

Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Patologian ja parasitologian oppiaine

Trichinella spiralis ja *Trichinella nativa* -loisten erittyminen ulosteisiin
rotalla kokeellisen infektion jälkeen

Karoliina Tuomola, ELK
Lisensiaatin tutkielma
Syksy 2011
Helsinki

Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tdk		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare – Author Karoliina Tuomola			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <i>Trichinella spiralis</i> ja <i>Trichinella nativa</i> -loisten erittyminen ulosteisiin rotalla kokeellisen infektion jälkeen			
Oppiaine - Läroämne – Subject Patologian ja parasitologian oppiaine			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum – Month and year 05/2011	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages 32
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p><i>Trichinella</i>-suvun loiset ovat maailmanlaajuisesti levinneitä sukkulamatoja, jotka ovat infektiivisiä useille eläinlajeille ja tarttuvat myös ihmiseen. Loiset aiheuttavat ongelmia muun muassa lihateollisuudessa, haittaavat tuotantoeläinten terveyttä ja ovat elintarviketurvallisuusriski. Eri <i>Trichinella</i>-lajien infektiivisyys eri isäntäeläinlajeissa vaihtelee. Esimerkiksi <i>Trichinella spiralis</i> aiheuttaa rotassa voimakkaamman infektion kuin <i>Trichinella nativa</i>, mutta syytä loislajien erilaiseen infektiiviteettiin samassa isäntäeläinlajissa ei tiedetä. <i>Trichinella</i>-loisten elämänsykliin kuuluu sekä enteraalinen eli suolistovaihe että parenteraalivaihe eli suoliston ulkopuolella tapahtuva vaihe. Vielä on epävarmaa, missä vaiheessa elämänsykliä loislajien selviytyminen rotassa eroaa toisistaan.</p> <p>Tutkielmani kokeellisen osuuden tarkoituksena oli selvittää rotan ulosteita tutkimalla, kiinnittykö toinen tutkituista <i>Trichinella</i>-lajeista (<i>T. spiralis</i> tai <i>T. nativa</i>) paremmin suolen seinämään ja tuleeko toinen nopeammin ulos suolesta. Mikäli rotan heikosti infektoivat <i>T. nativa</i> -loiset tulevat <i>T. spiralis</i> -loisia nopeammin ulosteiden mukana ulos suolistosta, voidaan olettaa suolistovaiheen immuunipuolustuksen olevan ainakin osatekijä rotan kyvyssä puolustautua <i>T. nativa</i> -infektioita vastaan.</p> <p>Työ suoritettiin infektoimalla kuusi rottaa <i>T. spiralis</i> -loisella ja kuusi rottaa <i>T. nativa</i> -loisella. Lisäksi tutkimuksessa oli mukana kolme kontrollirottia, joita ei infektoitu. Rottien ulosteet kerättiin seitsemän viikon ajalta, ja näytteet tutkittiin FLOTAC-menetelmällä. Ulosteista etsittiin <i>Trichinella</i>-loisten aikuis- ja toukkamuotoja. Ulostenäytteistä ei löytynyt yhtään loista. Kokeen jälkeen rotat lopetettiin ja niiden suolet tutkittiin, mutta suolistakaan ei löytynyt loisia. Lopetettujen eläinten lihasnäytteitä tutkimalla eläinten todettiin infektoituneen kyseessä olleelle loislajille tyypillisellä voimakkuudella. Kontrollirottia ei löydetty loisia.</p> <p>Koska rottien ulosteista tai suolista ei löytynyt loisia huolimatta onnistuneista infektoinneista, voidaan todeta käytetyn menetelmän olleen kokeeseen sopimaton. Mikäli loisia olisi löytynyt ulosteista, olisi ollut tarpeellista verrata eri lajeilla infektoitujen ryhmien tuloksia. Tieto siitä, tapahtuuko rotan suolistossa jotain, mikä heikentää toisen <i>Trichinella</i>-lajin infektiivisyyttä, olisi ollut merkittävä. Saadut tulokset olisivat olleet hyödyksi pohdittaessa parempia keinoja <i>Trichinella</i>-tartuntojen ennaltaehkäisyyn ja infektioiden hoitoon.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <i>Trichinella, spiralis, nativa, trichinellosis, rat, infectivity</i>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) työn johtaja Antti Sukura, ELT, ohjaajat Antti Sukura, ELT ja Niina Airas, ELL			

1. JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	2
2.1 <i>Trichinella</i> -lajit, taksonomia ja morfologia.....	2
2.1.1 Taksonomia	2
2.1.2 Lajit ja genotyypit.....	2
2.1.3 Morfologia.....	3
2.2 Elämänkierto	3
2.2.1 Enteraalinen kierto.....	3
2.2.2 Parenteraalinen kierto	4
2.3 Trikinelloosi	6
2.3.1 Tartunta.....	6
2.3.2 Oireet	7
2.3.3 Zoonoottisuus	7
2.4 Epidemiologia.....	8
2.4.1 Kontrollointi	10
2.5 <i>Trichinella spiralis</i> ja <i>Trichinella nativa</i>	12
2.5.1 Isäntäeläinadaptaatio	12
2.5.2 Tartunta rotalla	13
3. KOKEELLINEN OSUUS	13
4. AINEISTO JA MENETELMÄT	13
4.1 Eläinkoelupa.....	13
4.2 Rotat.....	14
4.2.1 Kokeessa käytetyt rotat	14
4.2.2 Rottien ylläpito ja seuranta.....	14
4.2.3 Rottien infektointi	15
4.2.4 Rottien ulosteet	16
4.3 FLOTAC	16
4.3.1 FLOTAC -menetelmän periaate	16
4.3.2 Näytteen käsittely	17
4.3.3 Näytteen tutkiminen	17
4.4 Digestio	18
4.5 Suolten tutkiminen.....	18
5. TULOKSET	19
5.1 Rottien ulosteet	19
5.2 Rottien suolet ja lihasnäytteet.....	19
5.2 Rottien painot	20
6. POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	20
7. KIRJALLISUUSLUETTELO	24

1. JOHDANTO

Trichinella-suvun loiset ovat maailmanlaajuisesti levinneitä sukkulamatoja, jotka infektoivat useita eläinlajeja ja ovat zoonoottisia (Dupouy-Camet 2000, Gottstein ym. 2009, Kapel ym. 2003). *Trichinella*-sukuun kuuluu kahdeksan lajia sekä neljä eri genotyyppiä (Pozio ym. 2009, Taylor ym. 2007). Zoonoottisuutensa vuoksi *Trichinella*-loiset ovat uhka ihmisille. *Trichinella*-loisten torjunta aiheuttaa kustannuksia lihantarkastuksessa ja esiintyminen tuotantoeläimissä, kuten siassa, aiheuttaa riskin elintarviketurvallisuudelle sekä kasvatettavien eläinten hyvinvoinnille (Pozio 2001, Taylor ym. 2007).

Eläin tai ihminen saa *Trichinella*-infektion syömällä raakaa tai huonosti kypsennettyä lihaa, joka sisältää infektiivisiä toukkamuotoja (Taylor ym. 2007). Toukat vapautuvat lihassoluista isännän mahalaukussa, minkä jälkeen loiset kulkeutuvat ohutsuoleen kehittyäkseen aikuisiksi. Aikuiset madot parittelevat, ja naaraat synnyttävät toukkia, jotka kulkevat imu- ja verisuonia pitkin poikkijuovaisiin luurankolihaksiin. Yleensä infektio aiheuttaa vain lieviä oireita tai on oireeton, mutta pahimmillaan tartunta voi johtaa kuolemaan (Gottstein ym. 2009, Taylor ym. 2007).

Trichinella-lajien infektiivisyys eri isäntälajeissa vaihtelee (Pozio ym. 1992a). *Trichinella spiralis* infektoi tehokkaasti rotan ja sian, toisin kuin *Trichinella nativa*. (Pozio ym. 1992a, Pozio 2000). Syytä eri *Trichinella*-lajien erilaiseen infektiokykyyn samassa isäntäeläinlajissa ei tiedetä.

