуально для таких широко распространенных видов, как *Trichinella spiralis* и *T. nativa*. Именно эти два вида являются доминантными представителями трихинеллид на территории Российской Федерации [7, 67, 27, 42].

Необходимость изучения внутривидовых групп в пределах этих двух видов определяется также эпидемиологическими и эпизоотологическими особенностями циркуляции этих двух видов в экосистемах нашей страны. Так, вид *T. spiralis* встречается у людей и животных практически во всех регионах России [33, 4, 18]. Можно задаться вопросом, насколько этот вид существует на территории всего своего ареала как единое целое, или с помощью молекулярно-генетических маркеров он может быть подразделен на отдельные внутривидовые группировки.

Кроме того, проблема выбора метода исследования сырья на трихинеллез является очень актуальной на сегодняшний день, так как правильность и уместность подобранного способа дает возможность наиболее

качественно и логично использовать с экономической точки зрения ресурсы, время и затраты труда [25].

В связи с этим **целью** нашей работы явилось проведение сравнительного анализа эффективности современных методов диагностики трихинеллеза у свиней и диких кабанов.

Для решения данной цели перед нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ литературных и научных данных по распространению и диагностике трихинеллеза на территории Российской Федерации.
2. Провести компрессорную трихинеллоскопию проб мяса свиньи и дикого кабана, предоставленных институтом паразитологии ВНИИП им. К.И. Скрыбина – филиал ВИЭВ.
3. Провести анализ морфологического строения капсул трихинелл, обнаруженных в исследуемых пробах.
4. Провести биохимическое исследование (трихинеллоскопия после искусственного переваривания мышц) проб мяса свиньи и кабана, предоставленных институтом паразитологии ВНИИП им. К.И. Скрыбина – филиал ВИЭВ.
5. Провести таксономическую идентификацию природных изолятов мышечных личинок трихинелл методом ПЦР.
6. Дать сравнительную оценку эффективности современных серологических методов диагностики трихинеллеза (ИФА и ИХА).

Ниже мы предлагаем некоторые полученные нами данные, непосредственно относящиеся к проблеме внутривидового генетического разнообразия трихинелл на территории Российской Федерации.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Историческая справка

Трихинеллез относится к болезни инвазионной этиологии с острым или хроническим течением, которая проявляется аллергическими симптомами. Вызывают данное заболевание представители круглых червей, личинки которых локализуются в мышечной ткани животных и человека, а взрослые особи трихинелл базируются в кишечнике [1, 6, 75].

Трихинеллез входит в группу болезней зоонозов, то есть человек заболевает данным паразитарным заболеванием от животных, если он съест пораженное личинками мясо домашних свиней, кабанов и других восприимчивых животных, без достаточной термической обработки [80, 56, 31].

На всех материках Земли в большей или меньшей степени были обнаружены зараженные виды животных и птиц (их количество составляет более 100) [10].

В 30-е годы 18 века студент медицинского факультета Д. Педжет при исследовании трупа человека заметил в мышечной ткани большое количество похожих на цисты круглых включений. А в 1835 году Р. Оуэн – английский зоолог, описал обнаруженные личинки [24, 86].

В последующие годы личинки трихинеллы начали обнаруживать в мышцах различных видов животных. Первый биологический цикл развития трихинеллеза открыли ученые Р. Вихров и Ф. Лейкарт в 60-х годах девятнадцатого века [19, 43].

В Германии ближе к концу 19 века случались вспышки трихинеллеза у человека, поэтому Рудольф Вирхов считал, что для предупреждения этой болезни нужно проверять мясо свиней под микроскопом на наличие тех самых личинок. С тех пор проверка свинины на трихинеллез производилась на законодательном уровне. В 81-м году 19 века обязательной стала проверка свинины на личинки трихинелл в Петербурге, а через 7 лет и в Москве [38].

В двадцатом веке на протяжении двух лет с 95 по 97 годы было зафиксировано большое количество случаев заражения людей личинками трихинелл и несколько случаев с летальным исходом [70, 71, 89].

Историю развития трихинеллеза, как заболевания, описывали в своих трудах и изучали многие ученые, врачи, гельминтологи и специалисты такие, как В. А. Калюс (1952), А. С. Бессонов (1972), Ю. А. Березанцев (1974), С. Н. Боев (1978), В. А. Бритов (1982) [8, 35, 40].

1.2. Морфология

Трихинеллы — *Trichinella spiralis* — мелкие нитевидные круглые гельминты, покрытые тонкой прозрачной кутикулой. Трихинелла по зоологической классификации относится к типу *Nemathemintes*, классу круглых червей *Nematoda*, подклассу *Adenophorea*, отряду *Trichocephalida*, подотряду *Trichocephalaia*, семейству *Trichinellidae*. Трихинеллы характеризуются своеобразным циклом развития, который прodeлывают в одном хозяине без обязательного пребывания какой-либо стадии развития паразита во внешней среде. В половозрелой стадии они паразитируют в стенке тонкого и начале толстого кишечника, а в личиночной — в поперечнополосатой мускулатуре, кроме мышцы сердца [34, 39, 85].

Трихинеллы — живородящи. Развитие трихинелл является примером укороченного цикла, когда одна особь млекопитающего играет для них роль окончательного, а затем и промежуточного хозяина. У трихинелл наблюдается постоянный паразитизм, так как ни одна из стадий развития не выходит во внешнюю среду [60].

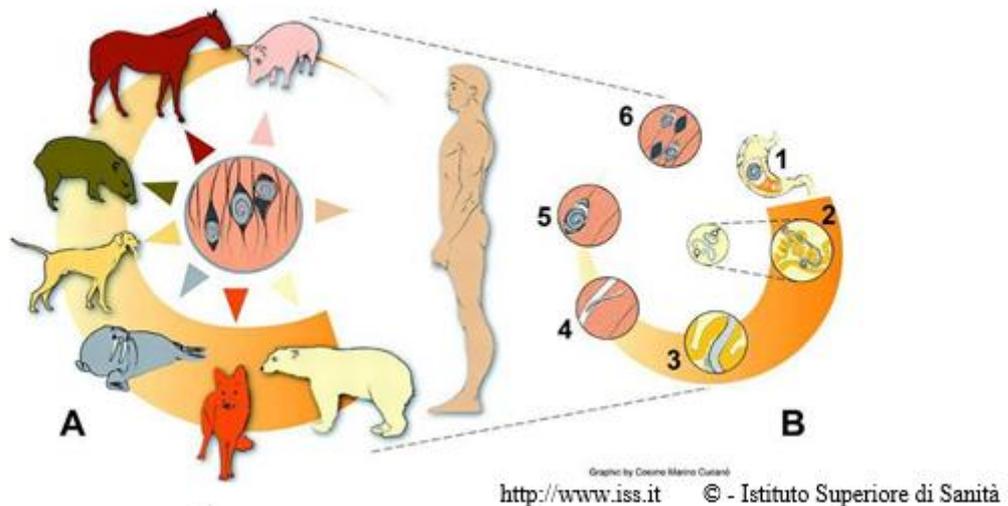


Рисунок 1 - Общая схема цикла развития трихинелл

В биологическом цикле трихинелл можно выделить несколько стадий: яйцо, эмбрион, мигрирующая личинка, ювенильная личинка, инвазионная личинка и половозрелая стадия. Такое разделение значительно упрощает схему цикла, так как каждая стадия проходит развитие в разных условиях существования в хозяине. Развитие от яйцеклетки до личинки происходит в яичнике и матке самки [44, 90]. Отрожденные личинки мигрируют по организму хозяина до скелетных мышц. Проникнув в мышечные волокна, они развиваются до инвазионной личинки (ювенильная личинка). Инвазионная личинка инкапсулируется в мышцах и без видимых морфологических изменений может существовать в хозяине длительное время. Из таких личинок при попадании их в кишечник другого хозяина развивается половозрелое поколение самцов и самок [15, 51].

Мигрирующая личинка. Отрожденные личинки трихинеллы имеют размеры 100 - 110 x 5⁻⁶ мкм [13, 34, 76]. Передний отдел на протяжении 8 - 10 мкм заполнен гомогенной жидкостью и образует головной «колпачок», в нем содержится гистолитический фермент, который обеспечивает внедрение личинки в мышечное волокно. Дифференцировки внутренних органов отсутствует. Во время миграции по малому и большому кругу

кровообращения личинки несколько увеличиваются в длину до 120 мкм, но никаких морфологических изменений в них не происходит [31].

Мышечная личинка. Личинки трихинелл развиваются до инвазионной стадии в волокнах поперечнополосатых мышц. За это время длина их увеличивается более десяти раз и достигает максимальных размеров: у мужских личинок - 1,16 x 0,06 мм, у женских - 1,36 x 0,06 мм [16, 36, 77]. Тело мышечных личинок, как и половозрелых трихинелл, несколько сужено спереди. В личинках происходит формирование различных органов и тканей. Рост личинки, также и последующей половозрелой стадии, осуществляется преимущественно за счет средней части тела, соответствующей средней кишке.

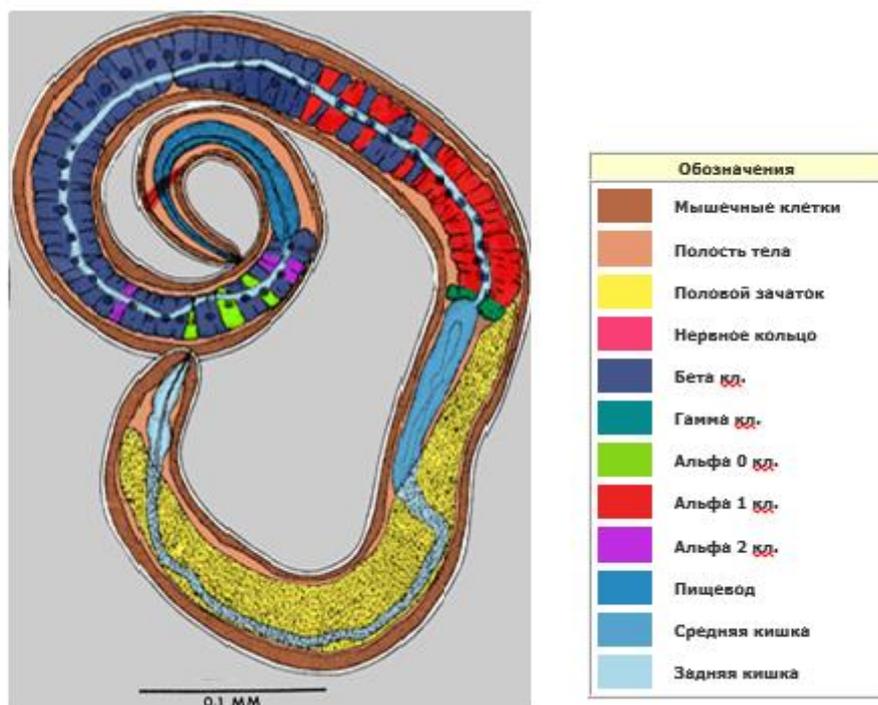


Рисунок 2 - Строение мышечной личинки трихинеллы

У сформированных личинок пищеварительная трубка, начинающаяся терминально ротовым отверстием на переднем конце тела и заканчивающаяся также терминально на заднем конце, четко дифференцирована на переднюю (пищевод), среднюю и заднюю (ректум) кишку. Ротовое отверстие ведет в длинный пищевод, около которого в начальном отделе не очень отчетливо

видно нервное кольцо. Нервное кольцо представляет собой лишенное ядер скопление нервных волокон, защищенных гиподермальной тканью. На месте перехода пищевода в среднюю кишку лежат две пищеварительные одноклеточные железы [39].



Рисунок 3 - Морфология мышечной личинки трихинеллы

Средняя кишка начинается ампуловидным расширением сразу же за клеточным пищеводным телом. Четко заметна граница средней кишки и ректума. Причем у мужских личинок ректум имеет в длину до 56 *мкм*, а у женских — до 25 *мкм*. Кишечник у женских личинок лежит на дорсальной стороне параллельно яичнику, а у мужских часто посередине семенника переходит с дорсальной на вентральную сторону (вентральная сторона — наружная сторона спирали личинки) [65].

Клеточное пищеводное тело, или стихозома, полностью формируется на протяжении двух месяцев, заполняя полость тела (схизоцель) переднего конца личинки. Стихозома (длиной до 560 *мкм*) начинается в 200 *мкм* от переднего конца и лежит на протяжении всего пищевода. Стихозома состоит в среднем из 50 (до 56 клеток) стихоцитов, которые охватывают пищевод. Стихоциты мышечных личинок и половозрелых трихинелл также являются железами и секретируют белковые субстанции, служащие антигенами. Антигены, определяющиеся в гранулах стихоцитов, являются общими с антигенами экскреторно-секреторных продуктов трихинелл. Основная

концентрация гликогена в личинках происходит в стихоцитах, поэтому стихозома является еще и резервуаром энергетического вещества [62].

У личинок развиваются зачатки половой системы, по морфологическим различиям которых можно определить пол. Развитие гонад продолжается до 25— 26-го дня после заражения, но выводящих протоков на личиночной стадии не образуется. У вполне развитых женских личинок яичник лежит в задней части тела на вентральной стороне и занимает протяжение 0,27 мм. На переднем конце гонады формируется четко заметный клиновидный зачаток матки (состоящий из 6—8 клеток), который соединен с гонадой одной генитально-соединительной клеткой вульвы и влагалища [20].

У мужских личинок семенник (лежащий в задней части тела) спереди достигает конца пищеводного клеточного тела и зачатком семяпровода делает изгиб в обратную сторону по направлению к ректуму, но еще не соединяется с ним. Семенник имеет протяженность до 0,3 мм. Мышечных личинок уже через 17 дней можно легко дифференцировать по полу, по длине ректума и наличию клиновидного зачатка матки у самок [26].



Рисунок 4 -Короткий ректум самца

Длинный ректум самки

1.2.1 Половозрелые трихинеллы

В процессе развития кишечных трихинелл разными исследователями насчитывалось от двух до четырех линек. Первая наступает через 12—16 ч после начала инвазии, вторая у самок — через 28—36 ч, а у самцов — через 26—34 ч. Освобождение личинок трихинелл от капсул начинается сразу же при попадании их в желудок и идет параллельно с перевариванием мышц [48, 81].

Развитие личинок в половозрелых червей и паразитирование последних происходит непосредственно на кишечной стенке, в которую они внедряются передним концом тела. На четвертые сутки самки начинают отрождать личинок в ткань слизистой оболочки или в лимфатические сосуды кишечных ворсинок. У половозрелых червей на протяжении всего срока паразитирования активно функционируют половые железы: у самок происходит овогенез, а у самцов — сперматогенез. Наличие запаса спермы в матке у 40-дневных самок предполагает многократное оплодотворение [22, 30].

Рост и развитие самок трихинелл в кишечнике белых мышей продолжают в течение 5 дней, и они увеличиваются в длину с 1,36 мм до 3,32 мм и имеют диаметр до 0,08 мм. Половозрелыми самки становятся через 40 ч, когда в их каудальных отделах появляются яйца. Первое оплодотворение происходит через 44 ч, когда наступает дробление зиготы, а сформированные личинки в передних отделах матки видны через 72 ч. На протяжении всего срока паразитирования в матке самки содержатся дробящиеся яйца и личинки [28, 88].

Самцы растут в течение 7 дней и за это время увеличиваются в длину с 1,16 мм до 2,20 мм и имеют диаметр до 0,07 мм. Самцы начинают четко отличаться от самок по внешним признакам после первой линьки, когда у них на заднем конце тела по сторонам от клоаки появляются сначала небольшие копулятивные придатки (конические лопасти) [10].

После второй линьки они приобретают свои нормальные размеры. Зачаток семяпровода (на передней части гонады) растет назад и, уже через 6 ч соединяется с ректумом, образуя клоаку. Однако на этом развитие семяпровода не заканчивается, и через 27 ч из нижнего отдела формируется семенной мешок, заполненный спермой. Сперматогенез наблюдается во все сроки паразитирования самцов, и сперма всегда обнаруживается в семенном мешке [32].

Позади анального отверстия располагаются две пары сосочков. У самца отсутствуют спикула и спиккулярное влагалище, однако клоака обладает способностью выпячиваться во время копуляции [15, 46].

Половозрелые трихинеллы полностью расходуют запас гликогена, полученный ими от мышечных личинок. Половозрелые трихинеллы локализируются по всему тонкому кишечнику, начиная с двенадцатиперстной кишки и кончая верхними отделами толстого кишечника (слепая кишка и начальная часть ободочной). Наибольшая концентрация трихинелл встречается в средних отделах тонкого кишечника (тощая и подвздошная кишки), значительно меньшее количество гельминтов обнаруживается в двенадцатиперстной кишке, в самых верхних отделах тощей кишки, в слепой и в ободочной кишках [23].

При относительно слабом заражении, когда в слизистой оболочке не возникает воспаления в результате внедрения в нее трихинелл, последние лежат в тонком кишечнике между ворсинками, обвиваясь вокруг них. Реже трихинеллы проникают в крипты. Задние концы червей часто лежат свободно в просвете кишечника или между ворсинками. Передними концами трихинеллы вдавливаются в слизистую оболочку и проникают в толщу эпителия ворсинок или крипт. Обычная локализация передних концов трихинелл — основание эпителиального слоя перед базальной мембраной или под ней. Реже передние концы червей проникают в собственный слой (*stratum proprium*) слизистой оболочки ворсинок. В толстом кишечнике трихинеллы проникают передними концами в основание эпителиального слоя поверхности

слизистой оболочки или крипт. Задние концы червей также часто лежат свободно в просвете кишечника или в криптах. Такая локализация трихинелл в кишечнике отмечается во все сроки их паразитирования [50, 74].

Длительность жизни кишечных трихинелл короткая по сравнению с личиночной стадией, что является полезным приспособлением паразита. Удлинение срока жизни способствовало бы увеличению потомства, что могло привести к быстрой гибели хозяина и к затруднению передачи инвазии. У белых мышей и крыс трихинеллы в кишечнике живут 2—3 недели, и только единичные доживают до 30—45 дней. У морских свинок трихинеллы живут в кишечнике до 30—55 дней. Кишечные трихинеллы у человека обычно паразитируют не более 42—56 дней [45].

1.2.2 Развитие и инкапсуляция в мышцах

Адаптация к мышцам у личинок трихинелл появилась в процессе эволюции. Мышечная ткань, по-видимому, обеспечивала наиболее благоприятные условия для их развития. Личинки могут развиваться, лишь проникнув в волокна скелетной мускулатуры. Поэтому на начальных этапах их следует считать типичными внутриклеточными паразитами. Естественным барьером для внутриклеточных паразитов (микроорганизмов, простейших и др.), защищающим их от влияния гуморальных и фагоцитарных защитных реакций хозяина, служит оболочка клетки — полупроницаемая биологическая мембрана. Эволюционная адаптация таких паразитов была направлена на приспособление к химической среде клетки и преодоление ее защитных механизмов [17, 54].

Оказавшись в крови или ткани, внутриклеточные паразиты подвергаются фагоцитозу или воздействию гуморальных факторов. Пока личинки трихинелл развиваются в мышечном волокне, клетки возникшего воспалительного инфильтрата в мышцах не проникают под сарколемму. Лишь позже, начиная с 14-го дня, они разрушают на некотором протяжении

инвазированное и дистрофически измененное мышечное волокно, не затрагивая участка саркоплазмы, непосредственно окружающего личинку. В период всего паразитирования в мышцах личинка тесно связана с этим участком обменными процессами. Кусочек саркоплазмы инкапсулируется вместе с развивающейся в нем личинкой трихинеллы. Личинки различных видов гельминтов, паразитирующих в тканях промежуточных и резервуарных хозяев, имеют барьер в виде капсул, сформированных за счет реакции хозяина [68].

У личинок трихинелл наблюдаются более сложные взаимоотношения с хозяином: с одной стороны — это внутриклеточный паразит, а с другой — тканевый, так как происходит его инкапсуляция, но с частью живой саркоплазмы. Вокруг личинок с участком саркоплазмы формируется соединительнотканная капсула особого специфического строения, с хорошо развитой сосудистой сетью и чувствительными нервными окончаниями. Попав в мышечные волокна, личинки остаются на месте и начинают расти [21, 64].

Мышечные волокна, в которые только что внедрились личинки, не изменены, но уже с 8-го дня после заражения в них начинают постепенно развиваться признаки дистрофии и реактивных изменений. Такие волокна слегка утолщаются, теряют поперечную исчерченность и бледнее окрашиваются по сравнению с нормальными мышечными волокнами. В пораженных волокнах мышечные ядра интенсивно делятся, образуя «ядерные цепочки». Ядра увеличиваются и достигают диаметра 20—25 мкм, в них появляются крупные ядрышки до 5 мк, состоящие из РНК [47, 64].