Tutkimuksemme tavoitteena oli selvittää, eroaako kahden eri *Trichinella*-lajin (*T. spiralis* ja *T. nativa*) aiheuttama infektio rotassa loisten elämänsyklinän suolistovaiheessa. Tutkimalla eri *Trichinella*-lajeilla infektoitujen rottien ulosteita pyrimme selvittämään, kulkeutuvatko toisen lajin loiset nopeammin ulos rotan ruuansulatuskanavasta kuin toisen. Lisäksi tavoitteena oli tutkia, mitä eri kehitysvaiheessa olevia loismuotoja ulosteen seasta löytyy. Hypoteesina oletimme, että eri *Trichinella*-lajien kiinnittyminen rotan suolen seinämään sekä rotan puolustusmekanismit suolessa eroavat loislajien välillä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Trichinella*-lajit, taksonomia ja morfologia

2.1.1 Taksonomia

Trichinella-suvun loiset ovat sukkulamatoja, jotka kuuluvat Nematelminthes-jakson Nematoda-luokkaan (Taylor ym. 2007). Loisten suku, *Trichinella*, on yksi Trichuroidea-heimon suvuista.

2.1.2 Lajit ja genotyypit

Trichinella-sukuun kuuluu kahdeksan lajia sekä neljä eri genotyyppiä (Pozio ym. 2009, Taylor ym. 2007). Lajit ovat *T. nativa*, *T. spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae* ja *Trichinella zimbabwensis*. Genotyypit ovat nimeltään *Trichinella* T6, *Trichinella* T8, *Trichinella* T9 sekä *Trichinella* T12.

Eri *Trichinella*-lajien välillä on eroja niiden maantieteellisessä jakautumisessa, kylmänkestävyydessä sekä isäntäeläinlajeissa (Taylor ym. 2007). Eri lajien erot on listattu taulukkoon 1 (koonnut Anu Näreaho 2006 lähteistä Dupoy-Camet ym. 1994, Pozio 2000, Kapel ym. 2001, Oivanen ym. 2002, Pozio ym. 2004, taulukkoa lainattu ja muokattu Anu Näreahon luvalla).

TAULUKKO 1. Tiivistelmä *Trichinella*-lajeista ja genotyypeistä.

	Laji	Kapseli	Maantieteellinen jakautuminen	Todettu Suomessa	Jäätymisen kesto	Tavallinen isäntä
T1	<i>T. spiralis</i>	on	Maailmanlaajuinen	kyllä	-	Sika
T2	<i>T. nativa</i>	on	Arktiset, subarktiset alueet	kyllä	+++	Karhu, susi, kettu
T3	<i>T. britovi</i>	on	Eurooppa, Aasia	kyllä	+	Kettu
T4	<i>T. pseudospiralis</i>	ei	Maailmanlaajuinen	kyllä	-	Linnut, pussieläimet
T5	<i>T. murrelli</i>	on	Pohjois-Amerikka	ei	-	Karhu, pesukarhu
T6		on	Pohjois-Amerikka	ei	++	Karhu, susi
T7	<i>T. nelsoni</i>	on	Afrikka	ei	-	Hyeena, leijona
T8		on	Etelä-Afrikka	ei	-	Hyeena, leijona
T9		on	Japani	ei	-	Karhu, pesukarhu, koira
T10	<i>T. papuae</i>	ei	Papua-Uusi Guinea	ei	-	Matelijat
T11	<i>T. zimbabwensis</i>	ei	Afrikka	ei	-	Matelijat

2.1.3 Morfologia

Trichinella-loisen eri kehitysmuodot voidaan erottaa morfologisesti toisistaan (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Aikuiset loiset ovat värittömiä ja muodoltaan molemmista päistään kapenevia (Soulsby & Mönning 1968, Dupouy-Camet & Murrell 2007). *Trichinella*-naaras on pituudeltaan 1,26–3,35 mm ja leveydeltään 29–38 µm (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Urokset ovat pituudeltaan 0,62–1,58 mm ja leveydeltään 25–33 µm. Sekä naaraalla että uroksella on suojaava elastinen pintakerros, kutikula.

Trichinella-uroksella ei ole spikulaa, mutta sukupuolen voi tunnistaa loisen takaosassa olevista läpistä ja papilloista, jotka sijaitsevat kloaakkiaukon molemmin puolin (Soulsby & Mönning 1968, Taylor ym. 2007). Naaraalla vulva sijaitsee loisen etuosassa (Soulsby & Mönning 1968). Naaraalla on myös kohtu, jossa uudet toukat kehittyvät munista, jotka ovat kooltaan 30–40 µm (Soulsby & Mönning 1968). Naaras synnyttää eläviä toukkia (new born larvae, NBL), jotka ovat keskimäärin 110 µm pitkiä ja 7 µm leveitä, eikä niiden sukupuolta voida määrittää ulkomuodon perusteella (Dupouy-Camet & Murrell 2007).

Lihaksiin päässeet toukat, nk. lihaslarvat, ovat pituudeltaan 0,65–1,09 mm ja leveydeltään 25–40 µm (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Naaraspuoliset toukat ovat hieman uroksia suurempia (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Kollageenikapselin muodostavilla lajeilla lihaskystat ovat sitruunanmuotoisia, läpikuultavia, pituudeltaan 0,3–0,8 mm ja leveydeltään 0,2–0,4 mm (Taylor ym. 2007). Kapselittomia lajeja ovat *T. papuae*, *T. pseudospiralis* ja *T. zimbabwensis* (Taylor ym. 2007).

2.2 Elämänkierto

2.2.1 Enteraalinen kierto

Normaalisti isäntä saa *Trichinella*-infektion syömällä raakaa tai huonosti kypsennettyä lihaa, joka sisältää infektiivisiä ensimmäisen asteen L1 -toukkamuotoja (Taylor ym. 2007). Toukat vapautuvat lihassoluista mahalaukussa, minkä jälkeen ne kulkeutuvat ohutsuoleen kehittyäkseen aikuisiksi (Taylor ym. 2007). Kehittyvät *Trichinella*-loiset

hakeutuvat etenkin ohutsuolen alkuosan nukkalisäkkeiden väleihin (Taylor ym. 2007). L1-toukan aikuistuminen vaatii neljä kehitysvaihetta, ja toukat saavuttavat sukukypsyyden noin 30 tuntia tartunnan jälkeen (Kozek 1971, Taylor ym. 2007). Sukukypsät madot parittelevat, minkä jälkeen urokset kuolevat, ja naaraat tunkeutuvat syvälle ohutsuolen limakalvoon (Taylor ym. 2007). Eläviä naaraita voidaan havaita suolessa ainakin seitsemän viikon ajan infektion alkamisesta (Marti & Murrell 1986).

Ohutsuolen alkuosan olosuhteet ovat otolliset *Trichinella*-loiselle, ja alkuosaan kiinnittyneet naaraat tuottavatkin enemmän L1-vaiheen toukkia kuin suolen loppupäähän kulkeutuneet naaraat (Sukhdeo 1991). Suurin osa loisista jää kuitenkin suolen alkuosaan (Sukhdeo 1991). Aikuisten sukupuolijakauma on parittelun aikaan sama sekä ohutsuolen alku- että loppuosassa: yhtä urosta kohden on useita naaraita (Sukhdeo 1991). Loiset kulkevat suolistossa passiivisesti, ja suolen motiliteetin on todettu vaikuttavan loisten kiinnittymiskohtaan (Sukhdeo & Croll 1981). Motiliteettia lisäämällä loiset on saatu kulkeutumaan normaalia pidemmälle ohutsuolessa ennen kiinnittymistä suolen seinämään (Sukhdeo & Croll 1981).

Naaraat alkavat tuottaa L1-vaiheen toukkia (new born larvae, NBL) noin viikko tartunnan jälkeen, ja runsaimmin toukkia muodostuu seuraavan viikon aikana (Marti & Murrell 1986). Syntyneet L1-toukat tunkeutuvat imu- ja verisuoniin kulkeutuakseen lihaksiin (Taylor ym. 2007). Naaras voi tuottaa toukkia noin kuuden viikon ajan (Murrell 1985). Yksi naaras voi synnyttää jopa 500-1500 larvaa, mutta poikastuotantoon vaikuttavat sekä infektion aiheuttaneen *Trichinella*-loisen laji että isännän immuunipuolustuksen tehokkuus (Capó & Despommier 1996). Mastsolujen vajavainen toiminta edistää loisten selviytymistä (Suzuki ym. 2008). Suolessa kuolleiden *T. spiralis*-loisten DNA:n toteaminen kokeellisesti infektoitujen hiirten ulosteista todensi, että loisia on ulosteessa ainakin kolmen viikon ajan tartunnan saamisesta (Golab ym. 2009).

2.2.2 Parenteraalinen kierto

Trichinella-naaraiden synnyttämät L1-toukat kulkevat imu- ja verisuonia pitkin poikkijuovaisiin luurankolihaan, etenkin palleaan, kylkivälilihaksiin, kieleen ja poskilihaksiin (Taylor ym. 2007). *Trichinella*-toukka saa lihassolussa aikaan muutoksia,

jotka johtavat solun muuttumiseen niin sanotuksi hoivasoluksi (Stewart & Read 1974). Hoivasolun ympärille muodostuu suojaava kollageenikapseli lukuun ottamatta infektioita, joissa aiheuttajana on niin kutsuttu kapseliton *Trichinella*-laji: *T. papuae*, *T. pseudospiralis* tai *T. zimbabwensis* (Taylor ym. 2007, Baruch & Despommier 1991, Pozio & Zarlenga 2005). Kollageenikapseli koostuu lähinnä tyyppien IV ja VI kollageenisäikeistä, ja kapselissa voidaan havaita ainakin kaksi erillistä kerrosta (Polvere ym. 1997).

Hoivasolun pinnalle muodostuu verisuoniverkosto, joka mahdollistaa tehokkaan jätteiden poiston solusta ja kuljettaa loiselle sen tarvitsemat ravintoaineet (Baruch & Despommier 1991) Despommier 1993, Stewart & Read 1974). Verisuonten suuri läpimitta hankaloittaa kuitenkin kaasujen siirtymistä suonten seinämien läpi, joten hoivasolussa olevan toukan aineenvaihdunta on anaerobista (Capó ym. 1998). Hapettomissa olosuhteissa selviytymisestä on loiselle hyötyä, sillä toukka kykenee säilymään viikkoja infektiivisenä kuolleen eläimen lihassa (Despommier 1990, Despommier 1998). Elävässä eläimessä toukat voivat säilyä infektiivisinä vuosia tai jopa isäntäeläimen koko eliniän ajan (Despommier 1975, Taylor ym. 2007).

Hoivasolun muodostumiseen kuluva aika vaihtelee *Trichinella*-lajien välillä (Pozio ym. 1992b). Varhaisimmin hoivasolun muodostamisen aloittaa *T. spiralis* (16 päivää tartunnan jälkeen), mutta hoivasolu on valmis vasta 37 päivää tartunnan jälkeen. *Trichinella nativa* -loisen hoivasolun muodostuminen alkaa 20 päivää tartunnan jälkeen, mutta on valmis jo kymmenen päivää myöhemmin. Hitaimmin hoivasolun muodostuminen alkaa *T. nelsoni* -loisella.

Infektiiviset L1 -toukat vapautuvat hoivasoluistaan uuden isännän mahalukussa (Taylor ym. 2007). Vapautuneet loiset kulkeutuvat ohutsuoleen, aikuistuvat ja alkavat tuottaa uusia L1 -toukkia.

2.3 Trikinelloosi

2.3.1 Tartunta

Trichinella-loisten isäntäkirjo on hyvin laaja: infektioita tavataan linnuilla, maa- ja merinisäkkäillä sekä matelijoilla (Gottstein ym. 2009, Kapel ym. 2003). Myös ihminen voi saada tartunnan (Taylor ym. 2007). Kaloissa *Trichinella*-loisten ei toistaiseksi ole todettu lisääntyvän (Pozio & Rosa 2005). Sama isäntäyksilö voi olla infektoitunut kahdella eri *Trichinella*-lajilla (Pozio ym. 1995, Pozio ym. 1997, Liciardi ym. 2009, Oivanen ym. 2002, Airas ym. 2010). Sekainfektioita on löytynyt esimerkiksi hevoselta, supikoiralta, sudelta, punaketulta ja villisialta.

Eläin tai ihminen saa *Trichinella*-tartunnan syömällä raakaa tai puutteellisesti kypsennettyä lihaa, jossa on infektiivisiä toukkamuotoja (Taylor ym. 2007). Infektion voimakkuus riippuu isäntäeläinlajin lisäksi tartunnan aiheuttavasta *Trichinella*-lajista sekä isännän syömien toukkien määrästä (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Ihmiselle kliinisen taudin aiheuttavaa annosta on ollut vaikea määrittää, ja arviot alhaisimmasta infektiivisestä annoksesta vaihtelevat 70 toukan annoksesta 300 toukan annokseen (Gottstein ym. 2009, Dupouy-Camet & Murrell 2007, Murrell & Bruschi 1994). Arviolta 1000-3000 larvaa aiheuttaa ihmiselle vakavan kliinisen sairauden (Dupouy-Camet & Murrell 2007). Hiirelle pienin infektiivinen annos on viisi L1 -toukkaa hiirtä kohden (Cui ym. 2008). *Trichinella*-tartunnan saaminen ulosteen välityksellä on myös mahdollista vaikkakin epätodennäköistä, sillä toukat eivät kestä kauaa infektiivisinä isännän ulkopuolella (Robinson & Olsen 1960).

Tuotantoeläimet voivat saada trikinelloosin saastuneesta rehusta (Taylor ym. 2007). Infektoituneen rotan lihassa olevat toukat pysyvät infektiivisinä erilaisissa rehuissa useita viikkoja (Oivanen ym. 2002). On myös mahdollista, että *Trichinella*-infektio siirtyy luonnoneläimistä kotieläimiin tai päinvastoin (Gottstein ym. 2009). Sioilla hännänpurenta sekä ruokinta ruuantähteillä altistavat tartunnoille, lisäksi sika voi saada tartunnan pyydystämällä sikalaan päässeeseen infektoituneeseen rotan (Taylor ym. 2007). Sikalaan pääsevät rotat altistavat sikoja *Trichinella*-infektioille ja toimivat loisreservoarina (Leiby ym. 1990).

2.3.2 Oireet

Kotieläimillä *Trichinella*-infektio on tavallisesti lievä eikä oireita yleensä ole (Taylor ym. 2007). Lihansyöjät, kuten villit pedot, voivat kuitenkin saada syömänsä lihan mukana suuria määriä infektiivisiä toukkia. Tällöin toukat voivat elämänsä aikana suolistovaiheessa aiheuttaa isäntäeläimelle limaa erittävän tulehduksen ohutsuolessa sekä ripulin noin viikko tartunnan jälkeen. Kun lukuisat *Trichinella*-naaraiden synnyttämät L1 -toukat etenevät lihaksiin, voi seurauksena olla akuutti lihastulehdus, kuume tai sydänlihastulehdus 2-3 viikkoa tartunnan jälkeen. On kuitenkin huomattava, että oireet riippuvat sekä isännän immuunipuolustuksen tehokkuudesta että infektion voimakkuudesta. Eläinten *Trichinella*-infektioita ei yleensä hoideta.