Пораженные волокна значительно утолщаются, и вокруг них начинают появляться воспалительные клеточные инфильтраты. С 13-го дня мышечное волокно в том месте, где лежит личинка, веретеновидно расширяется. Клеточная инфильтрация постепенно увеличивается и состоит из сегментоядерных лейкоцитов и гистиоцитов.

С 16-го дня после заражения в мышцах накапливается большое количество личинок. Первые попавшие в мышцы личинки начинают скручиваться в веретенообразном расширении мышечного волокна, и около них обособливается участок живой измененной саркоплазмы с реактивно измененными и размножившимися ядрами. Вокруг таких участков саркоплазмы образуется грануляционный вал, отделяющий остальные фрагменты погибшего мышечного волокна. По данным разных авторов, некоторые личинки у мышей на 19—20-й день после заражения достигают инвазионного состояния, у крыс - на 17-18-й день, у кроликов — на 19-й день, у золотистых хомячков и свиней — на 20-й день. С 19-го дня единичные личинки становятся заметными в мышцах при трихинеллоскопии [10, 63].

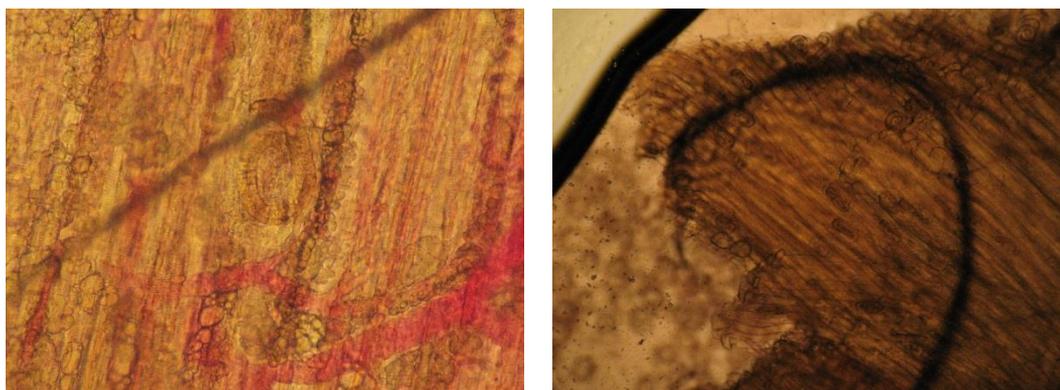


Рисунок 5 - Начиная скручиваться личинка окружена обособливающимся, расширенным и измененным участком саркоплазмы, в котором видно скопление измененных мышечных ядер с крупными ядрышками

С 20-го дня вокруг спирально свернутой личинки с окружающим ее участком саркоплазмы появляется тонкая соединительнотканная капсула. На поверхности, особенно на полюсах, и на месте погибших фрагментов мышечного волокна отмечается обильная воспалительная клеточная инфильтрация из сегментоядерных лейкоцитов, гистиоцитов и фибробластов с небольшой примесью лимфоцитов. С этого времени личинки в значительном числе достигают инвазионного состояния.

С 21—22-го дня капсулы утолщаются, на их внутренней стороне, обращенной к саркоплазме, появляется узкая полоска коллагена. В наружном слое формируется сосудистая сеть. Через 24 дня после заражения вокруг некоторых личинок видны четкие капсулы даже при трихинеллоскопии. Постепенно коллагеновый слой капсулы утолщается и гиалинизируется [49, 53].



Рисунок 6 - Формирование гиалиновой капсулы вокруг личинок трихинелл

Личинки инкапсулируются обычно по одной, но при интенсивном заражении под одной капсулой может быть 2, 3, 4, и более личинок трихинелл.

Наибольшая интенсивность воспалительной клеточной инфильтрации, вызванной некрозом мышечных волокон, а также, возможно, аллергической реакцией, в эксперименте на мышах и крысах отмечается на 27—28-й день после заражения, затем инфильтрация начинает постепенно уменьшаться. Воспалительный процесс принимает продуктивный характер, происходит

замещение погибших мышечных волокон соединительной тканью. Около полюсов капсул очень часто появляются жировые клетки [15, 24, 39].

Капсулы личинок трихинелл вначале сильно вытянуты в длину. Начиная с одного-полутора месяцев, на протяжении года и более гиалиновый слой капсулы утолщается, капсула укорачивается, участок инкапсулированной саркоплазмы уменьшается. Капсула принимает овальную форму с сильно утолщенным гиалиновым слоем на полюсах. На поверхности гиалинового слоя лежит наружный тонкий слой капсулы из клеточных элементов, преимущественно фибробластов. Наибольшее скопление фибробластов с примесью гистиоцитов и лимфоцитов отмечается на полюсах капсул. Когда капсула утолщается за счет гиалинового слоя, то при микроскопии раздавленных между стеклами кусочков мышц она выглядит двухконтурной [87].

В.А. Бритов предложил способ ретроспективного определения сроков инвазирования плотоядных животных *T. nativa* в зависимости от строения капсулы, от толщины её стенок. В основе теоретического обоснования данной гипотезы лежит утверждение, что толщина стенок капсул с течением времени постепенно возрастает вследствие осаждения и параллельного синтеза белка внутрикапсульной саркоплазмы. Рост стенок капсул вокруг идёт изнутри к периферии, о чём свидетельствует незначительное (5,5%) уменьшение площади внутрикапсульной саркоплазмы и одновременное утолщение стенок капсул (более чем в два раза) [6, 52].

Процесс изменения капсул в мышцах плотоядных обычно заканчивается через 6-7 лет после заражения, после чего развивается частичное обызвествление за счёт отложения солей на полюсах или в середине капсул. Однако личинки в частично обызвествлённых капсулах еще долго сохраняют инвазионность. Сроки обызвествления капсул вокруг личинок трихинелл зависят от вида гельминта и степени его адаптации к хозяину. С гибелью личинки рост капсулы прекращается, и она вместе с паразитом фагоцитируется [91].

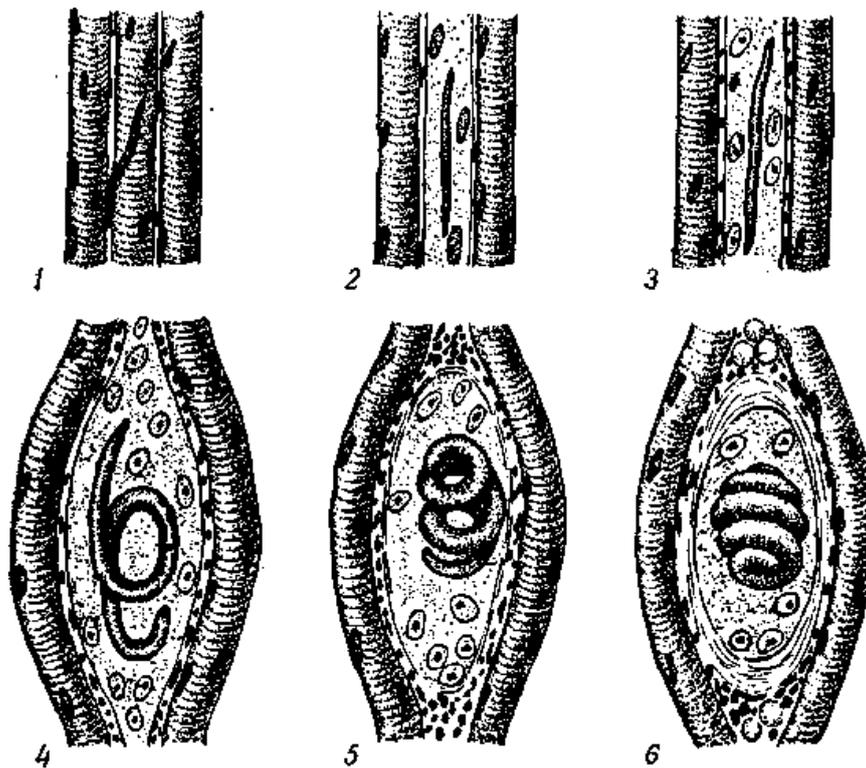


Рисунок 7 - Схема развития личинки трихинеллы и формирования соединительнотканной капсулы вокруг нее в скелетных мышцах



Рисунок 8 - Сформированные капсулы

В наружном слое капсулы развивается капиллярная сеть и капсула обильно снабжается кровью. У противоположного полюса капсулы капилляры собираются в венозный сосуд, выносящий кровь.

Вокруг личинок с участком саркоплазмы формируется соединительнотканная капсула особого строения с сосудистой сетью и чувствительными нервными окончаниями. Такая капсула служит биологической полупроницаемой мембраной, через которую происходит поступление из крови питательных веществ и удаление из-под капсулы продуктов метаболизма личинки. Капсула защищает паразита от фагоцитоза и антител, которые появляются в крови хозяина. В сформированных капсулах исчезает острое воспаление и появляется снова вокруг них лишь перед гибелью личинок или при их «старении». Это происходит, как мы считаем, в результате снижения физиологической активности паразита. Воспалительный процесс уничтожает капсулу и инкапсулированную саркоплазму вместе с личинкой. Подобная гибель части инкапсулированных и еще не инкапсулированных личинок трихинелл наблюдается всегда в разные сроки заражения у разных видов животных и человека [73].

Специфическое строение капсул имеют все личинки гельминтов, паразитирующие в тканях. Чем лучше адаптирован паразит к тканевому паразитизму, тем специфичнее строение его капсулы и тем меньше в ней признаков острого воспаления или они совсем отсутствуют [15].

В процессе эволюции тканевых паразитов происходит отбор по линии приобретения способности подавлять и извращать защитные реакции хозяина, используя их для формирования капсулы особого строения, обеспечивающей существование паразитов в тканях. Адаптации же хозяев идут по линии совершенствования неспецифических и специфических защитных механизмов против различных паразитов. Паразиты в широком понятии оказывают огромное влияние на эволюцию животного мира в направлении возникновения и совершенствования иммунитета.

Инкапсулированные личинки трихинелл обычно живут длительное

время (годы), но на определенном этапе их капсулы начинают постепенно кальцифицироваться. Начало отложения солей кальция происходит в утолщенных гиалиновых полюсах, распространяется затем на всю капсулу и приводит личинку в конце концов к гибели. В мышцах белых мышей и крыс четкие следы кальция на полюсах еще сравнительно небольшого числа капсул личинок трихинелл можно отметить через 14—16 месяцев после заражения [61].

Кальцификация капсул обычно начинается в жевательных мышцах и протекает быстрее, чем в других мышечных группах. Через два года после заражения кальций пропитывает всю капсулу. На разрезе жевательной мышцы крысы кальцифицированные капсулы бывают хорошо видны простым глазом в виде белых точек. Процесс кальцификации капсулы личинок происходит неодновременно. Сначала кальций откладывается в единичных капсулах, и только постепенно, в течение длительного времени, в процесс вовлекаются другие [55].



Рисунок 9 - Кальцифицированные капсулы трихинелл в массеторах крысы

У разных видов хозяев капсулы личинок трихинелл отличаются своими

размерами. Это зависит в основном от толщины мышечных волокон. Личинки трихинелл также имеют неодинаковые размеры у разных видов млекопитающих. Наименьшая длина личинок трихинелл отмечается у мышей и кошек, а наибольшая — у человека. В данном случае возникают лишь временные адаптации. Количество осевших в скелетных мышцах трихинелл зависит от интенсивности кровоснабжения. К наиболее интенсивно работающим мышцам притекает больше крови, а, следовательно, и заносится больше мигрирующих личинок. Даже в одной мышце трихинеллы обычно распределяются гнездными очагами и неравномерно [82].

У разных видов млекопитающих одни и те же группы мышц имеют неодинаковое кровоснабжение в результате различной физической нагрузки, а поэтому и распределение личинок в мышцах происходит по-разному и зависит от интенсивности их кровоснабжения [8].

В организме разных видов хозяев кальцификация капсул, по-видимому, происходит в различные сроки после заражения. По данным В. А. Бритова (1962), при экспериментальном заражении собак трихинеллезом отложение кальция в капсулах личинок наблюдается лишь спустя 5 лет [6].



Рисунок 10 - Обызвествленные капсулы трихинелл

При исследовании мышц животного с давним заражением можно встретить все стадии кальцификации — от капсул, совершенно лишенных кальция, до полной их кальцификации, содержащих как живых, так и погибших личинок трихинелл. Иногда на полюсах капсул отмечается появление массивных кальцификатов. В этих случаях кальцифицированная капсула приобретает неправильное очертание. В редких случаях наблюдается выпадение зерен кальция в инкапсулированном участке саркоплазмы. После гибели личинок они также часто подвергаются кальцификации [72].

1.3 Виды и генотипы нематод рода *Trichinella*

В дикой природе трихинеллёз распространён повсеместно, от Северного полюса до южной оконечности Африканского континента, синантропные очаги трихинеллеза также зарегистрированы во многих странах мира.

Последние два десятилетия, в связи с применением современных биохимических (аллоэнзимный анализ) и молекулярно-биологических методов (анализ последовательностей ДНК), происходила ревизия таксономии нематод рода *Trichinella*. Было показано, что генетические отличия обуславливают важные биологические изменения, зависящие также от видовой принадлежности хозяина трихинелл, от географического ареала распространения этого зооноза и трофических связей в биоценозах [26].

Характеристика видов трихинелл базируется на нескольких основных критериях: наличие и сроки развития капсулы, индекс репродуктивной способности у мышей, крыс и свиней, продукция самками новорожденных личинок, резистентность к замораживанию, число уникальных аллоэнзимных маркёров, патогенность для человека, генетическая изоляция с другими видами трихинелл. Однако большинство морфологических и биологических характеристик трихинелл мало отличаются друг от друга, являются общими для рода *Trichinella* [6, 34, 79].

В процессе филогенеза трихинеллы выработали различные механизмы защиты от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды: иммунной системы хозяина, физических воздействий, гниения и др. Наличие или отсутствие коллагеновой капсулы, окружающей личинку, существенно влияет на жизнеспособность трихинелл в замороженном или гниющем трупе. Все личинки первой стадии проникают в мышечное волокно и вызывают перестройку его структуры. При этом личинки видов трихинелл, образующих капсулу, способны вызывать в питающей клетке образование коллагена 1V и V1 типов, в то время как трихинеллы, не образующие капсулу в мышечных волокнах, не вызывают синтез коллагена [69].

Способность вызывать синтез коллагена в питающей клетке и неспособность к этому процессу, является ключевым фактором в образовании двух линий в филогении трихинелл. Основываясь на молекулярно-генетических различиях геномов трихинелл и способности (или неспособности) вызывать синтез коллагена в питательной клетке мышечного волокна хозяина, четко выделяются две линии в филогении трихинелл. Вид *T. pseudospiralis* является наиболее примитивным в роде *Trichinella*.

Вероятно, вид бескапсульных трихинелл является филогенетически более древним, о чём свидетельствует обнаружение личинок *T. pseudospiralis* в мышцах хищных сумчатых животных и птиц Австралийской зоогеографической области [34].

Анализируя геномы более чем 300 изолятов трихинелл от людей, домашних и диких животных из разных стран мира, исследователи подтвердили объективность новой таксономии. Таким образом, в настоящее время Всемирной Организацией Здравоохранения признано обоснованным существование 9 видов трихинелл, причём 5 из них соответствуют ранее идентифицированным видам: *Trichinella spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4), *T. nelsoni* (T7). Генотипы: T 5, T 6 и T 8 (и т. д.) пока не получили общепризнанного таксономического статуса, поскольку использование в качестве видообразующего и практически единственного

критерия особенности нуклеотидного состава ДНК и РНК вышеуказанных генотипов трихинелл является не корректным.

На территории РФ, согласно международной классификации, циркулируют 4 вида трихинелл: три капсулообразующих *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, и один бескапсульный - *T. pseudospiralis*.

Современные молекулярно-биологические методы позволяют устанавливать генотип при анализе отдельно каждой личинки, что, в свою очередь, позволяет выявлять наличие смешанной инвазии в одном хозяине при постановке мультиплексной ПЦР [34].

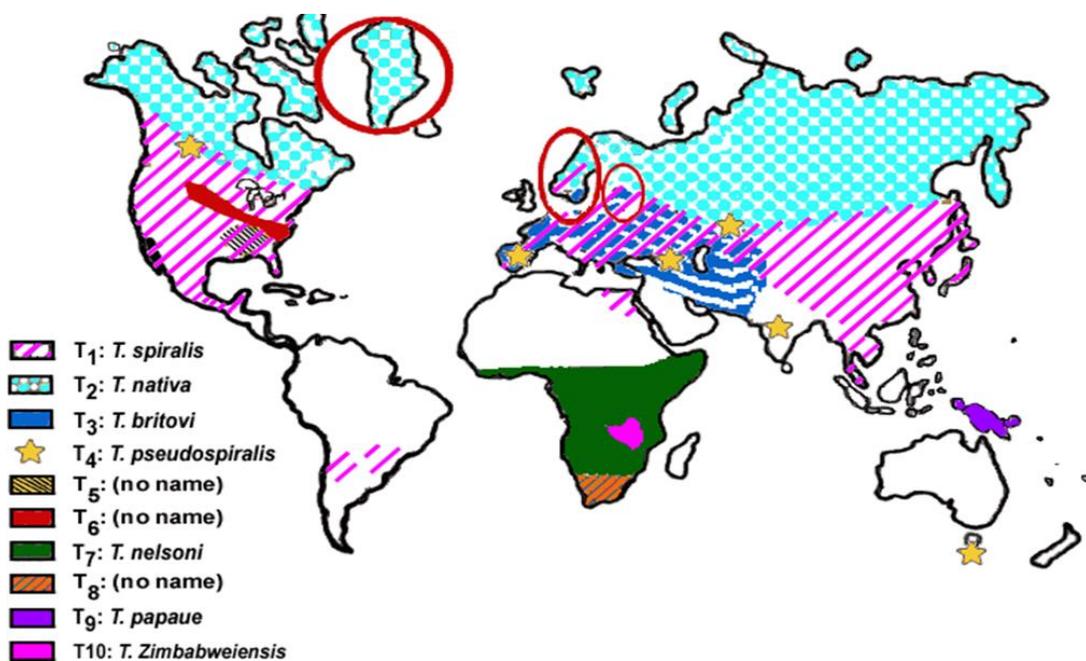


Рис. 11 – Географическое распространение

Таблица 1

Виды или генотипы	Географическое распространение	Хозяева	Основные источники заражения человека
Капсульные формы			
<i>T. spiralis</i>	космополит	домашние и дикие млекопитающие	домашние и дикие свиньи, лошади
<i>T. nativa</i>	арктическая и субарктическая зоны	Дикие плотоядные	медведи, моржи

	Европы, Азии и Америки		
<i>T. britovi</i>	умеренный пояс Европы и Азии, Северная и Восточная Африка	дикие млекопитающие, реже домашние свиньи	домашние и дикие свиньи, лошади, лисы, шакалы
<i>T. nelsoni</i>	Юго-восточная Африка	дикие млекопитающие	дикие свиньи
<i>T. murrelli</i>	США и Южная Канада	Дикие плотоядные	медведи, лошади
<i>Trichinella</i> genotype T6	Северная Америка (Канада, Аляска, Северо-Запад США)	Дикие плотоядные	плотоядные
<i>Trichinella</i> genotype T8	Южная Африка и Намибия	Дикие плотоядные	нет данных
<i>Trichinella</i> genotype T9	Япония	Дикие плотоядные	нет данных
<i>Trichinella</i> genotype T12	Аргентина	пума	нет данных
Бескапсульные формы			
<i>T. pseudospiralis</i>	космополит	Дикие млекопитающие и птицы, домашние свиньи	домашние и дикие свиньи
<i>T. papuae</i>	Папуа Новая Гвинея, Таиланд	дикие свиньи, крокодилы	дикие свиньи
<i>T. zimbabwensis</i>	Зимбабве, Мозамбик, Эфиопия, Южная Африка	Нильские крокодилы, вараны	нет данных

1.3.1 *Trichinella spiralis* (генотип T1)

Данная разновидность трихинелл является космополитом, встречается на всех материках, кроме Антарктиды. Столь широкое распространение

паразита и его хозяев (домашние и синантропные животные: свиньи, крысы, кошки, собаки и пр.), несомненно, связано с перемещениями людей по земному шару. В определённой степени способствовали распространению *Trichinella spiralis* войны, колонизация Северной, Центральной и Южной Америки, Новой Зеландии, Гавайев и Египта и др. стран европейцами.