2.3.3 Zoonoottisuus

Eniten tartuntoja ihmisille aiheuttaa saastunut sianliha, mutta myös villisian- ja hevosenliha voivat olla riski kuluttajille (Gottstein ym. 2009, Frey ym. 2009). Merinisäkkäistä, kuten hylkeestä ja jääkarhusta, saatavan lihan on myös todettu aiheuttavan *Trichinella* -infektioita ihmisille (Møller ym. 2005). Lisäksi infektoituneen villiriistan syöminen aiheuttaa tartunnan (McIntyre ym. 2007, Møller ym. 2005, Schmitt ym. 1978, Madariaga ym. 2007, Dworkin ym. 1996).

Ihmisillä *Trichinella*-infektion oireet saattavat olla hyvinkin vaihtelevia, mikä hankaloittaa taudin diagnostiikkaa (Gottstein ym. 2009, Dupouy-Camet & Murrell 2007). Oireina voivat olla muun muassa kuume, ruuansulatusvaivat sekä lihasten arkuus (Gottstein ym. 2009). Hyvin vakavat infektiot saattavat johtaa sairastuneen henkilön kuolemaan (Taylor ym. 2007). Ihmisten *Trichinella*-tartuntoja voidaan lääkittää bentsimidatsoleilla (albendatsolilla tai mebendatsolilla) sekä kortikosteroideilla (yleensä prednisolonilla) (Dupouy-Camet ym. 2002, Gottstein ym. 2009).

Suomessa ihmisten *Trichinella* -tartuntoja on ollut suhteellisen vähän, ja viimeisin tunnettu humaanitartunta Suomessa on vuodelta 1977 (Oivanen & Oksanen 2009). Ihmistartuntojen vähäisyys Suomessa johtuneen muun muassa siitä, että suomalaisen ruokakulttuuriin kuuluu ruuan kunnollinen kypsentyminen (Oivanen & Oksanen 2009). Lisäksi teurastamoissa tehtävä lihantarkastus ehkäisee saastuneen lihan pääsyä kuluttajille (Oivanen & Oksanen 2009). Elintarvikkeiden kuljettaminen maiden rajojen

yli lisää saastuneiden tuotteiden määrää markkinoilla, mikäli lihaa tuodaan maista, joissa lihan laatuun ei kiinnitetä tarpeeksi huomiota (Gottstein ym. 2009). Elintarvikkeiden lisäksi *Trichinella*-tartunnat kulkevat ihmisten, kuten turistien ja pakolaisten, mukana maasta toiseen (Gottstein ym. 2009).

2.4 Epidemiologia

Trichinella-loinen on yksi laajimmin levinneistä parasiiteista maapallolla, ja kyseistä loista tavataankin lähes kaikilla ilmastoalueilla (Dupouy-Camet 2000). Tarkkaa prevalenssia ihmisten tai eläinten infektiosta ei ole maailmanlaajuisesti saatu määritettyä. Monissa maissa trikinelloosi on kuitenkin endeemisenä joko villieläinpopulaatioissa tai kotieläimissä, minkä lisäksi ihmisten taudinpurkaukset ympäri maailmaa todistavat *Trichinella*-loisten olemassaolon.

Kotieläimissä tapahtuvaa *Trichinella*-loisen kiertokulkua kuvataan domestiseksi kierroksi (Pozio 2001). Domestinen kierto tapahtuu lähinnä sikojen keskuudessa. Siat voivat saada *Trichinella*-tartunnan saastuneesta rehusta tai ruuantähteistä, joita ei ole käsitelty riittävän tehokkaasti. Infektio leviää myös sikojen keskinäisessä vuorovaikutuksessa, mikäli hännänpurenta tai korvien pureminen on ongelma tilalla. Kuolleet yksilöt voivat myös toimia tartunnanlähteenä, mikäli ruhojen hävitys ei toimi kunnolla, ja muut siat pääsevät syömään kuolleita lajitovereitaan. Tärkein domestisessa kierrossa oleva *Trichinella*-laji on *T. spiralis*, mutta kyseistä lajia havaitaan myös luonnoneläimissä (Pozio 2000).

Lähellä ihmisasutusta elävät eläimet, kuten rotat, kissat ja ketut, voivat toimia vektoreina *Trichinella*-loiselle (Pozio 2001). Tartunta voi mainittujen eläinten mukana siirtyä luonnosta sikaloihin ja edelleen sikoihin. *Trichinella*-infektion kulkeutuminen kotieläimistä villieläimiin on myös mahdollista (Pozio 2000). Tätä kiertoa koti- ja villieläinten välillä kutsutaan synantrooffiseksi kierroksi (Pozio 2001). Rotat ovat olennaisena osana synantrooffisessa kierrossa, mutta *Trichinella*-infektion levittämisen lisäksi rotat voivat toimia loisreservoaarina sikaloissa ja siten pitää yllä tartuntoja sioissa (Schad ym. 1987). Loisinfektio voi myös kulkeutua sikalasta toiseen rottien mukana (Smith & Kay 1987).

Luonnossa tapahtuva sylvaattinen kierto kuvaa *Trichinella*-loisen kiertoa villeissä lihansyöjissä, jotka saavat tartunnan kannibalismien vuoksi tai raatoja syömällä (Pozio 2001). Sylvaattinen kierto on olemassa kaikilla mantereilla (Pozio 2000). Kaikki *Trichinella*-lajit ja -gentoypit voivat olla osallisina sylvaattisessa kierrossa (Pozio 2000, Airas ym. 2010). Vaikka *T. spiralis* on lähinnä kotieläimissä esiintyvä laji, tavataan luonnossakin kyseistä lajia (Wacker ym. 1999). Esimerkiksi Saksassa on ketuista löydetty *T. spiralis* -loista (Wacker ym. 1999). Airas ym. (2010) totesivat, että *T. spiralis* -infektioita voi esiintyä luonnossa ilman kontaktia kotieläimiin. Lisäksi Suomessa kasvatetuista villisioista on löytynyt useita *Trichinella*-lajeja (*T. pseudospiralis*, *T. nativa* ja *T. spiralis*) joten sylvaattinen ja domestinen kierto eivät toimi täysin erillään (Sukura ym. 2001, Oivanen ym. 2000).

Trichinella-loisen laaja isäntäeläinkirjo sekä infektiviteetin säilyminen vaihtelevissa olosuhteissa edesauttavat loisen leviämistä ja elossa pysymistä (Taylor ym. 2007, Dick 1983, Webster ym. 2002, Kotula ym. 1983). *Trichinella*-loisen on todettu selviävän infektiivisenä sekä hyvin matalissa että suhteellisen korkeissa lämpötiloissa (Kotula ym. 1983, Dick 1983). Kotula ym. (1983) todensivat, että *T. spiralis* -toukat säilyvät infektiivisinä neljä minuuttia 55°C:ssa ja viisi tuntia 49°C:n lämmössä. Kuumennus 60°C:een tappoi toukat kahdessa minuutissa.

Trichinella-loisen kylmänkestävyys vaihtelee lajeittain, mutta myös infektoituneen isännän laji vaikuttaa loisen kykyyn sietää kylmää ja jäätymistä (Taylor ym. 2007, Dick 1983, Kjos-Hanssen, 1984). *Trichinella nativa* sietää hyvin jäätymistä arktisilla alueilla elävissä eläimissä, mutta kylmänkestävyys heikkenee laboratoriohiirissä (Pozio ym. 1992b). Naalin pakastetussa lihassa *T. nativa* -toukat voivat säilyä infektiivisinä jopa neljä vuotta, kun taas samoissa olosuhteissa säilytetystä rotan lihasta ei löydy infektiivisiä toukkia enää neljän viikon jälkeen (Malakauskas ym. 2001, Kapel ym. 1999). Pakastuslämpötila oli molemmissa tapauksissa -18°C. *Trichinella nativa* -toukat säilyttävät infektivisyytensä hyvin myös tilanteessa, jossa säilytyslämpötila vaihtelee jäätymispisteen molemmin puolin (Davidson ym. 2008). *Trichinella spiralis* menettää infektivisyytensä rotan lihassa viikon kuluessa, jos liha varastoidaan -18°C:ssa (Malakauskas ym. 2001). Sianlihassa *T. spiralis* kestää -18°C:n pakkasta 2,8 päivää, mutta tuhoutuu 5,6 päivässä (Kotula ym. 1990). Lampaanlihassa *T. spiralis* kestää neljä

viikkoa -18°C:ssa (Theodoropoulos ym. 2000). Elintarviketurvallisuutta ajatellen vain sianlihaa voidaan pitää kuluttajalle turvallisena jäädyttämisen jälkeen, mikä tulee ottaa huomioon muun muassa säädöksiä laadittaessa (Kapel 2005).