Отличительной особенностью *Trichinella spiralis* по сравнению с другими видами трихинелл является высокая степень адаптации к обитателям синантропного биоценоза – свиньям, крысам, домашним плотоядным животным и человеку. Высокая вирулентность, тяжесть патологического процесса для человека, характерная при инвазировании данным видом трихинелл, обусловлена наивысшим уровнем плодовитости самок *T. spiralis*. Очень длинная матка у самок этого вида (по сравнению с другими видами) является важным морфологическим признаком, и, несомненно, коррелирует с индексом плодовитости, количеством произведённых женскими червями новорожденных личинок. Большинство смертельных случаев при заражении вышеуказанным видом трихинелл обусловлено именно внедрением огромного числа мигрирующих личинок в ткани хозяина, расплавлению мышечных волокон, образованию обширных инфильтратов, возникновением аллергических реакций [28].

Ограничивает распространение вида *T. spiralis* в северных широтах сравнительно низкая устойчивость к замораживанию, хотя, согласно последним данным, проявление этой физиологической особенности во многом зависит от степени взаимной адаптации паразита и хозяина.

Генотип Т 1 достаточно часто встречается и в природных биоценозах – в качестве хозяев данного вида трихинелл в разных странах мира зарегистрированы многие дикие животные: барсуки, лисицы, енотовидные собаки, пумы, рыси, волки, медведи, мышевидные грызуны и др. млекопитающие. Как правило, заражение данным видом происходит через тушки убитых животных, отходы свиноводства и прочие антропогенные факторы [36].

1.3.2 *Trichinella nativa* (генотип T2)

Данный вид трихинелл занимает обширный ареал в природных биоценозах, расположенных выше 40 параллели Голарктической области Евразийского и Северо-Американского материков. Основными хозяевами этого вида трихинелл являются наземные и водные плотоядные животные, в мышцах которых вышеуказанные гельминты сохраняют свою жизнеспособность и инвазионность в течение всей жизни хозяина, порой более 20 лет [19].

На территории РФ очаги «природного» трихинеллёза зарегистрированы повсеместно, от арктических широт до предгорий Северного Кавказа. Наибольшая экстенсивность инвазии у животных и человека зарегистрирована в районах Крайнего Севера, что обусловлено главной биологической особенностью *T. nativa* – способностью инвазионных личинок, находящихся в мышечной ткани замороженных трупов плотоядных животных, в течение длительного времени сохранять жизнеспособность и вирулентность.

Существенным морфологическим отличием *T. nativa* от других видов трихинелл является значительно более короткая длина матки у половозрелых самок, и, как следствие, более низкая плодовитость нематод этого вида. Кутикула личинок плотная, желтовато-матовая, из-за чего внутренние органы просматриваются с трудом [33].

Конфигурация капсул вокруг личинок *T. nativa*, находящихся в мышцах плотоядных животных, преимущественно сферическая, утолщено-овальная или округлая [6, 59].

При продолжительном времени нахождения капсул в мышцах животного-хозяина изменяется в сторону увеличения толщина стенки капсулы, на полюсах скапливаются жировые клетки.

Значительное утолщение стенок капсул порой приводит ухудшению обмена веществ между внутрикапсульной саркоплазмой и мышечным волокном, на полюсах и в середине капсулы начинают откладываться соли

кальция. Однако даже в обызвествлённых капсулах достаточно часто встречаются жизнеспособные личинки.

При попадании трихинелл данного вида в организм неспецифического хозяина (дом. свиньи, кабана, крысы), происходит развитие кишечных трихинелл по классической схеме, самки отрождают личинок, последние мигрируют по организму, но начинают гибнуть уже на ранней мышечной фазе, при этом в мышцах хозяина происходит мощная воспалительная реакция, и, как следствие, резорбция личинок. Морозостойкость личинок *T. nativa* также зависит от вида животного-хозяина. Так, в условиях эксперимента, личинки трихинелл в мышцах белого медведя сохраняли свои инвазионные свойства при -18 С в течение 5 лет, а в мышцах лабораторных грызунов гибли за несколько дней [27].

Основным резервуаром трихинеллёза в природных биоценозах на территории РФ являются дикие плотоядные животные: лисицы, енотовидные собаки, песцы, россомахи, волки, бурые и белые медведи, рыси, куницы, хорьки, горностаи, норки и др. Ключевое место в передаче инвазионного начала, несомненно, играют замороженные трупы животных-трихинеллоносителей. Именно способность личинок *T. nativa* в течение длительного времени сохранять инвазионность в тушках животных в условиях суровой зимы обеспечивает эпизоотическую напряжённость в существующих очагах природного трихинеллёза.

1.3.3 *Trichinella britovi* (генотип Т 3)

Трихинеллы данного генотипа занимают самый обширный географический ареал в природных биоценозах умеренных областей Палеарктической области Евразийского континента, от Пиренейского полуострова до Дальнего Востока, а также несколько изолятов вышеуказанного вида выделены из природных очагов трихинеллёза на Севере и Западе Африки. Изучая биологические особенности *T. britovi*, учёные пришли к выводу, что данный вид является как бы промежуточным между *T.*

spiralis и *T. nativa*. Основными хозяевами *T. britovi* являются дикие плотоядные животные: лисицы, бурые медведи, волки, шакалы, тигры, камышовые коты, енотовидные собаки, хорьки, гиены, барсуки, куницы. К кабанам, крысам и свиньям *T. britovi* слабо адаптированы (как и *T. nativa*). При экспериментальном заражении свиней отмечено, что на кишечной стадии происходит нормальное развитие половозрелых трихинелл. Самки содержат в матках оплодотворённые яйцеклетки на разных стадиях эмбриогенеза и свободных от яичевой оболочки личинок. На ранней миграционной стадии при попадании личинок в мышцы включаются механизмы клеточного иммунитета, к 30 дню вокруг личинок образуются обширные зоны клеточной инфильтрации, капсулообразование вокруг живых личинок затормаживается [36].

Полный распад личинок в тканях вышеуказанных животных происходит через 1,5-2 месяца после заражения. Через три месяца в мышечной ткани можно обнаружить только мумифицированных паразитов в типичных гранулёмах. Поэтому диагностировать инвазию *T. britovi* у диких кабанов, как правило, удаётся только в течение непродолжительного времени, чаще в зимний период, когда идёт массовый отстрел пушных зверей и тушки убитых плотоядных становятся доступными для этих всеядных животных [29].

Таким образом, в циркуляции *T. britovi* в природных биоценозах основная роль принадлежит хищникам, передача инвазии происходит преимущественно по цепи хищник- жертва, а некрофагия имеет меньшее значение, поскольку способность переживать отрицательные температуры у данного вида трихинелл несколько выше, чем у *T. spiralis*, но ниже, чем у *T. nativa*. Так, в замороженных мышцах лисицы личинки *T. britovi* сохраняли жизнеспособность в течение 11 месяцев, но при пассировании на лабораторных крысах и мышах утрачивали это свойство и гибли через 3-5 суток. По данным ВОЗ, этот вид трихинелл был причиной трёх вспышек человеческого трихинеллёза в Западной Европе, когда от конины, поступившей в продажу из Югославии, заразилось население в Италии,

Франции и Испании. Источник инвазивирования лошадей до сих пор точно не выяснен, но возможно заражение произошло при участии механических передатчиков трихинеллёза - беспозвоночных животных или помёт птиц [11].

1.3.4 *Trichinella pseudospiralis* (генотип T4)

Данный вид бескапсульных трихинелл является космополитом, обнаружен во многих странах Европы, Азии, Северной Америки. (дать карту) К настоящему времени в качестве животных – хозяев *T. pseudospiralis* в мире зарегистрировано 14 видов млекопитающих и 7 видов птиц. В России вспышки трихинеллёза, вызванные этим видом трихинелл, были зарегистрированы среди населения Камчатки, Краснодарского края, Дальнего Востока, Тульской области [56].

Главными биологическими особенностями *T. pseudospiralis* являются 3 фактора: отсутствие коллагеновой капсулы вокруг мышечной личинки, способность заражать не только млекопитающих, но и птиц, примерно на 1/3 меньшие размеры новорожденных и половозрелых гельминтов по сравнению с другими видами трихинелл. Потенциал воспроизводства у данного вида трихинелл меньше, чем у *T. spiralis*, но выше, чем у *T. britovi* и *T. nativa*, устойчивость к замораживанию – низкая [41].

1.4 Смешанные трихинеллезные инфекции

Согласно международной базе данных ITRC, из 7296 выявленных на данный момент изолятов трихинелл на Европейском континенте было обнаружено 209 (2,86%) смешанных инфекций. Наиболее распространенной смешанной трихинеллезной инфекцией было видовое сочетание *T. spiralis/T. britovi*, выявленное у 100 животных. Смешанная трихинеллезная инфекция *T. nativa/T. britovi* была обнаружена у 83 животных; *T. spiralis/T. nativa* у 10 животных; *T. spiralis/T. pseudospiralis* у 6 животных; *T. nativa/T. pseudospiralis* у 5 животных; *T. britovi/T. pseudospiralis* у 4 животных; и тройная инфекция *T.*

spiralis/T. nativa/T. britovi у 1 животного [43].

1.5 Восприимчивые к трихинеллезу животные

Известно, что в качестве хозяев выступают три класса позвоночных: млекопитающие, птицы и рептилии.

Млекопитающие являются наиболее важными хозяевами, поскольку все виды трихинелл способны развиваться в этом классе позвоночных. Естественные трихинеллезные инфекции были описаны более чем у 150 видов млекопитающих, принадлежащих к 12 отрядам, таким как: Сумчатые, Насекомоядные, Беззубые, Рукокрылые, Лагоморфные, Грызуны, Китообразные, Плотоядные, Периссодактилы, Парнокопытные, Тилоподы и Приматы) [17, 57].

Эпидемиология инфекции сильно варьируется в зависимости от вида и таких характеристик, как рацион питания, продолжительность жизни, распространение, поведение и отношения с людьми. Как сообщалось выше, неинкапсулированный вид *T. pseudospiralis* является единственным видом этого рода, заражающим как млекопитающих, так и птиц. Два дополнительных неинкапсулированных вида, *Trichinella papuae*, обнаруженные у диких свиней и морских крокодилов Папуа - Новой Гвинеи, и *Trichinella zimbabwensis*, обнаруженные у выращиваемых на фермах нильских крокодилов в Зимбабве, могут завершить свой жизненный цикл как у млекопитающих, так и у рептилий. Насколько нам известно, *T. papuae* и *T. zimbabwensis* являются единственными известными паразитами, которые завершают весь свой жизненный цикл независимо от того, каким является хозяин - теплокровным или холоднокровным. Это говорит о том, что эти два вида *Trichinella* способны активировать различные физиологические механизмы в зависимости от конкретного класса позвоночных, в котором они находятся [15].

1.6 Эпидемиология

1.6.1 Трихинеллез людей

Люди заражаются трихинеллезом при употреблении сырого мяса или мясных продуктов от домашних (свиней и лошадей) или диких (броненосец, барсук, черный медведь, бурый медведь, белый медведь, пума, лиса, лошадь, шакал, морж, бородавочник, кабан) животных [23].

Большинство инфекций вызывается свининой, за которой следует мясо дикого кабана и продукты его переработки. Также в литературе описывались случаи заражения от черепахи с мягким панцирем служащей источником инфекции *T. rariae* у людей в Восточной Азии и мясо нильского крокодила в Зимбабве.

На глобальном уровне с 1986 по 2009 год было зарегистрировано 65 818 случаев заболевания и 42 случая смерти из 41 страны. На Европейский континент пришлось 86% случаев (56 912), из которых 28 564 (50%) произошли в Румынии, главным образом в 1990-1999 годах. Сегодня трихинеллез является редким, но серьезным заболеванием человека, которое все еще присутствует на Европейском континенте. За последние 16 лет (2002-2017) в Европейском союзе было зарегистрировано 5518 случаев (от 101 в 2016 году до 867 в 2007 году) трихинеллеза [21].

Большинство случаев заболевания людей были зарегистрированы в нескольких европейских странах, главным образом в Восточной Европе, и были приобретены внутри страны. На тенденцию распространения трихинеллеза большое влияние оказывают количество и масштабы вспышек заболевания. Однако в последние годы число случаев и число уведомлений Европейского союза неуклонно снижаются [27].

Снижение было вызвано, главным образом, заметным сокращением числа случаев трихинеллеза, зарегистрированных за тот же период в Болгарии и Румынии, где в предыдущие годы наблюдалось большинство вспышек трихинеллеза. Основной причиной этого сокращения стало увеличение

поголовья свиней, выращенных в контролируемых условиях содержания, и сокращение поголовья свиней, выращенных в неконтролируемых условиях, помимо этого немалую роль сыграло обучение частных фермеров и усиление контроля при убое. Эти меры значительно сократили биомассу паразитов в домашней среде обитания и, следовательно, риск для людей, которые могли бы заразиться этой инфекцией. Однако пик заболеваемости трихинеллезом в январе и феврале отражает потребление различных продуктов из свинины на Рождество, а также сезонность охоты на диких кабанов. В среднем одна треть подтвержденных случаев трихинеллеза человека была зафиксирована без летальных исходов [38, 66].

1.6.2 Трихинеллез домашних свиней

Трихинеллезная инфекция, особенно заражение *T. spiralis* домашних свиней, как правило, возникает в следствии отсутствия у людей надлежащих знаний в области механизмов передачи и особенностей жизненного цикла паразита. Чаще всего трихинеллезом поражаются свиньи, владельцы которых используют методы ведения сельского хозяйства с высоким риском. К ним относятся преднамеренное скармливание пищевых отходов, которые могут содержать свиные обрезки, или непреднамеренное контактирование туш мертвых свиней или зараженных диких животных; а также незащищенный выпас на свободном выгуле [23, 83].

При использовании подобных методов ведения сельского хозяйства и отсутствия надлежащего контроля мелких свинокомплексов, вероятность передачи инфекции *Trichinella spp* крайне велика. Передаче инфекции в синантропном биоценозе также способствует свободный выпас свиней, скармливание им тушек диких животных и отбросов охотничьего промысла, а также использование на зверофермах туш убитых пушных зверей в качестве корма. Взаимодействие охотников и то, как они обращаются с тушами диких животных, а также практика разведения свиней на свободном выгуле и/или

приусадебном участке в совокупности способствуют распространению инфекции *Trichinella spp* [34].

Заражение трихинеллезом никогда не фиксируется у свиней, выращенных в условиях высокой изоляции, и риск заражения, в основном, связан с несоблюдением правил обращения с отходами животноводства. В последние десятилетия во многих странах проводятся расследования с целью выявления источников трихинеллезной инфекции у домашних свиней [34].

Международная свиноводство является одним из крупнейших рынков животноводства в мире. Однако за последние 20 лет было зарегистрировано всего восемь сообщений о незаконном ввозе свиного мяса в личном багаже в другую страну, где оно было источником трихинеллеза у людей или случайно было проверено на наличие личинок *Trichinella spp* [6, 34].

В России большинство свиней подвергаются официальному контролю мяса при убойе в соответствии с Приказ МСХ № 258 «Об утверждении Правил определения зоосанитарного статуса свиноводческих хозяйств, а также организаций, осуществляющих убой свиней, переработку и хранение продукции свиноводства», однако только свиньи, забитые для собственного домашнего потребления в личных фермерских хозяйствах, не подпадают под действие данного приказа. В 2014 году в общей сложности 186 миллионов свиней были протестированы на трихинеллез из примерно 246 миллионов выращенных свиней, при этом положительный результат имели только 184 особи, т.е. 0,7 на миллион выращенных свиней [17].

После пика в начале девяностых годов заражения трихинеллезом домашних свиней, а следовательно, и диких животных, которые питались свиными обрезками и субпродуктами, разбросанными людьми в окружающей среде, распространенность среди свиней сильно снизилась, из-за внедрения контролируемых условий содержания, и достигла плато. Распространенность паразита является недооценённой, поскольку количество свиней, находящихся в свободном выгуле и на приусадебном участке, из отдаленных регионов России не контролируется ветеринарными службами. К сожалению

существует порочный круг между необразованными и малообеспеченными людьми, проживающими в отдаленных регионах, безответственностью местных ветеринарных служб и появлением трихинеллеза у домашних животных.

1.6.3 Трихинеллез лошадей

С 1975 по 2005 год, когда были задокументированы первая и последняя вспышки трихинеллеза, вызванные потреблением конины, было зарегистрировано 15 вспышек трихинеллеза у людей во Франции (восемь вспышек, 2296 случаев инфицирования людей с пятью смертельными исходами в 1985 году) и Италии (семь вспышек, 1038 случаев инфицирования людей) в результате потребления конины, импортируемой из стран Восточной Европы (Бывшая Югославия, Польша, Сербия, Румыния) или из Северной Америки [34].

В период с 1988 по 2008 год личинки трихинелл (в основном *T. spiralis*) были обнаружены у 12 импортированных лошадей во Францию и Италию из стран Восточной Европы (Польша, Румыния, Сербия, Бывшая Югославия) из примерно 250 000 протестированных проб от лошадей в год [35].

С 2006 года в Европейском Союзе тестирование свежей конины, произведенной в ЕС или импортированной в ЕС, является обязательным в соответствии с Постановлением Комиссии 2075/2005 (Европейский Союз, 2005). За последнее десятилетие только у четырех лошадей в ЕС был положительный результат (в 2008, 2010 и 2012 годах) из более чем миллиона протестированных животных.

В 2012 году личинки *T. murrelli* были обнаружены у лошади, импортированной из США и забитой в Канаде (Scandrett и др., 2018). Эта чрезвычайно низкая (<0,001%) распространенность может быть связана со значительным сокращением случаев заражения трихинеллезом у домашних свиней, поскольку свиные отходы и субпродукты были основным источником

инфекции для лошадей [32].

В настоящий момент на территории Российской Федерации действует Приказ Министерства Сельского Хозяйства №154 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов трихинеллеза», согласно которому каждая партия конины подлежит обязательной проверке на трихинеллез.

1.6.4 Трихинеллез диких животных

Дикие млекопитающие служат основными резервуарными хозяевами, и роль дикой природы подчеркивается биомассой паразитов, которая больше у диких, чем у домашних животных, в отличие от других инфекций нематод, поражающих как лесных, так и домашних животных. Эти зоонозные паразиты циркулируют среди диких животных на большей части Европейского континента [28].

На распространенность трихинеллезных инфекций у диких животных также влияет поведение человека и методы выращивания животных, которые способствуют передаче этих патогенов из домашней среды обитания в лесную путем распространения свиных и охотничьих отходов и субпродуктов.

В Российской Федерации за последние годы распространенность трихинеллезной инфекции снизилась в 3 раза (с 0,13% в 2012 году до 0,04% в 2016 году) в популяции диких кабанов и в 2 раза (с 2,43% в 2012 году до 1,12% в 2016 году) в популяции рыжей лисицы [25].

Неконтролируемая охотничья деятельность играет важную роль в распространении трихинеллеза диких животных. Распространенность данной инфекции у диких животных, кроме диких кабанов, была выше у медведей, рысей, енотовидных собак и волков, но на ее распространенность также влияют характеристики окружающей среды и поведение человека.

Плотоядные млекопитающие, находящиеся на вершине пищевой цепи и имеющие большую продолжительность жизни, чем у других животных, более подвержены заражению (например, рыси, волки, медведи), однако численность популяции и распространение этих животных в России, как правило, ограничены.

Рыжих лисиц, с гораздо более многочисленной и широко распространенной популяцией, можно рассматривать в качестве основных естественных резервуаров для этих патогенов. Более низкая распространенность инфекции у рыжих лисиц (1,12%), чем у других плотоядных животных, вероятно, связана с миграцией этого млекопитающего в населенные районы, где оно питается в основном отходами, образующимися в результате деятельности человека, где *Trichinella spp* не передается. Из этого следует, что только процент протестированных лисиц происходит из регионов, где циркулируют *Trichinella spp* [42].

Увеличение численности диких кабанов и рыжих лисиц, а также распространение енотовидной собаки могут увеличить распространенность трихинеллеза, циркулирующего среди диких животных [19]. Поэтому важно продолжать просвещать охотников и других лиц, употребляющих в пищу дичь, о риске употребления недоваренного мяса.

1.7 Влияние окружающей среды на *Trichinella spp*

Важной адаптацией, облегчающей передачу мышечных личинок *Trichinella spp*, является физиологический механизм выживания в разлагающихся тушах; поскольку чем больше сохраняется жизнеспособность личинок, тем выше вероятность быть проглоченными хозяином-падальщиком. Несмотря на индуцированный личинками ангиогенный процесс, который развивается вокруг клетки-кормилицы после проникновения личинки в мышечную клетку, ее метаболизм переходит в анаэробный, что способствует ее выживанию в разлагающихся тканях [20].

Фактически, инкапсулированные личинки *Trichinella spp* распространяются по организму-хозяину способом, аналогичным многим нематодам, которые откладывают яйца или свободноживущую стадию в воде или почве. *Trichinella spp* тоже имеют аналогичную свободноживущую стадию с популяциями личинок в коллагеновых капсулах в специальном биотопе - каркасе [26].