Lisäksi *Trichinella*-loisen kylmänkestävyyteen vaikuttaa infektion kesto (Pozio ym. 1994, Kapel ym. 2003). Hylkeillä tehdyssä kokeessa todettiin, että *T. nativa* säilyy kuolleen eläimen lihassa sitä kauemmin mitä pidempään eläin on ollut infektoitunut (Kapel ym. 2003).

Trichinella-loinen voi säilyä infektiivisenä mätänevässä lihassa yllättävän pitkiä aikoja, esimerkiksi *T. papuae* selviää hajoavassa lihassa jopa viisi viikkoa (Webster ym. 2002, Oivanen ym. 2002). *Trichinella nelsoni* sietää *Trichinella*-lajeista parhaiten lämpimiä säilytysolosuhteita, kun taas *T. pseudospiralis* on herkin lämpötilojen kohoamiselle (von Köller ym. 2001). *Trichinella spiralis* säilyy kolme kuukautta infektiivisenä sianlihassa, joka on haudattu maahan 30-100 cm:n syvyyteen lämpötilan vaihdellessa 4-13°C välillä (Jovic ym. 2001).

Vaikka *Trichinella*-infektio leviää lähinnä saastuneen lihan välityksellä, isäntäkirjo on laaja, ja myös kasvissyöjät voivat infektoitua (Taylor ym. 2007, Smith ym. 1990, Pozio ym. 2001). *Trichinella*-tartuntoja on todettu hevosissa, ja kokeellisesti on voitu infektoida myös nautoja (Smith ym. 1990, Pozio ym. 2001). Varomaton hevosenlihan nauttiminen on aiheuttanut useita ihmisten taudinpurkauksia etenkin Etelä-Euroopassa (Dupouy-Camet 2000). Esimerkiksi Italiassa yksi saastunut hevosen ruho aiheutti *Trichinella*-infektion 538 ihmiselle vuonna 1991 (Dupouy-Camet 2000).

2.4.1 Kontrollointi

Trichinella-tartuntojen kontrolloimisessa tärkeää on infektioiden ennaltaehkäisy, jossa oleellisena osana on tartuntojen havaitseminen lihantarkastuksessa (Taylor ym. 2007). Sikaloissa on estettävä muiden eläinten, etenkin rottien, pääsy sisätiloihin. Myös teurastamoissa on huolehdittava tuhoeläintorjunnasta. Sikaloissa raatojen hävittämiseen on syytä kiinnittää huomiota, sillä raadot voivat toimia infektiolähteenä muille yksilöille. Sioille ei saa syöttää ruuantähteitä, ellei tähteitä ole kunnollisesti kuumennettu. Kuluttajan valistaminen lihan kunnollisen kypsennyksen tärkeydestä voi

olla tarpeen, samoin ihmisten tulisi olla tietoisia siitä, ettei infektoituneen lihan pakastaminen välttämättä tuhoa lihassa olevia *Trichinella*-toukkia.

Suomessa kaikki teurastetut siat on tutkittu *Trichinella*-infektion varalta vuodesta 1954 lähtien (Oivanen & Oksanen 2009). Euroopan Unionin komission asetuksen (EY) N:o 2075/2005 mukaan jokaisesta teurastetusta siasta on otettava näyte trikiinitutkimukseen osana post mortem -tarkastusta. Asetus koskee vain myytäväksi menevää lihaa, omaan kulutukseen tarkoitettua lihasta ei tarvitse ottaa näytteitä. Lisäksi muiden *Trichinella*-tartunnalle alttiiden eläinlajien, kuten hevosten, villisikojen sekä muiden tarhattujen ja luonnonvaraisten eläinlajien ruhoista on otettava järjestelmällisesti näytteitä post mortem -tarkastuksissa. Sialta yhden gramman painoinen näyte otetaan palleapilarista, jalostuseläimestä otetun näytteen tulee olla suurempi. Hevosesta, villisiasta sekä riistaeläimistä otettavien näytteiden tulee olla kymmenen gramman painoisia, ja ne otetaan loisten tyypillisistä esiintymispaikoista lihaksistossa. Näytteen on oltava suurempi, jos kyseiset näytteenottokohdat eivät ole saatavilla. Näytteet tutkitaan digestiomenetelmällä.

Digestiomenetelmällä voidaan tutkia samalla kertaa 50 sianlihanäytettä. Villisiasta ja hevosesta tulee ottaa suuremmat näytepalat kuin kotieläimenä kasvaneesta siasta. Maa- ja metsätalousministeriön asetuksen nro 38/EEO/2006 liitteen viisi mukaan teurastamon on pidettävä kirjaa ottamistaan näytteistä ja tuloksista. Jos jossakin näytteessä havaitaan *Trichinella*-infektio, lähetetään positiivisiksi todetut näytteet Elintarviketurvallisuusvirastoon varmistettavaksi ja lajitunnistusta varten. Koko eläin hylätään lihantarkastuksessa, mikäli *Trichinella*-tartunta todetaan.

Suomessa ensimmäiset *Trichinella*-tartunnat ihmisillä todettiin vuoden 1890 paikkeilla, ja vuoteen 2008 mennessä tapauksia on rekisteröity kahdeksan kappaletta (Oivanen & Oksanen 2009). Siassa ensimmäinen kotimainen tartunta todettiin vuonna 1954 (Rislakki 1956). 1900-luvun loppuneljänneksellä *Trichinella*-tartuntojen prevalenssi sioissa oli korkeampi kuin useissa muissa Euroopan maissa, mutta prevalenssi on laskenut viime vuosikymmenen aikana (Oivanen & Oksanen 2009). Syynä tähän on luultavasti muutos sianlihan tuotannossa, sillä nykyään sikoja kasvatetaan aikaisempaa

suuremmissa yksiköissä, jotka ovat huolella suunniteltuja. Suomen luonnossa *Trichinella*-infektioiden prevalenssi on edelleen korkea (Airas ym. 2010).

Suomessa tavataan neljää *Trichinella*-lajia: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* sekä *T. pseudospiralis* (Airas ym. 2010). Villieläimissä yleisimmin esiintyy *T. nativa*. Kotieläimiä eniten infektoiva laji, *T. spiralis*, voi esiintyä luonnossa vaikei kontaktia kotieläimiin olisikaan. Tärkeimpänä reservoaarina kaikille Suomessa tavattaville *Trichinella*-lajeille toimivat supikoirat (*Nyctereutes procyonoides*) ja punaketut (*Vulpes vulpes*) (Airas ym. 2010). Sekainfektioita, joissa kaksi eri *Trichinella*-lajia on infektoinut saman isäntäyksilön, on tavattu Suomessa villeillä lihansyöjillä sekä villisioilla (Oivanen ym. 2002, Airas ym. 2010).

2.5 *Trichinella spiralis* ja *Trichinella nativa*

2.5.1 Isäntäeläinadaptaatio

Trichinella-lajien infektivisyys eri isäntälajeissa vaihtelee (Pozio ym. 1992a). *Trichinella spiralis* infektoi tehokkaasti rotan ja sian, toisin kuin *T. nativa*. *Trichinella nativa* aiheuttaa infektoita lähinnä villieläimissä (Pozio ym. 1992a, Pozio 2000). *Trichinella nativa* sietää paremmin kylmää kuin *T. spiralis*, ja hyvä kylmänkestävyys parantaakin *T. nativa* -loisen selviytymismahdollisuuksia arktisilla alueilla (Pozio ym. 1992b).