Эти популяции поддерживаются способом, присущем практически всем популяциям яиц гельминтов. На сохранение личинок в гниющей плоти также влияет окружающая среда: высокая влажность и низкие температуры способствуют выживанию, даже когда мышечная ткань полностью разжижена. Этот адаптивный механизм выживания является биологической характеристикой, проявляемой всеми таксонами рода *Trichinella*; однако выживание в тушах хозяев у инкапсулированных видов дольше, чем у неинкапсулированных [25, 81].

В естественном цикле развития паразита важность выживаемости личинок в тушах животных дополнительно подтверждается устойчивостью мышечных личинок к воздействию отрицательных температур в течение одного (*T.britovi*) или более лет (*T.nativa*) [34].

Анаэробный метаболизм, способствующий выживанию в гниющей плоти, наряду со способностью личинок некоторых видов выживать при замерзании, являются двумя отдельными механизмами, которые сильно увеличивают выживаемость личинок в природе. Наибольшая выживаемость трихинелл наблюдается при температурах от 0°C до -20°C. При более низких температурах время выживания сокращается, что позволяет предположить, что оптимальный температурный диапазон для выживания при низких температурах соответствует температуре под снегом [22]. Эта среда обитания была названа «субнивиумом». Субнивиум можно описать как среду обитания под снегом, которая обеспечивает экологическую стабильность. Более теплые и стабильные условия в пределах субнивиума в основном обусловлены продолжительностью, плотностью и глубиной снега [13].

1.8 Биологические свойства природных изолятов *Trichinella spp*

Трихинеллёз в природе распространён повсеместно, что связано с особенностями биологии этих тканевых гельминтов и их высокими приспособительными реакциями. Трихинеллы, имеющие капсулу, могут паразитировать у человека, всех млекопитающих животных и некоторых рептилий. Вид *Trichinella pseudospiralis*, характеризующийся отсутствием капсулы вокруг паразита, способен, кроме вышеперечисленных животных, заражать ещё птиц. В различных географических зонах России сложились определённые биоценозы, в состав которых входят и паразиты, в том числе нематоды рода *Trichinella*. При изучении эпидемиологии и эпизоотологии трихинеллёза основной проблемой является установление источников инвазии и путей её передачи [9, 78].

Исследования биологических особенностей трихинелл, осуществляющих онтогенез в организме одного животного-хозяина, позволили установить наличие генотипической и фенотипической изменчивости у этих тканевых гельминтов по отношению к некоторым млекопитающим, участвующим в циркуляции возбудителя в природных очагах трихинеллёза. Для тканевых гельминтов средой обитания является организм хозяина, поэтому фенотипическая изменчивость трихинелл наиболее ярко проявляется при инвазировании животного, не входящего традиционную трофическую схему циркуляции трихинеллёза в конкретном биоценозе. При этом часто смена фенотипических параметров выражается не только морфологически, но и в кардинальном изменении вирулентности, плодовитости, резистентности к неблагоприятным условиям, продолжительности паразитирования в организме хозяина и др.

В случае однотипных условий окружающей среды генетически обособленные виды могут иметь трудно различимые фенотипы, возникающие под действием естественного отбора, как вследствие соматических

модификаций, так и в результате генетических мутаций. Фенотипическая изменчивость трихинелл часто проявляется как полиморфизм и обусловлена генетической полигенностью рода *Trichinella* (что, несомненно, свидетельствует о филогенетической древности этих тканевых гельминтов). Дифференцировать вышеуказанные молекулярно-генетические события позволяют различные методы молекулярной биологии [10].

Для получения диагностикумов и препаратов протективного действия при трихинеллёзе, проведения молекулярно-биологических исследований, в числе и геномного том числе типирования встречающихся в России видов и изолятов трихинелл, требуются препаративные количества биомассы гельминтов. В связи с этим, важной задачей ученых является выделение изолятов капсульных трихинелл от различных видов диких млекопитающих, обитающих в географически обособленных зонах, и изучение их биологических свойств.

Так же для осуществления геномного типирования представителей рода *Trichinella*, циркулирующих на территории РФ, по мере поступления инвазионного материала, параллельно проводятся выделения мышечных личинок от спонтанно зараженных животных для создания банка ДНК трихинелл. Установление точной видовой принадлежности исследуемых изолятов капсулообразующих трихинелл (*Trichinella sp*) происходит методом геномного типирования и ПЦР [15, 66].

1.9 Профилактика трихинеллеза в звероводческих хозяйствах

Возбудителей трихинеллеза относят к природным очаговым биогельминтам, а кроме этого, еще и к синантропным, то есть круговорот случаев заболевания в местах обитания диких восприимчивых животных, птиц и переносчиков не прекращается. Данный факт свидетельствует о возможности передачи трихинелл от диких животных домашним и вспышках очагов трихинеллеза в хозяйствах. Главными путями передачи возбудителя

данного заболевания является попадание личинок в организм животных в результате поедания трупов зараженных животных и птиц, каннибализма и хищнический способ питания.

Также одной из основных проблем в области распространения трихинеллеза является охотничья деятельность людей. Так как мясо от отстреленной дичи охотники зачастую не отправляют в лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы для проверки на наличие личинок трихинелл и могут употреблять плохо прожаренное зараженное мясо, не подозревая об этом. Такие ситуации могут привести к массовым вспышкам трихинеллеза у людей. Главными носителями трихинеллезной инвазии из диких промысловых животных являются кабаны, медведи, барсуки, лисы, волки и енотовидные собаки [34].

Кроме диких промысловых животных в круговороте трихинеллеза играть большую роль также могут пушные животные в звероводческих хозяйствах. В основном, к заражению всего поголовья зверей могут привести не соблюдение ветеринарных требований и нарушения технологии изготовления кормов нетрадиционного происхождения, в составе которых имеются компоненты животного происхождения, и, вообще, включение такого корма в рацион. На сегодняшний день большие звероводческие хозяйства отошли от использования нетрадиционных кормов, но такая практика продолжается по сей день в небольших частных фермах.

К трихинеллезу также восприимчивы некоторые морские млекопитающие животные, к их числу относятся морж, тюлень и кит, а, следовательно, скармливание пушным животным корм, изготовленный с использованием мяса этих восприимчивых животных, считается небезопасным.

При убойе зверей для производства пушнины обязательному ветеринарно-санитарному контролю подлежат не только меха, но и тушки убойных пушных зверей, так как от пораженных тушек могут заразиться личинками трихинелл и другие обитатели зверофермы, например, крысы,

мыши, собаки и кошки. Заражение домашних животных, которые постоянно находятся в контакте с человеком, создает опасность значительному числу людей и животных, что с легкостью может привести к массовым вспышкам и закреплению устойчивого очага заболевания [8].

Последние несколько лет набирает обороты направление разведения нутрий и их реализация на мясо и мех. Данные животные также болеют трихинеллезом и являются источником распространения данного заболевания (человек заражается при поедании недостаточно термически обработанного мяса нутрий, что происходит довольно часто). Заражение самих нутрий чаще всего происходит в мелких подсобных хозяйствах, так как ветеринарно-санитарные требования по содержанию этих животных там урегулировать нет возможности. Научные исследования мяса нутрий из личных хозяйств уже проводились, и данный факт подтвердился.

Гаврилюк Н. Д. проводила исследования на трихинеллез нутрий в Украине из лично-подсобных хозяйств. Ею было изучено семь тушек нутрий, в результате исследований одна тушка оказалась инвазированной. Данный факт свидетельствует о том, что нутрии при различных дефицитах в организме и нарушениях рациона способны могут заразиться трихинеллезом, употребляя падаль от павших зараженных животных. Если после убоя зараженные тушки нутрий не будут выявлены, а после будут съедены людьми, то массовых вспышек заболевания людей не избежать [6].

Для установления статуса звероводческих ферм по трихинеллезу проводят исследования тушек убойных зверей с целью производства меховых изделий в количестве тридцати процентов от числа убитого поголовья. Самый распространенный и классический способ обнаружения трихинелл считается трихинеллоскопия под микроскопом с использованием компрессория, кроме данного метода может использоваться метод переваривания мышц в специальном аппарате с использованием желудочного фермента пепсина.

Для первого метода делают минимум 24 среза с мышечной ткани задних конечностей каждой исследуемой тушки и выкладывают на стекла

компрессориума, после чего рассматривают каждый срез в трихинеллоскопе. Преимуществом метода переваривания мышц в ИЖС перед обычной трихинеллоскопией является многочисленность исследуемых образцов и автоматизированность процесса, что исключает человеческий фактор, а значит, повышает точность метода.

Кроме послеубойной диагностики тушек зверьков наличие заболевания при жизни можно установить при помощи ИФА - иммуноферментного анализа и РП – реакции преципитации (в пробирке образуется кольцо) [5].

Самой основной мерой предупреждения заражения животных в звероводческих фермах является исключение из рациона питания зверей сырых зараженных мясных и рыбных компонентов. Кроме этого, должны соблюдаться ветеринарные, санитарные и профилактические мероприятия, в том числе своевременная дератизация в хозяйствах. При обнаружении очагов заболевания незамедлительно больных особей нужно изолировать от здорового поголовья, если есть павшие животные, то их трупы утилизировать и провести дезинфекцию клеток, также важно вовремя начатое лечение различных инвазионных и инфекционных болезней. В целях профилактики паразитарных заболеваний на зверофермах должны использоваться полы в виде сеток, а сами клетки должны быть возвышены от земли.

Кроме перечисленных профилактических мер для предотвращения трихинеллеза и других паразитарных болезней следует ликвидировать не только грызунов, но и беспризорных кошек и собак, которые также могут представлять опасность распространения трихинелл. Дератизацию следует проводить не только непосредственно на фермах, но и на производствах и складах комбикормов для пушных зверей.

При профилактике и ликвидации трихинеллезных очагов пользуются положениями документа «Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации заболеваний животных гельминтозами» [4].

Если на ферме был обнаружен возбудитель трихинеллеза, то первоначально оценивают обширность поражения личинками восприимчивых

животных. Затем накладывают либо ограничения, либо вводят карантин на пораженных хозяйствах, для того чтобы предотвратить возможность дальнейшего разнеса инвазии. Кроме того, соседние поселки и любые жилые дома, размещенные вблизи звероводческих комплексов, где произошла вспышка, подвергаются огромному риску распространения инвазии.

При получении меховых шкурок от пушных зверей их тушки (при наличии в мышечной ткани личинок) послужат материалом, распространяющим трихинеллез, так как пораженные тушки или какие-либо обрезки, остатки от них могут быть съедены бродячими животными и грызунами. Чтобы такой ситуации избежать и не допустить дальнейшего распространения трихинелл часть тушек пушных зверей обязательно подвергают ветеринарно-санитарному контролю на наличие личинок (от всего убойного поголовья количество исследуемых тушек составит 30 %).

Компрессорным методом будет очень сложно и долго исследовать такое количество образцов, поэтому разумнее исследовать эти образцы с помощью метода переваривания в ИЖС. Методы ИФА и РКПК позволят установить заболевание животного трихинеллезом при жизни.

Если в хозяйстве были выявлены случаи заболевания трихинеллезом, то в нем устанавливают следующие ограничения:

1. За пределы хозяйства или зараженного участка вывозить животных строго запрещено;
2. Кормовая база для пушных зверей подлежит основательному ветеринарно-санитарному контролю;
3. Поголовье пушных зверей не разрешается куда-либо перемещать, в том числе и из группы в группу;
4. Обязательной зачистке подвергают клетки и все конструкции для содержания животных, а также прилегающие территории;
5. Если зверек умер, то его тушку сначала безусловно подвергают исследованиям на наличие личинок трихинелл, а затем утилизируют;
6. Тушки пушных зверей не допускается использовать с целью

кормления других животных;

7. Проводится тщательная дератизация хозяйства, а также прилагаются всевозможные усилия для предотвращения проникновения бесхозных кошек и собак;
8. Рабочим и всем причастным к данному хозяйству людей, а также людям из ближайших населенных пунктов доносят информацию о возбудителе, способах заражения и распространении трихинеллеза.

Кроме перечисленных ограничений и мероприятий, направленных на борьбу с трихинеллезом, также в обязательном порядке должны соблюдаться ветеринарные и санитарные нормы по содержанию зверей. Их рационы должны быть безопасны и сбалансированы, условия размещения, площади шедов и клеток должны также соответствовать установленным нормам. Кроме всего прочего своевременно по графику должны проводиться профилактические и диагностические мероприятия.

Личные подсобные хозяйства и частные фермы по содержанию пушных зверей довольно часто территориально находятся на больших расстояниях от ветеринарных служб, а, следовательно, надлежащего надзора за данными объектами нет.

При условии, что если все установленные требования с целью предотвращения трихинеллеза соблюдаются рабочим персоналом на звероводческих предприятиях в совокупности, то такой ферме не угрожает вспышка данного инвазионного заболевания [45].

Если хотя бы одно условие будет не соблюдено, то, вероятнее всего, очаг заражения трихинеллами может возникнуть в этом хозяйстве. Особенно частой причиной источником заражения трихинеллами являются корма, изготовленные с нарушениями температурных режимов, и ненадлежащие состояние территорий фермы, так как бродячие и дикие зараженные животные могут проникнуть внутрь и послужить разносчиком болезни. При установлении факта заражения зверей трихинеллезом, строго обязательно накладывают ограничения или карантин в этом хозяйстве, проводят

лабораторные исследования на трихинеллез, и, помимо этого, должны соблюдаться все ограничительные меры, перечисленные выше.

1.10 Ветеринарно-санитарная экспертиза в системе мер борьбы с трихинеллезом

В Российской Федерации разработана и принята нормативно-правовая база документации, направленная на предотвращение и ликвидацию трихинеллеза, в базу входят следующие документы: «МУ Эпидемиологический надзор за трихинеллезом», «Ветеринарные правила осуществления диагностических, ограничительных и других мероприятий», «Правила ветеринарно-санитарной экспертизы мяса» и многие другие [3, 5, 6].

Данными документами строго обязательно пользуются во время ограничений и карантинных мер, так как благодаря следованию четким инструкциям и пунктам возможно не допустить дальнейшего распространения инвазии и пресечь очаг заболевания как можно скорее. В результате множества исследований эпидемиологических условий учеными-эпидемиологами главная роль в циркуляции и распространении трихинеллеза была отдана диким плотоядным и бродячим животным, восприимчивым к данному паразитарному заболеванию [3].

Домашние и дикие животные на территории Сибири, Кавказа и Дальнего Востока особо сильно подвержены трихинеллезной инвазии, так как на данных местностях замечена тенденция низкого уровня санитарной обстановки в личных свиноводческих хозяйствах и на фермах, кроме этого, несоблюдение ветеринарных требований к качеству и безопасности получаемого мяса от убойных свиней и других продуктов из них [5].

Благодаря наработкам и открытиям российских ученых - эпидемиологов за все годы по трихинеллезу удалось воедино объединить все полученные исследовательские данные, а также установить источники заболевания,

способы заражения личинками и выработать оптимальные меры по профилактике, предупреждению и ликвидации данной болезни.

За предшествующие годы удалось снизить случаи заражения домашних свиней и человека трихинеллезом только потому, что четко выполнялись установленные требования в области условий содержания свиней, их кормления и изготовления кормов, санитарной обстановки в хозяйстве, по графику проведенные мероприятия по уничтожению грызунов и другие [4].

Постановлением РФ № 987 «О государственном надзоре в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов» установлены требования по ветеринарно-санитарному контролю с целью обеспечения и проведения государственных проверок на соответствие хозяйств правилам санитарии и ветеринарно-санитарной экспертизы, а также ветеринарные органы должны осуществлять контроль безопасности и качественных показателей продуктов питания из свинины. Для того, чтобы ветеринарно-санитарные врачи качественно выполняли свою работу и в случае инвазии, обнаруживали зараженную продукцию, и не в коем случае не допускали в реализацию и переработку такое сырье, каждый год происходит модернизация трихинелоскопии и других способов обнаружения личинок трихинелл [2].

Заключение

На сегодняшний день число случаев трихинеллеза как зооноза во всем мире значительно сократилось, благодаря сокращению случаев заражения домашних свиней трихинеллами в развитых странах. Однако риск заражения все еще остается из-за продолжающегося присутствия большинства видов трихинелл в качестве паразитов диких животных. Кроме того, сильный оппортунизм, связанный с этим паразитом, с его широким разнообразием резервуарных хозяев и различными способами передачи, создает потенциал для его повторного появления всякий раз, когда контроль безопасности пищевых продуктов ослабевает вследствие социально-экономических событий в разных странах. Примерами могут служить вспышки трихинеллеза у лошадей в Европе и повторное заражение свиней в странах, переживающих серьезные политические и экономические изменения (например, бывшая Югославия, Румыния и Аргентина).

Органам государственной ветеринарной службы и здравоохранения надлежит в полном объеме ознакомиться с причинами повторного появления трихинеллезных инфекций в странах, где ранее успешные меры борьбы с данным зоонозом были поставлены под угрозу или серьезно скомпрометированы политическими, экономическими и сельскохозяйственными проблемами. Поэтому важно, чтобы систематика и экология всех видов *Trichinella*, включая как классических *T. spiralis*, так и нехарактерных для данного региона, были хорошо изучены.

Таким образом, в данном литературном обзоре особое внимание уделяется знаниям, полученным за последние годы в области базовой биологии, экологии и биогеографии *Trichinella spp.* Очевидно, что наши текущие знания об этих аспектах представляют собой лишь самое основное, относящееся к этим паразитам. В некотором смысле ученые всего мира находятся только в начале пути к полному знанию, и, безусловно, потребуются провести гораздо больше исследований, прежде чем пробелы будут заполнены.

Исследователи, занимающиеся изучением этих вопросов, могут рассчитывать на выполнение сложной задачи, но они также могут утешаться наличием хорошей платформы для развития, наличием молекулярных инструментов для генетического анализа и большой доступной коллекцией изолятов и биогеографических знаний, хранящихся в Международном Справочном центре по трихинеллам [79].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы и методы

Работа выполнена в департаменте ветеринарной медицины, Аграрно-технологического института Российского университета дружбы народов в период с 2021 по 2022 год.

Исследование биологически опасного биоматериала проводились в лаборатории иммунологии и молекулярных исследований под руководством заведующего, к.б.н. Одоевской И.М. на базе Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Материалом для исследования послужили две пробы, предоставленные ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН:

1. Пробы мышечной ткани, полученные от домашней свиньи, выращенной в условиях свободного выпаса в фермерском хозяйстве г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия. Свиная туша, заражённая трихинеллами была обнаружена при проведении ветеринарно-санитарной экспертизы сотрудниками государственной ветеринарной службы на центральном городском рынке г. Владикавказ. Вес доставленной в институт пробы - 1,400 г.

2. Пробы мышечной ткани, полученные от дикого кабана. Инвазия *Trichinella spp* была обнаружена при проведении ветеринарно-санитарной экспертизы продуктов охотничьего промысла сотрудниками государственной ветеринарной службы в Тернейском районе Приморского края, ДФО, Россия. Вес доставленной в институт пробы - 650 г.

Предоставленные пробы были транспортированы в институт паразитологии в замороженном виде.

Для проведения исследований каждая проба была подписана и разморожена при температуре от 0 до +4 °С. После размораживания пробы хранились в холодильнике при температуре от 0 до +4 °С. При размораживании тканевая жидкость (мясной сок) была собрана в пробирки типа «Эппендорф» для проведения серологических исследований.

Данные по используемому биоматериалу при проведении экспериментальной части выпускной квалификационной работы представлены в таблице 2.

Таблица 2

Используемые методы исследований	Инвазионный материал, предоставленный институтом паразитологии ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН	
	Мясо домашней свиньи, Северная Осетия	Мясо дикого кабана, Приморский край
Компрессорная трихинеллоскопия	Мышечные волокна	Мышечные волокна
Морфометрия капсул трихинелл	Капсулы мышечных личинок	Капсулы мышечных личинок
Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС	Декапсулированные личинки	Декапсулированные личинки
Таксономическая идентификация природных	Декапсулированные личинки	Декапсулированные личинки

изолятов трихинелл методом ПЦР		
Иммуноферментный анализ	Тканевая жидкость (мясной сок)	Тканевая жидкость (мясной сок)
Иммунохроматографический анализ	Тканевая жидкость (мясной сок)	Тканевая жидкость (мясной сок)

Экспериментальная часть выпускной квалификационной работы была проведена согласно следующей схеме:

1. Компрессорная трихинеллоскопия проводилась для визуализации наличия мышечных личинок *Trichinella spp* в исследуемом материале;
2. Измерение размеров капсул мышечных личинок и вычисление индекса их округлости проводились для изучения морфометрических особенностей природных изолятов трихинелл;
3. Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС проводилась для оценки морфологической целостности и жизнеспособности *Trichinella spp* в исследуемом материале;
4. Таксономическая идентификация природных изолятов трихинелл методом ПЦР была проведена для определения генотипа изучаемых изолятов *Trichinella spp* в исследуемом материале;
5. Иммуноферментный анализ был проведен для изучения диагностической эффективности существующих тест-систем при использовании мясного сока (тканевой жидкости), полученного из замороженного мяса.
6. Иммунохроматографический анализ проводился для оценки работоспособности современных коммерческих тест-систем.

Цифровой материал обрабатывался на компьютерах по методическим рекомендациям математического обеспечения эксперимента в животноводстве [31].

2.1.1 Компрессорная трихинеллоскопия и анализ морфометрических показателей капсул трихинелл

Метод компрессорной трихинеллоскопии основан на раздавливании участков мышечных волокон двумя прозрачными стеклами и последующем просматривании проб под увеличением. Измерение капсул проводится визуально с помощью окуляр-микрометра.

Материалом для исследования послужили:

1. Мышечная ткань, полученная от домашней свиньи.
2. Мышечная ткань, полученная от дикого кабана.

Компрессорная трихинеллоскопия была проведена согласно действующим Методическим указаниям по лабораторной диагностике трихинеллеза животных, принятым Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации 28 октября 1998 г.

Измерение капсул проводили с помощью окуляр-микрометра, увеличение составило 10 x 25, Индекс формы капсулы (форминдекс «V») вычисляли по общепринятой методике, как отношение диаметра «D» к её длине «L» ($V=D/L$).

Оборудование и приборы:

- стационарные и лабораторные проекционные устройства;
- электронный микроскоп Primo Star, ZEISS;
- световой микроскоп;
- окуляр-микрометр;
- объект-микрометр;
- компрессориумы;
- пинцеты медицинские;
- ножницы;

- резиновые перчатки.

Проведение исследований:

В каждой предоставленной нам для исследований пробе находились мышцы из трех участков туши: массеторы, мышцы диафрагмы и мышцы передних конечностей. Из каждой группы мышц изогнутыми ножницами по ходу мышечных волокон были сделаны 24 среза величиной с овсяное зерно, затем срезы помещались в середину клеточки компрессориума. Далее они накрывались вторым стеклом и завинчивались винты. Срезы раздавливались настолько, чтобы через них читался газетный текст. Всего было сделано по три компрессориума на каждую исследуемую пробу, полученную от свиньи и кабана.

После заполнения всех компрессориумов каждый срез тщательно просматривался в электронном микроскопе под малым увеличением (8x10). На этом этапе важно достоверно отличать инкапсулированные личинки от пузырьков воздуха и жировых отложений.



Рисунок 12 - Электронный микроскоп Primo Star, ZEISS

Поскольку в мышцах кабана, помимо необызвествленных, были обнаружены и обызвествленные капсулы трихинелл, то для их идентификации был применен следующий метод просветления: срезы мышц помещались в чашку Петри с 5-10 %-ным раствором соляной кислоты и нагревались в термостате при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ 20-30 мин. Затем просветленные срезы помещались обратно в компрессориум и микрокопировались вместе с остальными.

Измерение размеров капсул мышечных личинок трихинелл и вычисление индекса их округлости

Для определения размеров исследуемых капсул трихинелл заполненные компрессориумы просматривались с помощью окуляр-микрометра на световом микроскопе МБС-9.

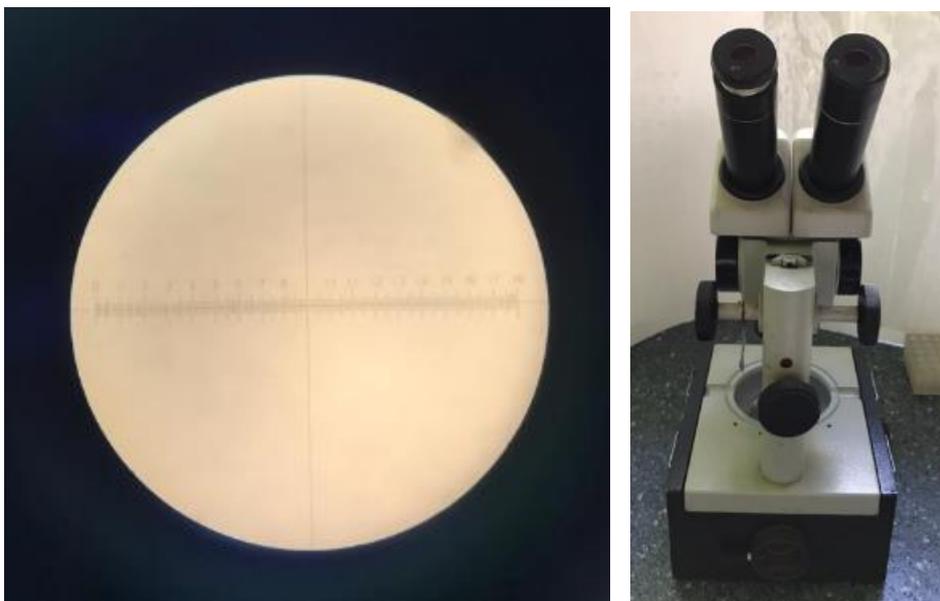


Рисунок 13 - Окуляр-микрометр на световом микроскопе МБС-9

Для этого глазная линза окуляра снималась и на ее место помещался окуляр-микрометр делениями вниз. После этого глазная линза завинчивалась до момента резкого изображения шкалы. Затем резкость изображения

выставлялась до того момента, когда отчетливо было видно шкалы окуляр-микрометра и шкалы объект-микрометра.

Величина одного деления окуляр-микрометра рассчитывалась по формуле: цена деления объект-микрометра * (количество делений объект-микрометра / количество делений окуляр-микрометра) (мкм).

Таким образом при увеличении в 250 раз одному делению окуляр-микрометра соответствует десять делений объект-микрометра (с ценой деления 10 мкм). Следовательно, при данном сочетании объектива и окуляра одно деление окуляр-микрометра равно $10 * 10/1$ т. е. 100 мкм. Если при этих условиях длина измеряемого объекта соответствует одному делению окуляр-микрометра, то истинная длина объекта равна $1*100$, т. е. 100 мкм.

Для проведения исследований в каждом компрессориуме (или в каждой группе мышц) были отмечены и проанализированы 10 личинок, имеющих наиболее четкие границы капсул.

Индекс формы капсулы (форминдекс «V») вычисляли как отношение диаметра «D» к её длине «L» ($V=D/L$).

2.1.2 Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС

Процедура включает энзиматическую деградацию мышечных волокон с использованием подкисленного пепсина для высвобождения мышечных личинок для последующего выделения и идентификации.

Материалом для исследований послужили все группы мышц из предоставленных нам проб. Пробы массивов, диафрагмальных мышц и мышц передних конечностей свиньи и кабана исследовались по отдельности, в двух гельминтологических аппаратах «Гастрос».

Трихинеллоскопия после искусственного переваривания мышц была проведена согласно действующим Методическим указаниям по лабораторной диагностике трихинеллеза животных, принятым Департаментом ветеринарии

Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации
28 октября 1998 г.

Оборудование и приборы:

- Гельминтологические аппараты для выделения личинок трихинелл методом переваривания мышечной ткани в искусственном желудочном соке типа «Гастрос», производитель: ПЕТРОЛАЗЕР;

- Мясорубка фирмы Panasonic МК-G1800P;
- стеклянные чашки Петри;
- пинцеты медицинские;
- весы лабораторные;
- пепсин пищевой свиной (ТУ 9219-564-00419779-11) «ШАКО»,

Ростовская обл., РФ;

- соляная кислота, ГОСТ 3118, х.ч.;
- мерные колбы;
- микроскоп световой;
- гельминтологическая камера Л.Д. Мигачёвой - Г.А. Котельника с размером клеток 1x1 мм (Разработка ВНИИП);

- лабораторный дозатор на 1 см³ со сменными наконечниками;
- резиновые перчатки.

Проведение исследований:

Пробы мяса свиньи и кабана были исследованы по отдельности, в двух разных гельминтологических аппаратах «Гастрос».



Рисунок 14 - Гельминтологический аппараты для выделения личинок трихинелл методом переваривания мышечной ткани в искусственном желудочном соке типа «Гастрос», ПЕТРОЛАЗЕР

Для проведения исследований каждая группа мышечных волокон (жевательные мышцы, мышцы диафрагмы и мышцы передних конечностей) измельчалась в мясорубке с диаметром решетки 3-4 мм, затем фарш каждой группы перемешивался и отбиралась проба по 50г. Нами был проведен анализ 6 проб фарша, по одной пробе каждой группы мышц от каждого вида животного.

Искусственный желудочный сок готовился следующим образом: в 1000 см³ предварительно нагретой до 41-42°С воды вносилось 10 см³ концентрированной соляной кислоты (уд. масса 1,2). Полученный раствор перемешивался, затем добавлялся пепсин пищевой свиной (ТУ 9219-564-00419779-11) в количестве 3-5,0 г. Далее полученный искусственный желудочный сок перемешивался и оставлялся для полного растворения пепсина на 5-10 минут.

Каждая навеска массой 50 г осторожно помещалась на сетчатое дно стакана в аппарате «Гастрос», затем заливалась 1000 см³ искусственного желудочного сока и выбиралась программа нагрева, а затем перемешивания.

По истечению 50 минут полученный осадок осторожно сливался в чистые чашки Петри и микроскопировался на световом микроскопе.

Для определения количества выделенных личинок трихинелл, личинки переносились в гельминтологическую камеру Мигачёвой - Котельника лабораторным дозатором на 1см³ и подсчитывались под бинокулярной лупой при увеличении 4 x 8.

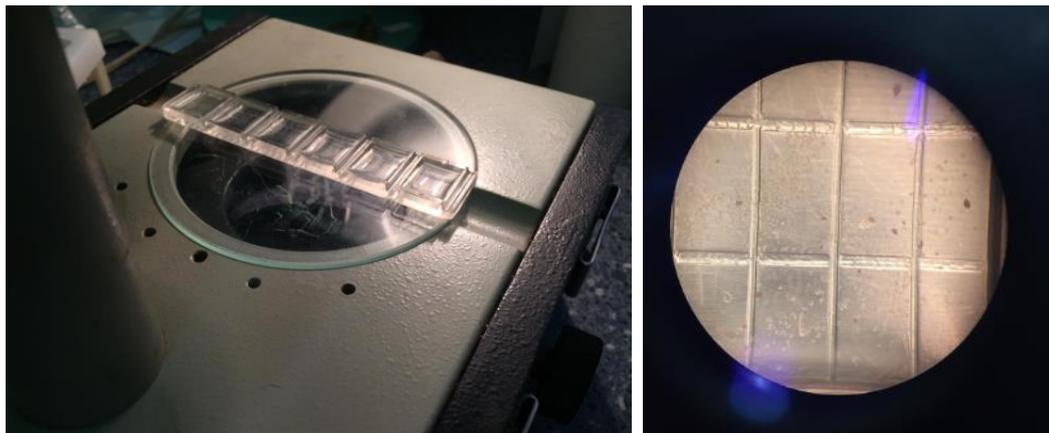


Рисунок 15 - Гельминтологическая камера Мигачёвой – Котельника с находящимися в ней выделенными личинками трихинелл

2.1.3 Таксономическая идентификация природных изолятов трихинелл методом ПЦР

ПЦР - это метод молекулярной биологии, который позволяет амплифицировать специфические фрагменты нуклеиновых кислот, из которых известны начальная и конечная нуклеотидные последовательности (олигонуклеотидная пара). Каждый вид (генотип) животных имеет свой собственный, характерный данному виду, участок ДНК. Зная его точный состав и/или размер, можно выбрать пару олигонуклеотидов, позволяющую его амплифицировать. ПЦР-амплификация характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью.

Модификацией «обычной ПЦР» является мультиплексная ПЦР, в которой используются две или более пары олигонуклеотидных праймеров. В этом случае с помощью ПЦР-анализа можно точно идентифицировать генетическую принадлежность вновь выявляемых изолятов *Trichinella spp.* в природных и синантропных очагах трихинеллёза.

Материалом для исследований послужили выделенные после протеолиза в ИЖС мышечные личинки трихинелл.

Проведение ПЦР диагностики проводилось с использованием методов, описанных в методических рекомендациях (ВИГИС) по таксономической идентификации генотипов природных изолятов трихинелл, циркулирующих на территории Российской Федерации, одобренных секцией «Инвазионные болезни животных» Россельхозакадемии. Москва, 2013 г.

Оборудование и приборы:

- Стерильный бокс Biosan;
- термоциклер «MyCycler 16450» фирмы «Bio-Rad»;
- источник питания Pover Park Basis 10-300v, 75B;
- центрифуга LMC-3000, Biosan;
- центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» Eppendorf 5415 C;
- термостат для пробирок типа «Эппендорф» «ДНК - Технология», Термит;
- трансэлюминатор UV – CABINET 2, CAMAG;
- набор автоматических пипеток переменного объёма (от 1 до 20 мкл, от 20 до 200 мкл, от 200 мкл до 1 мл);
- одноразовые пластиковые наконечники для пипеток вышеуказанных объёмов;
- полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объёмом 0,5 и 1,5 мл;
- штативы для пробирок и наконечников;

- двухкамерный (с морозильной камерой) холодильник поддерживающей -20°C ;
- набор приборов для проведения электрофореза фирмы «Bio-Rad»: источник постоянного тока, ультрафиолетовый трансиллюминатор, камера для горизонтального электрофореза марки Mini Sub Cell GT;
- видеосистема с цифровым фотоаппаратом для документирования результатов;
- электрическая плитка или микроволновая печь для плавления агарозы;
- микроскоп или бинокулярная лупа;
- термостойкие стеклянные колбы;
- резиновые перчатки;
- респираторы.

Проведение исследований:

Выделение геномной ДНК

Полученные после ИЖС личинки от всех групп мышц свиньи и кабана были перенесены в 2 пробирки типа «Эппендорф» и несколько раз промыты физиологическим раствором с последующим центрифугированием в центрифуге «Eppendorf 5415 C» в течении 4-5 минут при 5 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость после каждого центрифугирования удаляли.

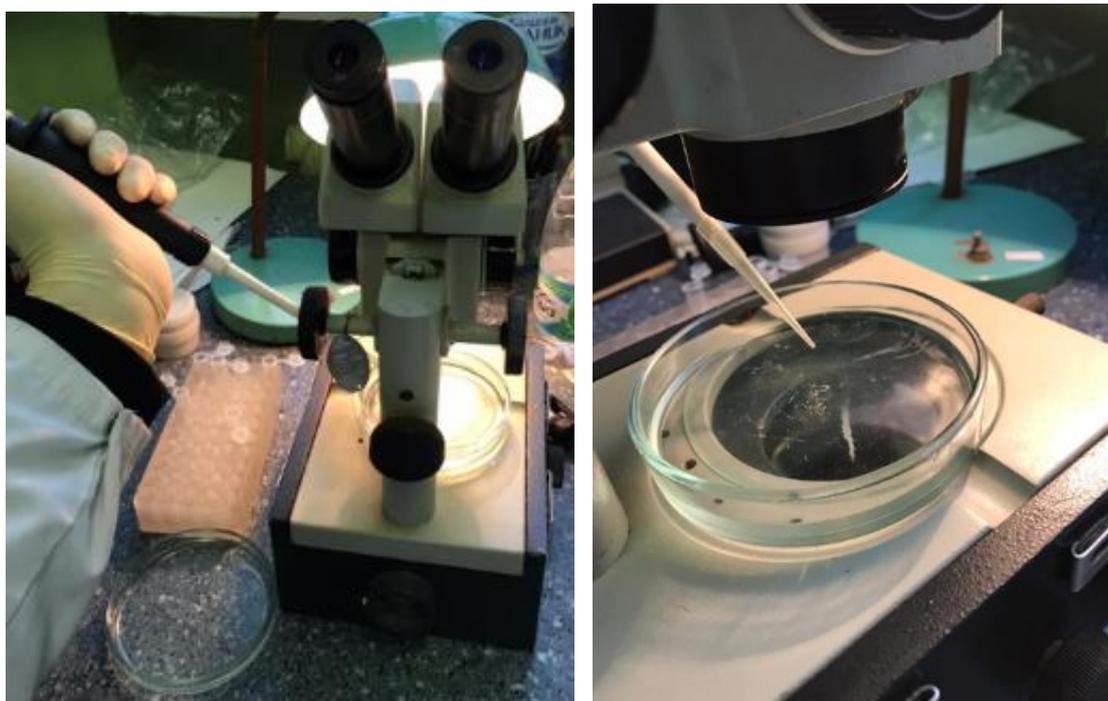


Рисунок 17 – Внесение полученных после протеолиза в ИЖС личинок в пробирки типа «Эппендорф»

В пробирку с личинками трихинелл добавляли 275 мкл лизирующего раствора содержащего: 0,5 М ЭДТА (рН 8,0), протеиназу К в конечной концентрации 20 мг/мл и раствор рибонуклеазы А в конечной концентрации 4 мг/мл.

Образцы инкубировали в термостате «Термит» в течение 18 ч при температуре 56°C, после чего ДНК выделяли из лизата с помощью набора фирмы «Promega» (Wizard® SV Genomic DNA Purification System) по протоколу фирмы производителя. Для этого каждый образец из пробирки помещали в отдельную колонку Wizard® SV, затем центрифугировали 3 мин при 10000 об./мин. После удаления фильтрата, в каждую колонку добавляли по 650 мкл раствора для промывки (Wizard® SV Wash Solution), содержащий 95% этанол, затем центрифугировали при 10000 об./мин. Затем переносили колонки в стерильные пробирки объёмом 1,5 мл, добавляли 250 мкл стерильной воды (Nuclease-Free Water) и выдерживали 2-3 минуты при комнатной температуре. Затем центрифугировали пробирки с миниколонками 1 мин при 12000 об./мин. После этого добавляли ещё 250 мкл стерильной воды,

оставляли при комнатной температуре на 2 минуты, затем центрифугировали 2 мин при 12000 об./мин. Удаляли миниколонки, а пробирки с выделенной ДНК хранили при -20°C .



Рисунок 18 - Термостат для пробирок типа «Эппендорф» «ДНК - Технология», Термит

После выделения геномной ДНК нами был проведен анализ нативности полученного препарата.

Анализ нативности выделенного препарата ДНК трихинелл

Для проверки качества выделенной ДНК проводили электрофорез 0,8% агарозным гелем. Полученный препарат визуализировали в трансэлюминаторе в ультрафиолетовом свете при 254 нм.



Рисунок 19 - Трансэлюминатор UV – CABINET 2, CAMAG

Подготовка реакционной смеси и режим проведения реакции амплификации

Анализ таксономической принадлежности исследуемых проб трихинелл проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Анализ последовательностей гена *Coxb* митохондриальной ДНК проводили с использованием набора фирмы «Силекс» и олигонуклеотидных праймеров:

F(прямой) - САА ТСС АТТ АГГ ТАС АСА СТС АС

R (обратный)- ТАА GTA АГА ТТТ САА TGG CG

Для проведения ПЦР, чистые промаркированные пробирки типа «Эппендорф», взятые по количеству проб, помещали в штатив на ледяную баню. На лед же помещались после оттаивания реактивы для проведения реакции из набора фирмы «Силекс» - стерильная вода, 10х буфер для ПЦР, раствор dNTP, ТАQ-полимераза и праймеры. В таблице 3 приведены количественные соотношения используемых реагентов.

Таблица 3

Вода (стер.)	13,2 мкл
Буфер для ПЦР 10х	2 мкл

dNTP	3,2 мкл
Каждого праймера по	0,25 мкл
ТАQ-полимераза	0,2 мкл
Всего:	19,2 мкл

После этого в пробирки вносили 0,8 мкл раствора, содержащего ДНК исследуемой пробы трихинелл. В пробирку с «отрицательным контролем реакции» ДНК не добавляли, это, так называемый, «внутренний контроль» ПЦР. Положительными контролями реакции являлась смесь для ПЦР с добавлением ДНК эталонных штаммов.

ПЦР проводили по следующей схеме: первичная денатурация ДНК при 94°C в течение 3 мин., после чего девять циклов состоящих из денатурации при 94°C 1 мин; отжига (annealing) при 55°C 1 мин 30 с и элонгации цепи при 72°C 1 мин 30 с. После этого следующие 24 цикла состоящие из денатурации при 94°C 45 с, отжига при 57°C 1 мин и элонгации цепи при 72°C 1 мин 20 с. Реакция завершалась финальной элонгацией при 72°C в течение 5 мин. Затем охлаждение проб до температуры 4°C.