Eri isäntälajien sappinesteet eroavat osittain toisistaan, ja eri *Trichinella*-lajien on todettu sopeutuneen omien isäntäeläinlajiensa sappinesteeseen (Theodoropoulos ym. 2003). Theodoropoulos ym. (2003) infektoivat rottia kolmella *Trichinella*-lajilla (*T. spiralis*, *T. nativa* ja *T. nelsoni*), minkä jälkeen rotille annettiin suun kautta eri eläinlajien sappinestettä (kettu, lammas, sika, kana). Minkään sappinesteen anto ei lisännyt *T. spiralis* -infektiossa lihaslarvojen määrää, kun taas kahden muun *Trichinella*-lajin kohdalla ketun sappineste nosti lihaksista löytyneiden toukkien määrää. *Trichinella nativa* -loinen on infektiivinen muun muassa villeille lihansyöjille, mikä voi osittain johtua juuri lihansyöjän sappinesteen positiivisesta vaikutuksesta loiseen.

Ensimmäinen *T. spiralis* -infektio siassa saa yksilössä aikaan osittaisen immunitietin muodostumisen (Murrell 1985). Kun sika kohtaa *T. spiralis* -loisen toisen kerran, poistuvat loiset sian suolistosta nopeammin kuin ensimmäisellä kerralla. Lisäksi

naaraiden kyky lisääntyä vähenee 75 % verrattuna ensimmäiseen tartuntakertaan. Sekä ensimmäisellä että toisella infektiokerralla loiset tulevat ulos suolistosta sitä nopeammin, mitä suurempi infektiomäärä on ollut. Suolistovaiheen immuniteetti saattaa siinä vähentää lihaksiin hakeutuvien toukkien määrää.

2.5.2 Tartunta rotalla

Trichinella spiralis on *T. nativa* -loista infektiivisempi, kun isäntänä on rotta (Malakauskas ym. 2001). Rotan lihaksissa olevien toukkien määrä on alhaisempi *T. nativa* -infektioissa kuin *T. spiralis* -tartunnoissa, kun rotat infektoidaan samankokoisilla annoksilla. Vasta-ainetasot pysyvät *T. spiralis* -infektioissa korkeina pidempään kuin *T. nativa* -tartunnoissa. Molemmat lajit aiheuttavat tartunnan alussa vasta-ainetason jyrkän nousun. Mielenkiintoista on, että rotan altistaminen *T. nativa* -infektioon ennen *T. spiralis* -tartuntaa alentaa *T. spiralis* -infektion voimakkuutta (Smith 1987a).

3. KOKEELLINEN OSUUS

Kokeen tarkoituksena oli selvittää rotan ulosteita tutkimalla, kiinnittykö toinen tutkituista *Trichinella*-lajeista (*T. spiralis*, *T. nativa*) paremmin suolen seinämään ja tuleeko toinen nopeammin ulos suolesta. Mikäli rotan heikosti infektoivat *T. nativa* -loiset tulevat *T. spiralis* -loisia nopeammin ulosteen mukana ulos suolistosta, voidaan olettaa suolistovaiheen immuunipuolustuksen olevan ainakin osatekijä rotan kyvyssä puolustautua *T. nativa* -infektioilta.

4. AINEISTO JA MENETELMÄT

4.1 Eläinkoelupa

Koetta varten haettiin eläinkoelupa, koska kokeessa käytettiin koe-eläiminä rottia ja hiiriä. Lupaa kokeeseen haettiin eläinkoelautakunnasta ajalle 1.5.2010-30.6.2012, ja lupa myönnettiin. Eläinkoeluvan numero on ESAVI-2010-05072/Ym-23. Kokeen hiiriosuutta varten oli jo olemassa erillinen eläinkoelupa (ESLH-2008-05570/Ym-23).

4.2 Rotat

4.2.1 Kokeessa käytetyt rotat

Kokeessa käytetyt rotat olivat Hollannista tilattuja Wistar-rottia. Kaikki rotat olivat uroksia ja saapuessaan kymmenen viikon ikäisiä. Kokeen ajan rottia hoidettiin Eviran koe-eläintiloissa. Rotat saapuivat Eviraan viikko ennen kokeen alkamista, jotta eläimet saattoivat sopeutua uuteen ympäristöönsä.

Koetta varten rottia tarvittiin 15 kappaletta, kuusi kumpaankin eri *Trichinella*-lajilla infektoitavaan ryhmään sekä kolme yksilöä kontrolliryhmään. Jokainen rotta nimettiin koodilla TriR, jonka perään jokaiselle rotalle tuli oma numero väliltä 11–25. Korvat lovettiin numeron mukaan, jotta rotat olisivat tunnistettavissa.

Rotat painoivat keskimäärin 222 grammaa saapuessaan Eviraan, painot vaihtelivat välillä 208–233 grammaa. Infektoidujen rottien sekä kontrollien painojen kehityksessä oli hieman eroa, mutta eri lajeilla infektoidujen rottien kasvu oli tasaista. Kuukausi kokeen alkamisen jälkeen yksi rotta painoi keksimäärin 265 grammaa, painot vaihtelivat välillä 251–296 grammaa.

4.2.2 Rottien ylläpito ja seuranta

Rottien yleisvointia seurattiin päivittäin, ja havainnot kirjattiin seurantakaavakkeeseen. Rotat punnittiin kerran viikossa, rottien ruokasäiliöt täytettiin ja vesi vaihdettiin noin joka toinen päivä. Jokaisen rotan ruuan- ja vedenkulutusta mitattiin koko kokeen ajan. Ulosteen keruu tehtiin päivittäin lukuun ottamatta viikonloppuja. Ensimmäisenä viikonloppuna ulosteet saatiin kuitenkin kerättyä päivittäin. Muina viikonloppuina ulosteet kerättiin niin, että samaan pussiin kerättiin maanantaina sekä lauantain, sunnuntain että maanantaiaamun aikana tulleet ulosteet.

Rottia pidettiin kokeen ajan yksittäishäkeissä. Sekaannusten välttämiseksi häkit sijoitettiin niin, että kukin ryhmä oli omassa hyllykössään. Häkkien kuivikkeena käytettiin puuhaketta, lisäksi kussakin häkissä oli rotalle pesäntekomateriaalia. Metaboliahäkkien tarpeellisuutta pohdittiin kokeen suunnitteluvaiheessa, mutta todettiin, että ulosteiden kerääminen onnistuu normaalista rottahäkistä. Tavallinen häkki on miellyttävämpi rotalle kuin metaboliahäkki.

4.2.3 Rottien infektointi

Rotat infektoitiin Eviran hiirissä ylläpidetyillä *Trichinella*-kannoilla 970 (*T. spiralis*) ja 2740 (*T. nativa*) syöttämällä rotille infektiivistä hiirenlihaa. Infektointipäivän aamuna lopetetuista hiiristä tehtiin jauhelihaa, jonka infektiotaso tarkastettiin digestiomenetelmällä. Rottien infektiomäärien suuruudet laskettiin hiirenlihan infektiotasojen mukaan. Yhden rotan infektiomäärässä tuli olla 2000 *Trichinella*-toukkaa. Annokset haluttiin pitää sellaisina, etteivät rotat saisi infektiosta oireita. Lievätkin oireet, kuten ripuli, ovat harvinaisia mainitulla annoksella.