Визуализация результатов ПЦР

Для проверки результатов ПЦР готовили гель с концентрацией агарозы 1%. Для этого взвешивали 0,3 г агарозы и, добавив 30 мл раствора 1% ТАЕ буфера в колбу, плавил агарозу на электрической плитке при постоянном перемешивании. Расплав агарозы охлаждали в колбе под тонкой струей холодной воды, до температуры 45-50°C градусов. Добавляли 3 мкл раствора бромистого этидия, и, используя легкие покачивания, растворяли каплю бромистого этидия в растворе (бромистый этидий связывается с ДНК, в результате чего происходит её свечение в УФ лучах). После этого, сразу же выливали расплавленную агарозу в камеру для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad», и вставляли гребенку на 10 лунок. Проверили, чтобы форма стояла ровно, используя круглый ватерпас, и

следили, чтобы рядом с гребенкой не было воздушных пузырей. Оставляли для застывания при комнатной температуре на 30-40 минут.



Рисунок 20 - Камера для горизонтального электрофореза фирмы «BioRad»

Раствор 1% буфера TAE заливали в камеры для электродов и на гель так, чтобы агароза была прикрыта слоем буфера. После этого извлекали гребенку, не допуская образования воздушных пузырей в лунках.

Затем в крайние лунки вносили по 2 мкл ладдера («DNA Ladder» - это ДНК, нарезанная на фрагменты известного размера, как правило, используется 50 или 100 нуклеотидных пар Ladder от фирмы «Fermentas»). Полученные в результате проведения ПЦР ампликоны вносили в лунки под электрофорезный буфер в смеси с красителями (0,025% бромфенолового синего и ксинолцианола) в объеме 15 мкл.

Закрывали камеру для электрофореза крышкой и подключали источник тока. Проводили электрофорез, следуя инструкциям для соответствующего источника тока (напряжение около 80-120 вольт, в зависимости от длины пробега, и сила тока около 100 миллиампер).

Следили за продвижением полосок краски (ДНК движется в геле на уровне средней из полосок - голубой), и, когда желтые полосы были близки к

концу геля, ток выключали. Слив излишки буфера с геля, переносили последний на полиэтиленовые пленки на трансиллюминатор. Наличие ДНК определяли при помощи Уф лучей (254 нм). Полосы, показывающие успешную амплификацию, фотографировали в видеосистеме «Gellmager».

2.1.4 Иммуноферментный анализ

Способ выявления антител к антигенам трихинелл представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), в ходе которого при взаимодействии исследуемых образцов сыворотки крови с иммобилизованными в лунках антигенами гельминта происходит связывание специфических антител и образование комплекса «антиген - антитело» на поверхности лунок. После удаления несвязавшихся компонентов сыворотки и добавления в лунки стрипов антивидового конъюгата с пероксидазой происходит включение ферментной метки в иммунный комплекс. В результате состоявшейся в лунках ферментативной реакции с субстратным раствором, содержащем хромоген (ТМБ) и катализатор - пероксид водорода образуется окрашенный продукт. Интенсивность окраски этого продукта пропорциональна концентрации антител к антигенам трихинелл в анализируемом образце сыворотки.

Материалом для исследования послужила тканевая жидкость (мясной сок), полученная при размораживании инвазированного трихинеллами мяса домашней свиньи (Осетия) и дикого кабана (Приморский край). Антигенным компонентом, сорбированном на полиэстироловом 96-луночном планшете служили экскреторно-секреторные белки *T.spiralis* молекулярной массой 29-63 кДа. Антивидовой конъюгат против иммуноглобулинов класса G свиньи (производства ЗАО «ИММУНОТЕХ», г. Москва) использовался в разведении 1:4000.

Все активные компоненты и реагенты, необходимые для проведения иммуноферментной реакции были предоставлены сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал ФГБНУ «ФНЦ – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН

Иммуноферментную реакцию проводили согласно лабораторному регламенту (ВИГИС) на применение иммуноферментной тест-системы для прижизненной диагностики трихинеллеза свиней, одобренного секцией «Инвазионные болезни животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН. Москва, 2006 г.

Оборудование и приборы:

- Ламинарный шкаф или стерильный бокс;
- набор автоматических пипеток переменного объёма (от 1 до 20 мкл, от 10 до 200 мкл, от 200 мкл до 1 мл);
- одноразовые пластиковые наконечники для пипеток вышеуказанных объёмов;
- полипропиленовые пробирки типа «Эппендорф» объёмом 0,5 и 1,5 мл;
- штативы для пробирок и наконечников;
- двухкамерный холодильник;
- центрифуга (не менее 12 тыс.об./мин);
- термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 56°C;
- 96-луночные полистироловые микропанели-стрипы производства ГОСНИИПОЛИМЕР;
- фильтровальная бумага;
- иммуноферментный ридер «INFINITE F50», TECAN;
- резиновые перчатки;

- респираторы.

Проведение исследований:

Целью данных исследований являлось изучение *эффективности* в иммуноферментном анализе тканевой жидкости полученной от дефростированной мышечной ткани домашней свиньи и дикого кабана, спонтанно зараженных личинками *T.spiralis*.

ИФА ставили в непрямом варианте, использовали 96-луночные полистироловые микропанели-стрипы производства ГОСНИИПОЛИМЕР, Москва. Для сенсibilизации твердой фазы были использованы экскреторно-секреторные антигены с молекулярной массой 29-63 кДа.

Получение и сохранение тканевой жидкости из проб мышечной ткани свиньи и дикого кабана, спонтанно инвазированного трихинеллами

Мясной сок отбирали в пробирки типа «Эппендорф» в объеме не менее 1,5 мл от каждой исследуемой пробы и подвергали центрифугированию в течении 10 минут при 3000 об./мин. Образовавшуюся надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки типа «Эппендорф», маркировали и сохраняли при температуре от 0 до 4°C в бытовом холодильнике.

Сенсibilизация полистирола экскреторно секреторными антигенами трихинелл

Для получения активной твердой фазы проводили сенсibilизацию в течение 18 час при 4°C, концентрация антигена составила 7 мкг/мл.

По окончании инкубации содержимое лунок удаляли, после чего 3-5 раз промывали их 250 мкл фосфатно-солевым буфером. Остатки влаги в лунках удаляли методом постукивания по стопке фильтровальной бумаги.

В планшеты вносили по 90 мкл раствора для разведения сывороток. В первую лунку А1 внесли 10 мкл тканевой жидкости (мясного сока), тщательно суспензировали и протитровали до разведения 1:1280.

В качестве положительной контрольной пробы в лунку А2 была внесена эталонная сыворотка экспериментально гипериммунизированной полным соматическим антигенам (ПСА) *T.spiralis* домашней свиньи. Титрование начинали с разведения 1:100 и продолжали до 1:12800.

В качестве отрицательного контроля в лунку А3 была внесена нормальная сыворотка крови свиньи (без инвазии) в титре 1:100.

Затем планшет закрывали крышкой и инкубировали при температуре 37°C в течении 1 часа.

По окончании инкубации планшет промывают буфером ФСБ-Т 5 раз. После чего остатки влаги в лунках удаляли методом постукивания по стопке фильтровальной бумаги.

Далее во все лунки вносят раствор в объеме 100 мкл ранее оттитрованного антивидового конъюгата в концентрации 1:4000.

После этого повторно инкубируют в течении 30 минут при 37°C.

По окончании повторной инкубации планшет промывают буфером ФСБ-Т 5 раз. После чего остатки влаги в лунках удаляли методом постукивания по стопке фильтровальной бумаги.

Затем в каждую лунку вносят по 100 мкл однокомпонентного раствора субстрата с хромогеном ТМБ (тетраметилбензидин) и помещают на 10-15 минут в защищенное от света место. При развитии интенсивного голубого окрашивания положительного контрольного образца реакцию останавливают добавлением стоп-реагента (0,5 М серной кислоты), при этом цвет в лунках изменяется на желтый различной степени интенсивности.

Результаты реакции можно оценивать визуально или с помощью иммуоферментного ридера («INFINITE F50», Австрия), при длине волны 450 нм.



Рисунок 21 - Имуноферментный ридер «INFINITE F50», TECAN

2.1.5 Иммунохроматографический анализ

Иммунохимический метод анализа на антитела к *Trichinella spiralis*, основывается на принципе тонкослойной хроматографии и включает в себя реакцию между антигеном и соответствующем ему антителом против свиного паразита *Trichinella spiralis* в образце крови, сыворотке и мышечной ткани. Проводится с помощью специальных тест-полосок, панелей или тест-кассет.

Материалом для исследования послужила тканевая жидкость (мясной сок), которая была собрана в пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 см³, во время размораживания основных проб. Нами было собрано по три пробирки тканевой жидкости от свиньи и от кабана.

Исследования проводились согласно инструкции, которая шла в комплекте с тестами Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., Ltd. Производства D Building, National Biological Industrial Park of Marinelifе, No.2 Binhai Road, Dapeng.

Оборудование и приборы:

- Тест-карта;
- пипетка;
- буферный раствор;
- инструкция;
- резиновые перчатки.

Проведение исследований:

При проведении исследований нами были соблюдены все предосторожности и рекомендации, заявленные производителем.

Для проведения исследований пробы тканевой жидкости были согреты до комнатной температуры $+18^{\circ}\text{C}$ в течении двух часов. После чего лабораторным дозатором исследуемая жидкость в объеме 1 см^3 была перенесена в буферный раствор и осторожно перемешана переворачиванием пробирки без образования пены.

Далее тест полоска помещалась на ровную поверхность стола, после чего из ранее подготовленной пробирки пипеткой была нанесена смесь в метку "S", в количестве четырех капель.

Затем тест был оставлен при комнатной температуре на 10 минут. Контрольная полоска «С» проявилась сразу, что подтверждало работоспособность тест-полоски.

2.2 Результаты исследований и обсуждения

2.2.1 Компрессорная трихинеллоскопия и анализ морфометрия капсул трихинелл

Компрессорная трихинеллоскопия, безусловно, является основным и наиболее доступным методом диагностики трихинеллеза. Благодаря своей доступности данные исследования могут проводиться представителями государственной ветеринарной службы как в лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы, так и в полевых условиях при наличии соответствующего оборудования. (Успенский А.В. 2019)



Рисунок 22 – Устройство для полевой трихинеллоскопии ТП-2

На сегодняшний день данные исследования являются обязательными при реализации туш, полутуш, четвертин свиней (кроме поросят до трехнедельного возраста), кабанов, барсуков, медведей, всеядных и плотоядных животных, а также нутрий и лошадей. Поэтому каждая лаборатория ветеринарно-санитарной экспертизы оснащена соответствующим оборудованием.

Несмотря на простоту и дешевизну проведения данных исследований, они имеют и свои недостатки. К ним относятся человеческий фактор, низкая вероятность обнаружения трихинеллеза при слабой интенсивности инвазии либо при присутствии в исследуемом материале бескапсульных видов

трихинелл и высокие временные затраты при большом объеме исследуемой продукции. (Международная комиссия по трихинеллезу: Рекомендации)

При проведении компрессорной трихинеллоскопии нами были обнаружены личинки трихинелл в каждой исследуемой пробе.

В пробе свиньи были обнаружены только инкапсулированные личинки трихинелл, располагающиеся в массеторах, мышцах диафрагмы и мышцах передних конечностей. В массеторах были обнаружены 12 личинок в 10 срезах, в диафрагмальных мышцах 27 личинок в 20 срезах, а в мышцах передних конечностей 19 личинок в 18 срезах.

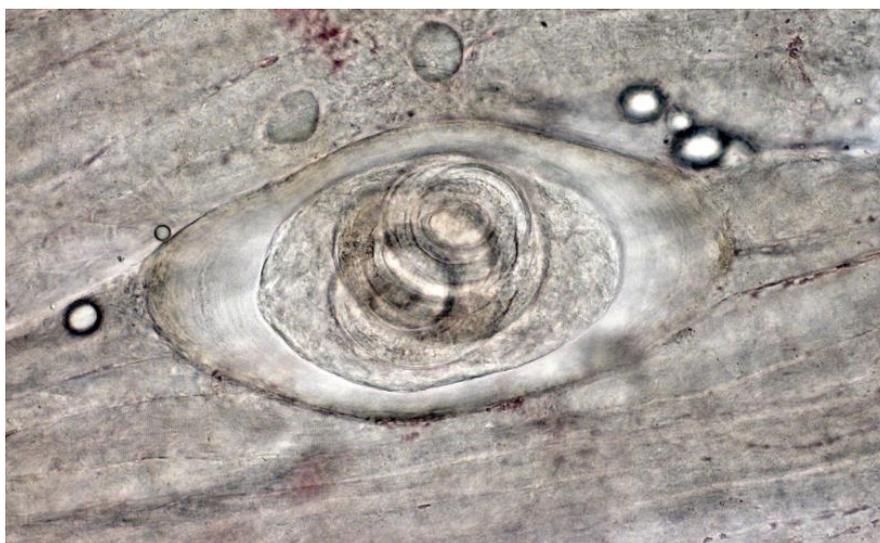


Рисунок 23 – Мышечная личинка трихинеллы в мясе свиньи

В пробе кабана так же были обнаружены только инкапсулированные личинки трихинелл, поражающие все исследуемые группы мышц. В массеторах нами было обнаружено 25 личинок в 18 срезах, в диафрагмальных мышцах 51 личинка в каждом срезе, а в мышцах передних конечностей 36 личинок во всех срезах.



Рисунок 24 – Мышечная личинка трихинеллы в мясе свиньи

Данные по количеству обнаруженных личинок в исследуемых мышцах животных представлены в таблице 4.

Таблица 4

Проба	Количество обнаруженных личинок в мышцах			
	Массеторы	Мышцы диафрагмы	Мышцы передних конечностей	Всего
Проба, полученная от свиньи	12	27	19	58
Проба, полученная от кабана	25	51	36	112

Данные по морфометрическим показателям капсул трихинелл, исследованных в мышцах свиньи представлены в таблице 5.

Таблица 5

Мышца, группа мышц	Исследовано капсул	Параметры капсулы		Индекс капсулы
		L	D	V
Жевательные	10	231,50-274,25	143,25-170,25	0,55-0,70
		251,37±5,1	160,80±3,2	0,64±0,02
Диафрагмальные	10	228,25-251,50	135,50-158,00	0,50-0,64
		249,75±2,8	144,42±4,6	0,58±0,01
Передних конечностей	10	230,50-266,50	140,50-171,00	0,52-0,68
		257,45±4,3	156,57±3,1	0,61±0,02
Среднестатистические значения	30	252,81±5,6	154,25±2,7	0,61±0,03

Средняя длина капсул трихинелл, обнаруженных в пробе жевательных мышц свиньи, составила 251,37 мкм, а диаметр 160,8 мкм. Значение форминдекса составило 0,64. В диафрагмальных мышцах средняя длина капсул трихинелл составила 249,75 мкм, а средний диаметр - 144,42 мкм, форминдекс капсул составил 0,58. В мышцах передних конечностей средние длина и диаметр капсул составили 257,45 и 156,57 мкм, соответственно. Форминдекс – 0,61. Сравнив полученные данные морфологии обнаруженных нами капсул трихинелл с данными В.А. Бритова, можно сделать заключение, что исследуемые нами мышечные личинки трихинелл относятся к варианту *T. Spiralis*. (Бритов В.А. Признаки вариантов *Trichinella spiralis*).



Рисунок 25 – Мышечная личинка трихинеллы в мясе свиньи

Данные по морфометрическим показателям капсул трихинелл, исследованных в мышцах кабана представлены в таблице 6.

Таблица 6

Мышца, группа мышц	Исследовано капсул	Параметры капсулы		Индекс капсулы
		L	D	V
Массеторы	10	226,75-294,50	114,25-186,50	0,45-0,62
		261,83±1,3	133,01±2,1	0,51±0,02
Диафрагмальные	10	210,50-302,50	122,00-191,50	0,52-0,75
		255,59±1,6	161,44±3,3	0,63±0,01
Передних конечностей	10	205,00-287,25	126,75-179,75	0,45-0,71
		248,25±4,8	144,13±2,1	0,58±0,03
Среднестатистические значения	30	255,22±5,6	146,19±2,7	0,57±0,02

В пробе жевательных мышц, полученных от кабана нами были обнаружены мышечные личинки со средней длиной капсулы 261,83 мкм и диаметром 133,01 мкм. Форминдекс капсул трихинелл в данных мышцах составил, в среднем, 0,51. В диафрагмальных мышцах средняя длина капсул трихинелл составила 255,59 мкм, а средний диаметр – 161,44 мкм, форминдекс капсул составил 0,63. Средняя длина капсул трихинелл, обнаруженных в мышцах передних конечностей составила 248,25 мкм, а диаметр 144,13 мкм. Значение форминдекса у личинок, обнаруженных в данной группе мышц, составило 0,58. Полученные данные по морфологическому строению капсул трихинелл, согласно научному труду В.А. Бритова, можно так же отнести к характерным для варианта *T. Spiralis* [6].

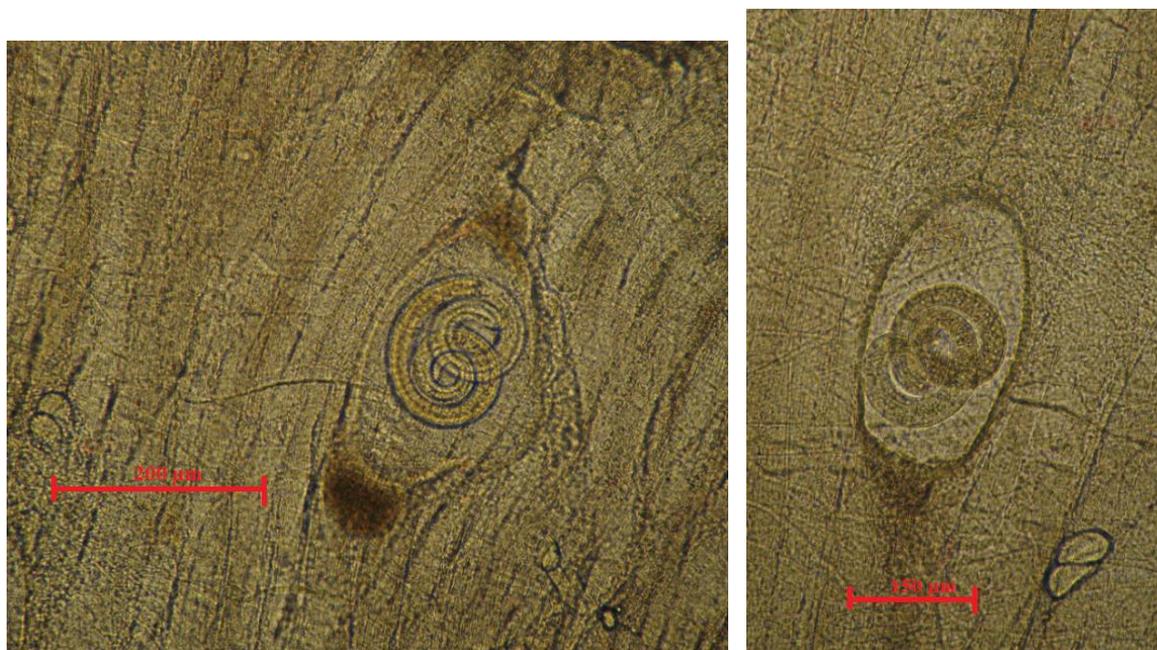


Рисунок 25 – Мышечные личинки трихинелл в мясе кабана, у которых отчетливо видно начало обызвествления

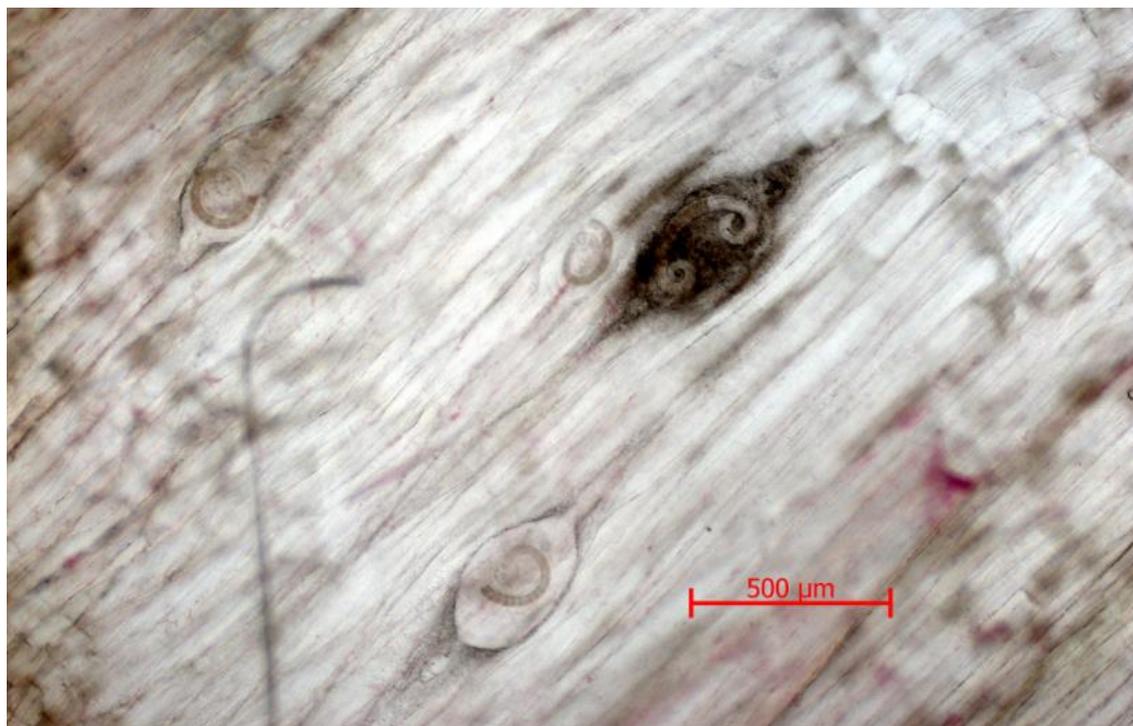


Рисунок 26 – Обызвествленные и мертвые личинки в мышцах передних конечностей кабана

2.2.2 Трихинеллоскопия после протеолиза в ИЖС

На сегодняшний день проведение трихинеллоскопии после протеолиза в ИЖС является наиболее распространенным лабораторным исследованием, призванным диагностировать трихинеллезную инфекцию у любых видов животных. Современные рекомендации по обеспечению качества данных исследований основаны на актуальных научных данных, доступных в настоящее время. Внедрение на мясоперерабатывающих предприятиях стандартов Международной организации по стандартизации (ISO) ISO/IEC 17025 и 17043, а так же рекомендаций, принятых Всемирной организацией здравоохранения животных (МЭБ), Кодексом Алиментариус (КОДЕКС) и Международной комиссии по трихинеллезу (ИКТ) позволило в несколько раз повысить качество и безопасность выпускаемой продукции за последние годы. (Международная комиссия по трихинеллезу: Рекомендации)

Диагностика и борьба с трихинеллезной инфекцией у восприимчивых продуктивных животных и дичи имеют основополагающее значение для обеспечения защиты потребителей от воздействия данного паразита. В этом контексте эффективность любой системы контроля качества мяса зависит от применения надлежащих стандартов качества (Гаджадхар и др., 2009).