Evirassa kasvatetuissa hiirissä infektiotasot vaihtelevat *Trichinella*-lajin mukaan, mikä piti ottaa huomioon laskettaessa rottien infektiomääriä varten tarvittavien hiirten määrä. *Trichinella nativa* -infektoiduissa hiirissä olevien toukkien määrä on keskimäärin 300 toukkaa yhdessä grammassa hiirenlihaa. Hiiren lihapaino on keskimäärin 10 grammaa, joten *T. nativa* -infektoiduista hiiristä saadaan keskimäärin 3000 toukkaa per hiiri. *Trichinella spiralis* -infektoiduissa hiirissä infektiotaso on noin 600 toukkaa yhdessä grammassa hiirenlihaa, joten yhdestä hiirestä saadaan arviolta 6000 toukkaa. *Trichinella spiralis* -infektoiduista hiiriä tarvittiin siis yksi hiiri kolmea rottaa kohden, *T. nativa* -hiiriä puolestaan kaksi hiirtä kolmea rottaa kohden. Näiden lisäksi varattiin käyttöön muutama ylimääräinen hiiri.

Rottaa paastotettiin puoli vuorokautta ennen infektiomäärien antamista. Paastottamisella pyrittiin siihen, että rotat olisivat nälkäisiä saadessaan infektiomäärät ja siten söisivät annoksensa kokonaan ja mahdollisimman nopeasti. Infektiomäärät pakattiin infektointia edeltävänä päivänä kukin omalle petrialjalleen, ja annoksia säilytettiin yön yli jääkaapissa Parafilmillä suojattuna. Petrialjat annoksineen siirrettiin rottien häkkeihin infektointipäivänä. Rottien syömistä tarkkailtiin annosten antamisen jälkeen, ja kaikki rotat söivät annetun lihan lähes heti. Viimeisinkin annos oli syöty noin 30 minuutin kuluttua annosten antamisesta. Rottien infektiomäärät tehtiin kahtena peräkkäisenä päivänä. *Trichinella spiralis* -infektiomäärät suoritettiin päivää ennen *T. nativa* -infektointia, jotta estetäisiin näytteiden ristikontaminaatiot laboratoriossa. Rotista otettiin seeruminäytteet kaksi viikkoa infektiomäärän jälkeen, jotta saatiin määritettyä rottien *Trichinella*-vasta-aineet. Rotista otettiin seeruminäytteet myös lopetuksen yhteydessä. Verinäytteet otettiin

häntäsuonesta lukuun ottamatta lopetuksen yhteydessä otettuja näytteitä, jotka otettiin sydänpunktiolla. Infektoinnin onnistuminen varmistettiin lopetuksen jälkeen digestiolla.

4.2.4 Rottien ulosteet

Rottien ulosteiden kerääminen aloitettiin infektointipäivänä ja sitä jatkettiin seitsemän viikon ajan. Jokaisen rotan häkistä kerättiin päivittäin kaikki edellisen vuorokauden aikana muodostuneet papanat. Ulosteet kerättiin valmiiksi merkattuihin minigrip-pusseihin, joihin oli kirjoitettu rotan koodi, keräämispäivämäärä, monesko infektoinnin jälkeinen vuorokausi on menossa sekä onko rotta infektoitu *T. spiralis* vai *T. nativa* -lajilla. Ulosteet kerättiin joka arkipäivä sekä päivittäin ensimmäisenä viikonloppuna infektoinnin jälkeen. Myöhempien viikonloppujen ulosteet kerättiin niin, että kaikki viikonloppuna tulleet ulosteet kerättiin samaan pussiin seuraavana maanantaina. Kontrollirottien ulosteet kerättiin kiertävästi niin, että päivittäin otettiin talteen vain yhden kontrollirotan ulosteet. Kerätyt ulosteet punnittiin rottakohtaisesti, ja ulostepussit vietiin laboratorion pakastimeen myöhempää tutkimista varten.

4.3 FLOTAC

4.3.1 FLOTAC -menetelmän periaate

FLOTAC on nesteen nosteeseen perustuva menetelmä, jolla voidaan saada ulosteessa olevat loiset ja niiden munat eroteltua nesteen pinnalle. Nesteen pinnalta loiset ja munat voidaan käsittelyn jälkeen laskea valomikroskoopilla. Myös *Trichinella*-loiset saadaan kellumaan FLOTAC-menetelmän avulla, mutta flotaationesteenä tulee käyttää sinkkisulfaattia tavallisesti käytetyn magnesiumsulfaatin sijaan. Magnesiumsulfaattia käytettäessä aikuiset loiset eivät nouse nesteen pintaan, sillä magnesiumsulfaatin tiheys ei riitä aiheuttamaan kyllin suurta nostetta aikuisten kelluttamiseksi.

FLOTAC-menetelmässä käytetään apuna laitetta, joka koostuu kolmesta pääkappaleesta: sylinterimäisestä runko-osasta, translaatiolevystä sekä päällimmäisenä olevasta lukulevystä. Kun laitteen kokoa, voi lukulevyä käänellä eri suuntiin tarpeen mukaan, ja sylinterin sisälle jää kaksi viiden millilitran suuruista näytekammioita. Näytesuspensio laitetaan näytekammioihin, joissa loiset nousevat

sentrifugoinnin aikana nesteen pintakerrokseen lähelle lukulevyä. Kun lukulevy kierretään lukuasentoon, voidaan pinnassa olevat loiset nähdä mikroskoopilla.

Ennen varsinaista koetta FLOTAC-menetelmää testattiin ulosteella, johon oli lisätty *Trichinella*-loisia (aikuisia sekä NBL-muotoja). Menetelmää säädettiin tutkimuksen tarpeisiin sopivaksi, ja loiset saatiin näkymään mikroskoopissa.

4.3.2 Näytteen käsittely

Ennen FLOTAC -menetelmällä tutkimista näyte otettiin pakkasesta, jossa kaikkia ulostenäytteitä säilytettiin. Kaikki tutkitut näytteet olivat sokkoutettuja, eli näytteet tutkinut henkilö ei tiennyt, minkä rotan näytettä hän kulloinkin tutki tai minä päivänä näyte oli kerätty. Ulostepusseista otettiin yksi gramma ulostetta, joka sekoitettiin yhdeksään millilitraan sinkkisulfaattia. Osa näytteistä tutkittiin yhdistäen saman rotan useamman päivän ulostetta samaan näytteeseen. Näytteitä yhdistettiin saman rotan eri päivien ulosteista enintään neljän päivän ajalta. Näytteet oli merkattu ylös niin, että tarvittaessa alkuperäiset näytteet oli helposti löydettävissä. Jokaisen näytteen käsittelyssä käytettiin puhtaita välineitä, ja FLOTAC-laitteen kappaleet pestiin jokaisen näytteen välissä vedellä ja pesuaineella.

4.3.3 Näytteen tutkiminen

Ulostenäytteen tutkiminen FLOTAC-menetelmällä aloitetaan tekemällä suspensio, jossa on yksi gramma ulostetta ja yhdeksän millilitraa kylläistä sinkkisulfaattiliuosta. Muodostunut seos kaadetaan siivilän läpi astiaan, esimerkiksi kertakäyttömukiin. Suodatettu suspensio kaadetaan koeputken, ja koeputki täytetään kymmeneen millilitraan asti sinkkisulfaatilla.

Koeputkessa olevaa suspensiota sentrifugoidaan kaksi minuuttia 1500 rpm, jolloin ulosteen suuret ja painavat partikkelit painuvat koeputken pohjalle ja ne saadaan erotettua pois näytteestä. Sentrifugoinnin jälkeen koeputkesta pipetoidaan neste FLOTAC-kammioihin. Pipetoinnissa on tärkeää, että neste imetään pipettiin aina nestepatsaan pinnasta, sillä näytteessä mahdollisesti olevat loiset ovat sentrifugoinnin aikana nousseet nesteen pintaan. Jos FLOTAC-kammiot eivät täyty näytenesteestä,

voidaan kammiot täyttää lisäämällä niihin sinkkisulfaattia. Täydet kammiot suljetaan kiertämällä kansiosaa. Näytteitä sentrifugoidaan viisi minuuttia 1000 rpm.