Согласно данным Международной комиссии по трихинеллезу, метод искусственного переваривания мышечной ткани для обнаружения личинок трихинелл в мясе является одним из эффективнейших методов диагностики на сегодняшний день. (Gamble et al., 2000). Он имеет ряд преимуществ над другими исследованиями. Так, проведение этих исследований в рамках ветеринарно-санитарной экспертизы позволяет минимизировать влияние человеческого фактора как в случае компрессорной трихинеллоскопии. Так же, немаловажным преимуществом является возможность проведения группового исследования туш, что крайне актуально на мясокомбинатах, имеющих крупные производственные объемы. Благодаря этому производители могут минимизировать временные и финансовые затраты.

Безусловно, на эффективность проведения данных исследований влияют такие факторы, как: использование качественных и сертифицированных реактивов и приборов и степень квалификации специалистов. Поэтому важным моментом является внедрение систем контроля за проведением лабораторных исследований. (Nöckler and Kapel, 2007)

При проведении трихинеллоскопии после протеолиза в искусственном желудочном соке живые трихинеллы были обнаружены нами во всех группах мышц от каждого животного.

Из проб мышечного фарша свиньи было выделено 409 личинок, однако большая часть (почти 3/4) были неподвижны и имели раскрученную, серповидную форму, что говорило о их гибели. В жевательных мышцах свиньи нами было обнаружено 111 личинок, интенсивность инвазии составила 2,22 личинки на 1 грамм живой массы. В мышцах диафрагмы и передних

конечностей нами было обнаружено 154 и 144 личинки соответственно. Интенсивность инвазии в диафрагмальных мышцах составила 3,08 лич/г, а в мышцах передних конечностей 2,88 лич/г.

Из проб мышечного фарша кабана нами было выделено 790 личинок, большинство из которых были подвижны либо скручены в спираль. Подобная выживаемость личинок в мясе данного животного может быть обусловлена фенотипической изменчивостью *T. spiralis* в условиях природного биоценоза. В массеторах кабана нами было обнаружено 238 личинок, интенсивность инвазии составила 4,76 личинки на 1 грамм живой массы. В мышцах диафрагмы и передних конечностей нами было обнаружено 299 и 253 личинки соответственно. Интенсивность инвазии в диафрагмальных мышцах составила 5,98 лич/г, а в мышцах передних конечностей 5,06 лич/г.

Большое количество мертвых личинок может быть объяснено длительной заморозкой проб при транспортировке в институт паразитологии, поскольку все виды капсульных трихинелл, кроме *T. nativa*, погибают при длительном фростировании.



Рисунок 27 – Мертвые личинки трихинелл, полученные после протеолиза в ИЖС

Данные по количеству выделенных личинок и интенсивности инвазии представлены в таблице 7.

Таблица 7

Исследуемая проба	Масса переваренного фарша, г	Количество выделенных личинок	Интенсивность инвазии (лич/г)
Жевательные мышцы свиньи	50	111	2,22
Диафрагмальные мышцы свиньи	50	154	3,08
Мышцы передних конечностей свиньи	50	144	2,88
Жевательные мышцы кабана	50	238	4,76
Диафрагмальные мышцы кабана	50	299	5,98
Мышцы передних конечностей кабана	50	253	5,06

2.2.3 Таксономическая идентификация природных изолятов трихинелл методом ПЦР

Способность идентифицировать вид или генотип личинок трихинелл имеет первостепенное значение не только для эпидемиологических исследований, но и для получения информации о источнике вспышек, которые все еще происходят во всем мире. В последние годы данная проблема является крайне актуальной, поскольку импорт мясных продуктов увеличивается во всем мире, и понимание взаимосвязи диких и домашних животных в циклах передачи инфекции может существенно повысить качество и безопасность выпускаемой продукции.

До недавних времен род *Trichinella* считался моноспецифичным, однако исследования последних лет показали, что род состоит из 9 видов и по меньшей мере 3 дополнительных генотипов, которые еще предстоит изучить. За исключением неинкапсулированных видов, состоящих из *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella zimbabwensis* и *Trichinella papuae*, все представители этого рода морфологически неразличимы. Таким образом, идентификация была сведена к использованию ПЦР и, в особых случаях, секвенированию ДНК, и, при необходимости, дополнительного или расщепления полученных фрагментов ДНК ферментами рестрикции. Вместо использования ПЦР-праймеров, специфичных для каждого генотипа, Международная комиссия по трихинеллезу приняла единую мультиплексную ПЦР, ранее разработанную для дифференциации основных инкапсулированных и неинкапсулированных генотипов. Благодаря разработке и внедрения данного анализа, было подтверждено молекулярно-генетическими методами существование 12 видов/генотипов трихинелл. В ряде случаев секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК успешно применяется для изучения гаплотипического разнообразия генотипов трихинелл. В настоящее время Международная комиссия по трихинеллезу рекомендует проводить

исследования по определению генотипов трихинелл каждый раз, когда трихинеллезная инфекция обнаруживается в пищевых продуктах питания.

Безусловно ПЦР-диагностика является одним из точнейших исследований, используемых на сегодняшний день. Однако высокая стоимость и длительность проведения исследований заставляет задуматься более дешевых и быстрых методов диагностики.

При исследовании мышечных личинок трихинелл, полученных после протеолиза в ИЖС мяса свиньи нами было установлено, что фрагмент ДНК, полученный в результате амплификации, по молекулярной массе полностью соответствует размеру фрагмента ДНК эталонного штамма *T.spiralis* (любезно предоставленного сотрудниками ВНИИП).

Также, фрагмент ДНК трихинелл, выделенных из мышц кабана, по молекулярной массе полностью соответствует размеру фрагмента ДНК эталонного штамма *T.spiralis*.

Таким образом полученные нами результаты достоверно подтверждают, что оба животных были заражены личинками *T.spiralis*.

2.2.4 Иммуноферментный анализ

Трихинеллез относится к числу распространенных и тяжело протекающих гельминтозов человека. Природно-синантропные очаги трихинеллеза регистрируются на всей территории РФ, при этом передача возбудителя осуществляется на нескольких уровнях с вовлечением в циркуляцию как насекомых-трупоедов, так и мелких млекопитающих, плотоядных, всеядных животных и крупных хищников. Стационарно неблагополучными по трихинеллезу в настоящее время остаются регионы Северного Кавказа, Кировской области, Якутии, Приморского края, Восточной Сибири, Краснодарского края [1, 4].

Ежегодные вспышки этого антропоозноза среди населения РФ, в большинстве случаев группового характера, обуславливают масштабные потребности клинических и диагностических лабораторий в коммерческих иммуноферментных тест-системах, позволяющих проводить эффективную прижизненную серологическую диагностику данного тканевого гельминтоза у людей и сельскохозяйственных животных [5, 6].

Особую значимость подобные исследования приобретают при тканевых гельминтозах, когда прижизненная паразитологическая диагностика затруднена, а объективность иммунологических тестов напрямую зависит от качественного состава используемых антигенов. Между тем многокомпонентный состав антигенов трихинелл обуславливает необходимость проведения исследований по выявлению функциональных диагностически ценных антигенных компонентов и препаративного их выделения для использования в создаваемых иммунодиагностических тест-системах [7-9].

Серологические методы широко используются для выявления инфекций у животных и людей, однако Международная комиссия по трихинеллезу (ICT) не рекомендует использовать серологические методы для тестирования на трихинеллез при убойе отдельных туш животных, пренебрегая классическими методами диагностики трихинеллезной инфекции, проводимыми представителями государственной ветеринарной службы. (Gamble et al., 2000).

Многие виды серологических анализов использовались и продолжают использоваться для выявления трихинеллезных инфекций у животных и человека в лабораторных целях. Серологические анализы включают в себя такие методы, как:

- 1) иммуноферментный анализ (ELISA) с использованием выделительно-секреторных (ES) антигенов мышечных личинок (ML) (Frey et al., 2009a; Gamble et al., 1983, 2004; Гомес-Моралес и др., 2008, 2009);

2) иммуноэлектротрансферационный блот-анализ (ИЕТВ), также называемый вестерн-блот (WB), с использованием сырого экстракта личинок (CWE) или ES-антигенов (Frey et al., 2009b; Гомес-Моралес и др., 2012, 2014; Nöckler и др., 2009; Yera и др., 2003);

3) непрямой иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) с использованием фиксированных в формалине целых препаратов мышечных личинок, криостатных срезов инфицированных мышц грызунов или замороженных срезов свободных личинок (Dupouy-Camet and Bruschi, 2007; Sofronic-Milosavljevic et al., 2005);

4) иммуноферментный гистохимический метод (ИИГ), использующий криостатные срезы инфицированных мышц грызунов или замороженные срезы свободных клеток (Gamble et al., 2004);

5) методы бокового потока с использованием иммунохроматографических полосок и ES-антигенов (Fu et al., 2013; Zhang et al., 2009).

Для выявления инфекции у свиней и людей ИФА является наиболее часто используемым тестом предварительной диагностики, положительные результаты которого должны быть подтверждены дополнительными исследованиями.

Основными преимуществами ИФА являются высокая пропускная способность, низкая стоимость, надежность, стандартизация и приемлемый баланс между чувствительностью и специфичностью. Это единственный серологический метод у животных, рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения (МЭБ, 2017). Другие типы серологических тестов могут иметь практическое применение; поэтому при выборе любого серологического теста для выявления трихинеллезной инфекции следует учитывать принципы использования ИФА (требования к производительности, пригодность для конкретного вида хозяина и т.д.).

В ходе проведенных нами исследований было установлено, что антитела к *T. spiralis* в тканевой жидкости (мясном соке) свиньи достоверно

детектируются лишь при титре 1:5. При титре 1:10 результат можно считать «условно положительным», тогда как при титре 1:20 и выше показатели оптической плотности сопоставимы с показателями отрицательного контроля.

При использовании тканевой жидкости (мясного сока), полученной от кабана, антитела к *T.spiralis* достоверно детектируются до титра 1:20, при титре 1:40 результат можно считать «условно положительным», что говорит о большей эффективности и подтверждает лучшую сохранность антигенной структуры паразита при замораживании в мясе дикого животного. При титре 1:80 и выше показатели оптической плотности уже становятся сопоставимы с показателями отрицательного контроля.

Данные по показателям оптической плотности в ИФА тканевой жидкости, полученной от дефростированной мышечной ткани домашней свиньи и дикого кабана, спонтанно зараженных личинками *T.spiralis* представлены в таблице 8.

Таблица 8

Концентрация разведения	Тканевая жидкость от здоровой свиньи	Тканевая жидкость от исследуемой пробы свиньи	Тканевая жидкость от исследуемой пробы кабана
1:5	0,214	0,557	0,640
1:10	0,193	0,367	0,496
1:20	0,181	0,274	0,421
1:40	0,158	0,179	0,307
1:80	0,112	0,146	0,199
1:160	0,090	0,115	0,135
1:320	0,070	0,093	0,097
1:640	0,068	0,054	0,070

Данные по показателям оптической плотности в ИФА сыворотки крови, полученной от гипериммунизированной свиньи представлены в таблице 9.

Таблица 9

Концентрация разведения	Сыворотка крови гипериммунизированной свиньи (положительный контроль)	Сыворотка крови здоровой свиньи (отрицательный контроль)
1:100	1,824	0,170
1:200	1,759	0,168
1:400	1,452	0,144
1:800	1,166	0,132
1:1600	1,156	0,123
1:3200	1,097	0,119
1:6400	0,863	0,115
1:12800	0,429	0,112

Таким образом можно сделать заключение, что использование для прижизненной диагностики тканевой жидкости (мясного сока) иммунодоминантных антигенов *T.spiralis* молекулярной массой 29-63 кДа в составе иммуноферментных диагностикумов может обеспечить достаточно эффективное выявление инвазированных трихинеллезом туш свиней и кабанов, участвующих в циркуляции возбудителя в природных и синантропных очагах трихинеллеза на территории Российской Федерации.

2.2.5 Иммунохроматографический анализ

На сегодняшний день экспресс диагностика иммунохроматографическими тест-системами, безусловно, является очень перспективным лабораторным исследованием. Благодаря своей доступности и простоте она используется повсеместно. Например, при подозрении на коронавирусную инфекцию, первым делом врач проводит экспресс диагностику иммунохроматографическим тестом для вынесения предварительного диагноза. Развитие современной медицины и большое количество научных исследований по данному вопросу позволяет каждый день создавать и внедрять все больше экспресс-тест систем для диагностики различных болезней животных и человека.

Однако основным недостатком подобных тест систем, в сравнении с более фундаментальными исследованиями, до сих пор является относительно низкая точность. Безусловно она нивелируется стоимостью и быстротой тестирования, но не когда речь идет о здоровье людей. К очевидным недостаткам также можно отнести и простоту производства, что приводит к появлению на рынке некачественных и поддельных тестов у которых отсутствует какая-либо сертификация, выданная аттестованным органом. Многие люди, покупая подобные тест-системы на трихинеллез для исследования тушек добытых на охоте животных подвергают себя и окружающих опасности, поскольку вероятность недостоверного результата крайне велика.

При проведении иммунохроматографических исследований нами были получены следующие результаты:

Проба тканевой жидкости, полученной от свиньи не показала положительного результата во всех трех тестах. Лишь в одном тесте была слабовыраженная полоска «Т», едва заметная под определенным углом

освещения, однако данный результат, по заявлению производителя, не является положительным.

Проба тканевой жидкости, полученной от кабана также показала отрицательный результат во всех трех тестах.

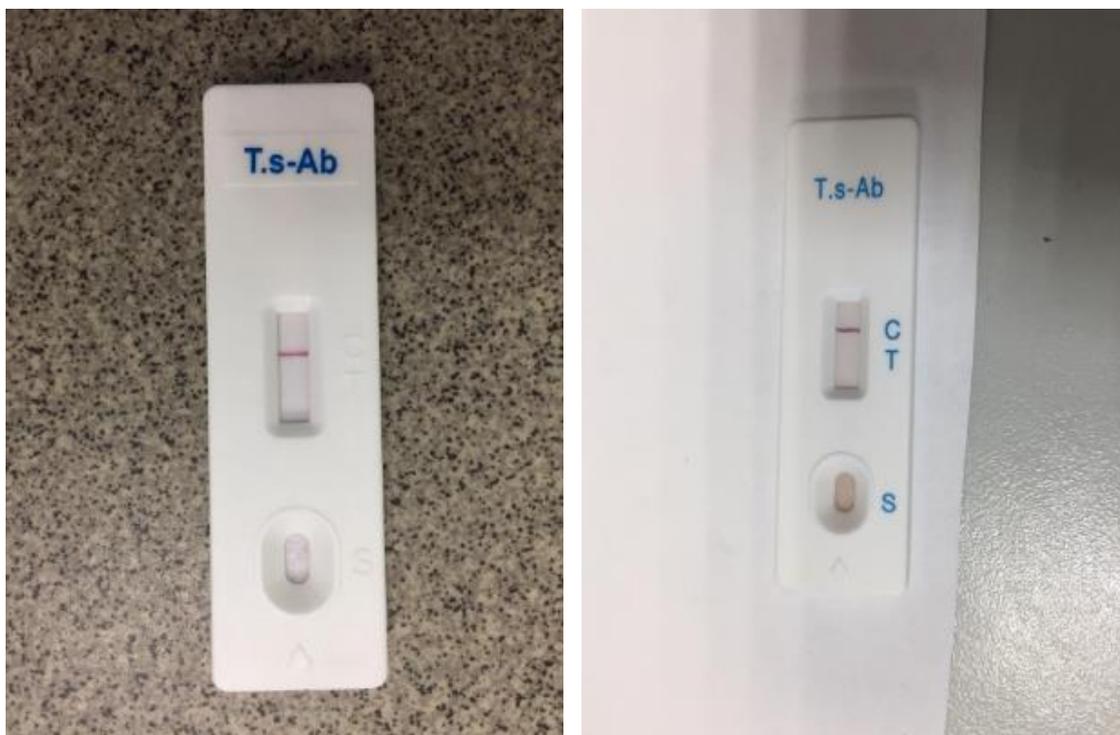


Рисунок 28 – Отрицательные результаты иммунохроматографического тестирования тканевой жидкости (мясного сока) свиньи и кабана, четко окрашенная линия «С» свидетельствует о работоспособности тест-системы

В каждой из шести тест-полоске была четко окрашенная линия «С», подтверждающая работоспособность тест-системы, однако отрицательные результаты заведомо положительных проб могут быть вызваны, по нашему мнению, следующими причинами:

- При транспортировке и хранении исследуемые пробы были несколько раз заморожены, что, несомненно, негативно повлияло на количество сохранившихся антител к *T.spiralis*, число которых оказалось недостаточным для эффективной работы относительно слабочувствительных тест-систем;

- Данные тест-полоски произведены в городе Шэньчжэнь, Китай с использованием актуальных на территории Китая правил и норм производства диагностических тест-систем, которые могут отличаться от подобных на территории Российской Федерации, принятых Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 8.891-2015 «Измерительные и индикаторные биохимические тест-системы»;
- Изучаемые тест-полоски являются альтернативным диагностическим инструментом, не исключающим проведение ветеринарно-санитарной экспертизы в полном объеме.

Однако, полученные отрицательные данные ИХА-анализа тем не менее коррелируют с проведёнными нами исследованиями мясного сока в иммуноферментном анализе. Положительный результат был достигнут лишь при разведении 1:5 – 1:20, в то время как не подвергавшиеся замораживанию свежие истечения тканевой жидкости от экспериментально заражённых свиней, согласно исследованиям сотрудника ВНИИП им. К.И. Скрыбина (к.б.н., с.н.с. Написановой Л.А.), показывают положительный результат в диагностическом титре 1:100 и выше, в зависимости от интенсивности трихинеллёзной инвазии. (Написанова, 2021).

ВЫВОДЫ

1. При проведении компрессорной трихинеллоскопии мышечные личинки трихинелл были обнаружены во всех группах мышц каждого вида животного. Все обнаруженные нами личинки имели капсулы, в мышцах кабана также присутствовали мертвые и обызвествленные личинки. В мышцах кабана количество обнаруженных личинок составило 112 штук, тогда как в мышцах свиньи примерно в два раза меньше – 58 штук. Подобная разница интенсивности инвазии может быть объяснена большей распространенностью *Trichinella spiralis* в природных биоценозах и применением антигельминтных препаратов в личных фермерских хозяйствах.

2. Согласно полученным нами данным среднестатистическая длина капсул трихинелл в мышцах свиньи составила 252,81 мкм, а диаметр – 154,25. Форминдекс капсул составил, в среднем, 0,61. В мышцах кабана капсулы трихинелл имели более вытянутый вид и их длина, в среднем, составляла 255,22 мкм, а диаметр – 146,19 мкм. Средние значения форминдекса капсул трихинелл в мышцах кабана составили 0,57.

Полученные нами морфометрические данные капсул природных изолятов трихинелл, согласно В.А. Бритову, подтверждают принадлежность исследуемых мышечных личинок к варианту *Trichinella spiralis*.

3. При проведении трихинеллоскопии после протеолиза в искусственном желудочном соке нами были обнаружены живые трихинеллы во всех группах мышц от каждого животного. Из проб мышечного фарша свиньи всего было выделено 409 личинок, тогда как из аналогичных проб кабана – 790. Согласно полученным нами данным интенсивность инвазии была выше у кабана – в среднем 5,27 лич/г., у свиньи интенсивность инвазии составила в среднем 2,73 лич/г. Большая часть выделенных нами личинок была неподвижна и имела серповидную форму, что говорило об их гибели. Подобная картина может быть объяснена длительной заморозкой проб при транспортировании в институт паразитологии.

4. При проведении таксономической идентификации исследуемых природных изолятов трихинелл методом ПЦР нами было подтверждено, что в обеих пробах животных фрагмент ДНК трихинелл, полученный в результате амплификации, по молекулярной массе полностью соответствует размеру фрагмента ДНК эталонного штамма *T.spiralis*.

5. При проведении иммуноферментного анализа было установлено, что антитела к *T.spiralis* в тканевой жидкости (мясном соке) свиньи достоверно детектируются лишь при титре 1:5. При использовании тканевой жидкости (мясного сока) кабана, антитела к *T.spiralis* достоверно детектируются позже, до титра 1:20. Исходя из этого можно сделать заключение, что использование для прижизненной диагностики тканевой жидкости (мясного сока) иммунодоминантных антигенов *T.spiralis* молекулярной массой 29-63 кДа в составе иммуноферментных диагностикумов может обеспечить достаточно эффективное выявление инвазированных трихинеллезом туш свиней и кабанов, участвующих в циркуляции возбудителя в природных и синантропных очагах трихинеллеза на территории Российской Федерации.

6. Изучение диагностической эффективности зарубежных тест-систем при использовании тканевой жидкости (мясного сока), полученного от дефростированного мяса показало, что данные тест-системы не обладают достаточной чувствительностью к антигенам *T.spiralis*. Однако, полученные отрицательные данные ИХА-анализа, тем не менее, коррелируют с проведёнными нами исследованиями мясного сока в иммуноферментном анализе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Подтвержденная нами инвазионная обсемененность мяса свиньи из Республики Северная Осетия - Алания и мяса кабана из Дальневосточного федерального округа личинками *Trichinella spiralis* свидетельствует о трофических миграциях данных трихинелл в природных биоценозах, поэтому проведение регионализации по данному заболеванию по сей день является актуальным.

2. Поскольку, по предоставленным нам данным, домашняя свинья, от которой были получены пробы, была выращена в условиях свободного выпаса на личном фермерском хозяйстве, то по сей день необходимо просвещать население, в особенности владельцев частных свиноводческих хозяйств, об рисках свободного выпаса животных и опасности данного заболевания для человека.

3. По результатам исследований нами было установлено, что классический метод трихинеллоскопии в сочетании с протеолизом мышечных волокон в ИЖС на сегодняшний день является лучшим методом диагностики трихинеллеза как в государственных лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы, так и на свиноводческих комплексах любой мощности, поскольку он наиболее экономически эффективен, а также обладает высокой специфичностью и надежностью.

4. Современные методы ПЦР-исследований, безусловно, являются наиболее эффективными для диагностики видоспецифических инфекций, однако высокая стоимость и длительность проведения исследований не являются экономически оправданными при больших объемах производства. По нашему мнению, в будущем, ПЦР-диагностика может превзойти классические методы при условии повышения доступности и снижения стоимости.

5. Использование для прижизненной диагностики тканевой жидкости (мясного сока) в составе иммуноферментных диагностикумов может

обеспечить достаточно эффективное выявление инвазированных трихинеллезом туш свиней и кабанов, участвующих в циркуляции возбудителя в природных и синантропных очагах трихинеллеза на территории Российской Федерации.

6. Изучаемые нами иммунохроматографические тест-системы диагностики трихинеллеза на сегодняшний день не обладают достаточным уровнем достоверности, поэтому не могут исключить проведение ветеринарно-санитарной экспертизы в полном объеме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев О. Н., Успенский А. В., Скворцова Ф. К. Трихинеллез в природном биоценозе: биология возбудителя, диагностика и профилактика. М., 2019. С. 7-11.
2. Ашихмин С. П., Мартусевич А. К., Жданова О. Б. Азид натрия: некоторые физико-химические свойства и потенциальное место в дезинфектологии // Здоровье населения и среда обитания. 2012. № 4. С. 43-45.
3. Бессонов А.С. // Ветеринария. 1994.-№ 2.- С.34-36.
4. Бессонов А.С. Трихинеллез. Монография. Киев, 1977. С. 19–23.
5. Бессонов А.С. Эпизоотология (эпидемиология) и профилактика трихинеллеза. Вильнюс: Минтис, 1972. С. 140-142.
6. Бритов В.А., Нивин Е.А. Трихинеллы против иммунодефицита и рака. Владивосток-Уссурийск. 2002; 75 с.
7. Букина Л. А. Трихинеллез в прибрежных районах Чукотского полуострова, распространение, меры профилактики: автореф. дис. д-ра биол. наук. Киров, 2015. 43 с.
8. Букина Л.А., Полетаева О.Г. //Аграрная наука Евро-Северо-Востока: Научный журнал Северо-Восточного регионального научного центра Россельхозакадемии. - 2011.- № 6 (25).-С.58-62.
9. Букина Л.А. // Мед. паразитол. - М. - 2011.- №4 - С.39-42.
10. Вольфсон А.Г., Комиссарова З.А. // Мед. паразитол. М.- 1969. - С.458-462.
11. Гаврилюк Н. Д. Эпизоотология трихинеллеза в Украинской ССР и пути усовершенствования трихинеллоскопии свинины: дис. канд. вет. наук. Киев, 1979. 161 с.
12. Гаркави Б.Л. Трихинеллез, вызываемый *Trichinella pseudospiralis* (морфология и биология возбудителя, эпизоотология и эпидемиология, диагностика, меры борьбы и профилактика) // Российский паразитологический журнал. 2007. № 2. С. 35-116.

13. Домский И. А., Жданова О. Б., Окулова И. И., Руднева О. В., Успенский А. В., Малышева Н. С., Россохин Д. В. Некоторые аспекты ветеринарносанитарной экспертизы мяса диких уток при саркоцистозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2021. № 3. С. 31-37.
14. Жданова, О.Б. Распространенность *T. spiralis* и некоторые особенности профилактики трихинеллеза в Кировской области / О. Б. Жданова [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. 2017. - № 1 (286). - С. 46-49.
15. Жданова О. Б., Окулова И. И., Домский И. А., Руднева О. В., Успенский А. В., Стрельникова И. С., Написанова Л. А. Некоторые рекомендации по диагностике трихинеллеза барсуков. Вопросы обеспечения безопасности заготовки барсучьего жира // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2020. № 4. С. 28-33.
16. Жданова О. Б., Ашихмин С. П., Окулова И. И., Бельтюкова З. Н. Распространенность *T. spiralis* и некоторые особенности профилактики трихинеллеза в Кировской области // Здоровье населения и среда обитания. 2017. № 1(286). С. 46-49.
17. Жданова О. Б., Распутин П. Г., Масленникова О. В. Трихинеллез плотоядных и биобезопасность окружающей среды // Экология человека. 2008. № 1. С. 9-11.
18. Жданова О. Б., Калужских Т. И., Ашихмин С. П., Масленникова О. В., Распутин П. Г., Мутошвили Л. Р. Гельминтозы собак Кировской области и биобезопасность окружающей среды // Теоретическая и прикладная экология. 2008. № 3. С. 49-53.
19. Инструкция о мероприятиях по предупреждению и ликвидации заболеваний животных гельминтозами. Ветеринарное законодательство. 1988. С. 452-473.
20. Клименко В.В., Белозёров С.Н. Бюл. Всес. ин-та гельминтол. 44 С.31-38. 1986. - вып. 2.

21. Мартусевич А.К. Анализ физико-химических свойств антигенов некоторых технология гельминтов как паразитологической метабомики, Фундаментальные исследования. 2014. - № 12-7. – С. 1437-1441.
22. Мартусевич, А. К. Исследование зависимости кристаллогенной активности биосреды от интенсивности инвазии *Trichinella spiralis* / А. К. Мартусевич, О. Б. Жданова // Российский паразитологический журнал. - 2013. - №2. – С. 64–71
23. Масленникова О. В., Жданова О. Б., Мартусевич А. К., Ашихмин С. П., Клюкина Е. С. Распространение *Alaria alata* в Кировской области и некоторые особенности ее сокристаллизации с растворами дезинфектантов // Российский паразитологический журнал. 2010. № 3. С. 73-76.
24. Методические указания № 15-7-37 «Паразитарные болезни. Профилактика гельминтозов, передающихся через мясо и мясные продукты». 1996. С. 153.
25. Методические указания по лабораторной диагностике трихинеллеза животных. Департамент ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации. 13-7-2/1428. М., 1998. С. 1–3.
26. Мезенцев С.В., Разумовская В.В. Распространение трихинелл в Алтайском крае // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. Барнаул, 2014. №3 (113). С. 69–73.
27. Митникова О. А., Сапунов А.Я., Пшеничный А.А. Морфологические изменения крови у свиней при экспериментальном трихинеллезе // Статьи и тезисы докладов Восьмой Всерос. конф. по трихинеллезу, 30-31 мая 2000 г. М., 2000. С. 117-120.
28. Митникова О.А. Экспериментальный трихинеллез животных, вызванный *Trichinella pseudospiralis* (Garkavi, 1972) и *Trichinella spiralis* (Owen, 1835): автореф. дис. ... канд. вет. наук. Ставрополь, 1998. 22 с.

29. Написанова Л. А. Диагностическая эффективность иммуноферментных тест систем (ИФР и дот-ИФА) при трихинеллезе свиней: дисс. канд. биол. наук / Л. А. Написанова. - Москва, 2004.
30. Написанова Л. А., Жданова О. Б., Ашихмин С. П., Окулова И. И., Андреев О. Н., Тхакахова А. А. Трихинеллез: некоторые аспекты его мониторинга. 2015. – 27 с.
31. Никишов А. А. Математическое обеспечение эксперимента в животноводстве: Учебное пособие. М.: РУДН. - 2014. - 215 с.
32. Овсюкова Н.И. Гельминты и основные гельминтозы млекопитающих Чукотки // Диссертация кандидата вет. наук - М.- 1966.- 155с.
33. Овсюкова Н.И. Гельминты и основные гельминтозы млекопитающих Чукотки // Диссертация кандидата вст. наук - М.- 1966.- 155с. 9 17.
34. Одоевская И.М. //Мед. паразитол.-М.-2007.- №4 - С. 19-24.
35. Пашук В.П., Бабин А.Ф., Черемичкая М.В. // Материалы пятой Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - г. Новочекасск.- 1988. - С.138-140.
36. Пашук В.П., Бабин А.Ф., Черемичкая М.В. // Материалы пятой Всесоюзной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - г. Новочекасск.- 1988. - С.138-140.
37. Полетаева О.Г., Красовская Н.Н. // Мел. паразитол.- М. - 1995. - №2.-С.33 35.
38. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Лебедев Г.Б., Козырева Т.Г. и др. // Мед. паразитол. - М.- 1998.-№3. - С. 29-32.
39. Попов М.А., Васерин Ю.И., Нагорный С.А., Твердохлебова Т.И //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. - М.- 2002. - С. 246-247.
40. Полетаева О.Г., Красовская Н.Н. // Мед. паразитол.- М. - 1995. - №2. - С.33 35.

41. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Лебедев Г.Б., Козырева Т.Г. и др. // Мед. паразитол. - М.- 1998.- №3. - С. 29-32.
42. Попов М.А., Васерин Ю.И., Нагорный С.А., Твердохлебова Т.И //Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. - М.- 2002. - С. 246-247.
43. Правила ветеринарно-санитарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясопродуктов. Ветеринарные правила и нормы. ВетПиН 13.7.1-2000. М., 2000. С. 51–52.
44. Профилактика паразитарных болезней на территории Российской Федерации. Санитарные правила и нормы. СанПиН 3.2.569-96. Минздрав России. М., 1997. С. 29–49.
45. Применение dot-ELISA и биокристаллоскопии для прижизненной диагностики трихинеллеза / А. К. Мартусевич [и др.] // Российский иммунологический журнал. 2013. - Т. 7, №2-3. - С. 187.
46. Пшеничный А.А. Эпизоотологические и клинико-патогенетические аспекты трихинеллеза птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук. Ставрополь, 2004. 28 с.
47. Садовников Н.В., Придыбайло Н.Д, Верещак Н.А., Заслонов А.С. Общие и специальные методы исследования крови птиц промышленных кроссов. Екатеринбург - Санкт-Петербург: монография. Уральская ГСХА, 2009. 86 с.
48. Сапунов А.Я. Совершенствование мер борьбы с трихинеллезом в северо-западном регионе Кавказа: автореф. дис. ... докт. вет. наук. М., 2000. С.519.
49. Сапунов А.Я., Митникова О.А., Якимов Г.В. Распределение личинок трихинелл разных видов в мышцах свиней при экспериментальном заражении // Материалы докладов научной конференции Всероссийского общества гельминтологов РАН «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 1999. С. 246 – 248

50. Сапунов А.Я., Митникова О.А Динамика морфологических, биохимических показателей крови при экспериментальном трихинеллезе собак // Материалы докл. 2-ой региональной конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины мелких домашних животных на Северном Кавказе», п. Персиановский, 1999. С.26-27.

51. Сапунов А.Я., Мурашов Н.Е. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - М. - 1996. - С. 77-79.

52. Сапунов А.Я., Мурашов Н.Е. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - М. - 1996. - С. 77-79.

53. Скворцова Ф.К. *Trichinella pseudospiralis* у свиней в Камчатском крае // Материалы докл. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». 2012. Вып. 13. С. 388 - 389.

54. Старкова Т.В., Полетаева О.Г. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - М. - 1996. - С. 93-95.

55. Старкова Т.В., Полетаева О.Г. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. М. - 1996. - С. 93-95.

56. Степанова Т.Ф., Пекло Г.Н., Филатов В.Г., Скарედнов Н.И. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. М. - 1996. - С. 95-98.

57. Степанова Т.Ф., Пекло Г.Н., Филатов В.Г., Скарעדнов Н.И. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. М. - 1996. - С. 95-98.

58. Твердохлебова Т.И., Бобышев Н.М., Русанов И. И., Нагорный С.А., Васерин Ю.И., Прохладный Н.Л. // Материалы докладов 6-й научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - г. Киров. - 1992. С. 189-192.

59. Твердохлебова Т.И., Васерин Ю.И., Цыбульская М.А., Пляков Б.И. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. -М. - 1996. - С. 98-100.
60. Твердохлебова Т. И., Васерин Ю.И. // Мед. паразитол.-М.-2005. - № 2. - С. 29-32.
61. Твердохлебова Т.И., Бобышев Н.М., Русанов И. И., Нагорный С.А., Васерин Ю.И., Прохладный Н.Л. // Материалы докладов 6-й научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - г. Киров. - 1992. С. 189-192.
62. Твердохлебова Т.И., Васерин Ю.И., Цыбульская М.А., Пляков Б.И. // Материалы докладов 7 научной конференции по проблеме трихинеллёза человека и животных. - М.- 1996. - С. 98-100.
63. Твердохлебова Т. И., Васерин Ю.И. // Мед. паразитол.-М.-2005. - № 2. - С. 29-32
64. Трихинеллез: некоторые аспекты его мониторинга профилактики / и Л. А. Написанова [и др.] // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. 2016. - № 17. - С. 280-282.
65. Трихинеллез нутрий (рекомендации). Краснодар, 2009. С. 3-32.
66. Успенский, А. В. Метод ветеринарно-санитарной экспертизы мяса промысловых животных при паразитарных зоонозах / А. В. Успенский, Ф. А. Скворцова // Российский паразитологический журнал. - 2014. -№3 - С. 151-157.
67. Шайкенов Б.Ш., Соколова Л.А. О распространении *Trichinella pseudospiralis* в природе // Материалы докл. 3-ей Всес. конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. - Вильнюс, 1981. С. 71-73.
68. Эпидемиологический надзор за паразитарными болезнями. Методические указания МУ 3.2.1756-03. М., 2005. С. 37–46. 6. Эпидемиологический надзор за трихинеллезом. Методические указания МУ 3.2.3.3163-14. М., 2017. С. 4–25.

69. Arriaga C., Muniz E., Morilla A., Ortega-Pierres G. *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swins and its potential use in diagnosis. *Exp. Parasit.* 1989. 69: 363-372.
70. Alvin A. Gajadhar, Karsten Noeckler, Pascal Boireauc, Patrizia Rossi, Brad Scandrett, H. Ray Gamble. International Commission on Trichinellosis: Recommendations for quality assurance in digestion testing programs for *Trichinella*. Italy, 2020. P 20-41.
71. Cui J., Wang Z.Q. An epidemiological overview of swine trichinellosis in China // *Vet. J.*, 2011, V.190 (3), P.323-328.
72. Fabrizio Bruschi, Maria Angeles Gómez-Morales, Dolores E. Hill. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. USA, 2018. P 14-21.
73. Gamble H. R. *Trichinella spiralis*: Immunization of Mice Using Monoclonal Antibody Affinity-Isolated Antigens. *Exp. Parasitology* 59, 398-404, 1985.
74. Gamble H. R., Graham C. E. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of swine trichinosis. *Vet. Res.*, 45, 67-74, 1984.
75. Helene Y., Shakir A. Development and Evaluation of a Western Blot Kit for Diagnosis of Human Trichinellosis (PubMed), 2003.
76. Jongwutiwes S., Chantachum N., Kraivichian P., Siriyasatien P., Putaporntip C., Tamburrini A., G La Rosa, Sreesunpasirikul C., Yingyoud P., Pozio E. First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *J. Clin. Infect. Dis.* 1998; 26 (1): 111–115.
77. Ko, O. C., Fan L. Heat shock response to *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Parasitology* 1996, 112: 89-95.
78. Mitreva M., Jasmer D.P. et al. // *J. Mol. Biochem. Parasitol.* - 2004. - Vol. - 137. P. 277-291.
79. Nagano I., Wu Z., Boonmars T., Takahashi Y. // *Int. J. Parasitol.* - 2004. - Vol. 34. - P. - 491-500.

80. Nagano I, Wu Z, Nakada T, Matsuo A, Takahashi Y. // *Parasitology*. - 2001. Vol. 123-P. 77-83.
81. Parkhouse R. M., Philip M., Ogilvie B. M. Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunol.*, 1981, 3: 339-352.
82. Pozio E., Christensson D., Steen M., Marucci G. *Trichinella pseudospiralis* foci in Sweden. *J. Vet. Parasitology*, 2004; 125: 335-342.
83. Pozio, E. Dante Zarlenga. International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae. Italy, 2018. P 27-35.
84. Romarís F., Dea-Ayuela M.A., Bolás F., Martínez-Fernández A.R., Sanmartín M.L., Ubeira F.M. // *Parasite Immunology*.- 2003.- Vol. 25.-No 6.- P.- 297-305.
85. Ranque S., Fauge`re B., Pozio E., La Rosa G., Tamburrini A., Pellisier J.F., Brouqui, P. *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. *J. Emerg. Infect. Dis.*, 2000; 6 (5): 543–547.
86. Silberstein D. S., Despommier D. D. Antigens from *trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. of Immunology*, 132, 898-904, 1984.
87. Tyrcekova L., Borovkova O. Immunochemical analysis of larval antigens of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Helmintologia*, 34, 4: 241-243, 1997.
88. Wu Z., Nagano I. A panel of antigens of muscle larvae of *Trichinella spiralis* and *T.pseudospiralis* as revealed by two-dimensional western blot and immunoelectron microscopy. *Parasitology*, 118 (Pt 6):118, 1999.
89. Zarlenga D.S., Gamble H.R. // *Biotechnology Advances*.- 1996.- Vol. 14.-№o 3.-P.371-373.
90. Zarlenga D.S., Boyd P., Lichtenfels J.R., Hill D., Gamble H. // *Int. J.Parasitol.* 2002. -Vol. 32.-№11.- P. -1361-1370.

91. Zhdanova O. B., Haidarova A. A., Napisanova L. A., Rossohin D., Lozhenicina O. The possibility of using *Trichinella spiralis* as an experimental model in the field of high dilutions. International Journal of High Dilution Research. 2015. - T. 14. - № 2. - C. 60-61.