FLOTAC-laitteen kansiosaa kierretään sentrifugoinnin jälkeen niin, että kammioita peittävä osa siirtyy lukuikkunoiden kohdalle. Kierrettäessä laitteen kansiosaa myös näytekammion nesteen pintaosa siirtyy lukuikkunan kohdalle. Jos näytteessä on loisia, ne nousevat nesteen pintaan sentrifugoinnin aikana ja näkyvät lukuikkunassa valomikroskoopin avulla. Kammioissa olevat ruudukot auttavat loisten laskemisessa. Loisten eri kehitysasteet (aikuinen vai toukka) sekä sukupuoli ovat erotettavissa mikroskoopin avulla.

4.4 Digestio

Kokeessa käytettyjen hiirten ja rottien lihaksissa olevien *Trichinella*-toukkien eristämiseen käytettiin digestiomenetelmää. Digestion tarkoituksena on luoda keinotekoisesti mahalaukun olosuhteita vastaava ympäristö, jossa *Trichinella*-toukat vapautuvat hoivasoluistaan.

Digestio aloitetaan laittamalla tutkittava liha magneettisekoittimella varustettuun dekkaan, jossa tulee olla lisäksi vettä, suolahappoa sekä pepsiniä. Seosta digestoidaan noin 30 minuutin ajan 44–46 °C:n lämpötilassa. Seos siivilöidään digestoinnin jälkeen. Siivilöity neste kaadetaan 30 minuutin ajaksi erotussuppiloon, jossa toukat laskeutuvat suppilon pohjalle. Lientä voidaan seisottaa erotussuppilossa täristäjän kanssa, mikä nopeuttaa larvojen vajoamista suppilon pohjalle. Suppilon pohjassa olevasta hanasta toukat sisältävä sakka lasketaan mittalasiin, ja sakan annetaan seistä vielä 15 minuuttia. Mittalasin pinnalta pipetoidaan nestettä pois, ja loppu neste kaadetaan petrimaljalalle mikroskopointia varten.

4.5 Suolten tutkiminen

Lopetettujen rottien suolet tutkittiin siltä varalta, että osa loisista olisi jäljellä suolistossa seitsemän viikkoa infektoinnin jälkeen. Ruhot avattiin, suolet poistettiin ja leikattiin halki pituussuunnassa. Suolet laitettiin siivilään, joka asetettiin Falcon-putken päälle. Suolet huuhdottiin vedellä, ja nesteen annettiin valua mittalasiin. Valunut neste tutkittiin mikroskoopilla.

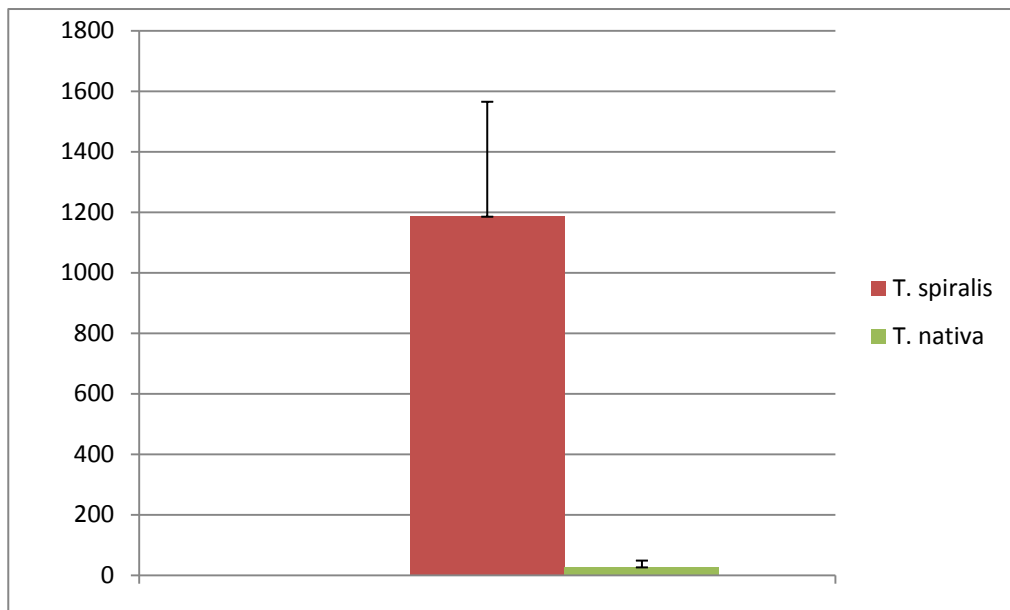
5. TULOKSET

5.1 Rottien ulosteet

Rottien ulostenäytteitä tutkittiin FLOTAC-menetelmällä yhteensä 125 kappaletta. Yhdestäkään ei löytynyt *Trichinella*-loisia.

5.2 Rottien suolet ja lihasnäytteet

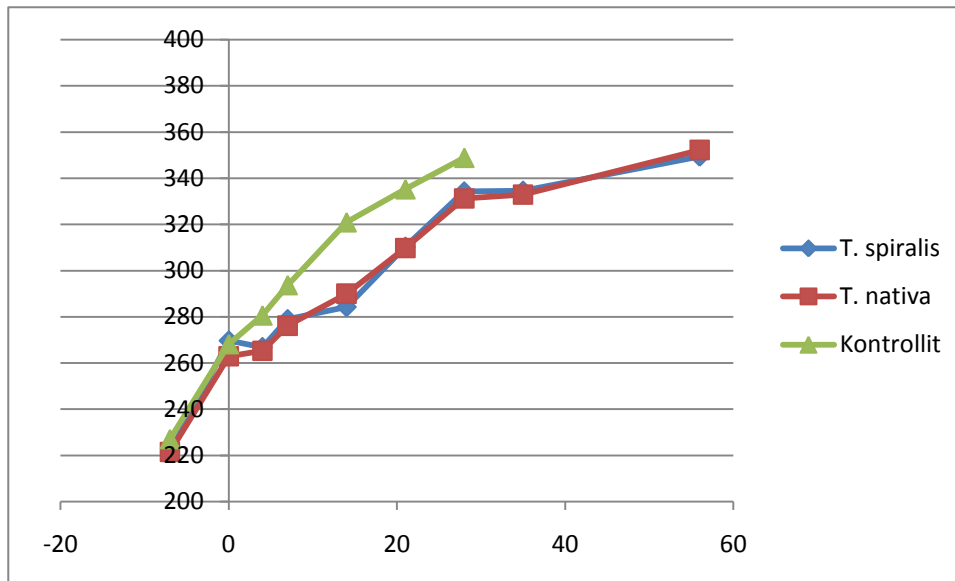
Yhdeltäkään rotalta ei löytynyt suolistosta *Trichinella*-loisia kokeen lopussa. Lihasnäytteissä todettiin loisia (Kuva 1).



Kuva 1. Infektoitujen rottien lihaksista todetut LPG-arvot. LPG-arvo kertoo, montako toukkaa on yhdessä grammassa lihasta. Kuvaan on merkattu myös keskihajonnat. P-arvo (student t-test) 0,000655.

5.2 Rottien painot

Rottien painonkehitystä on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. Rottien painonkehitys. X-akselilla 0-kohtana on infektointipäivä ja painot on kerrottu grammoina y-akselilla.

6. POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Rottien ulosteista ei löytynyt FLOTAC-menetelmällä *Trichinella*-loisia, joten on syytä miettiä tulokseen johtaneita tekijöitä. FLOTAC todettiin ennen kokeen alkua toimivaksi, koska testinäytteisiin lisätyt loiset löytyivät menetelmän avulla. On kuitenkin useita tekijöitä, jotka ovat saattaneet vaikuttaa tulokseen.

Rottien kaikki ulosteet pyrittiin keräämään, mutta koska työ tehtiin käsin, on osa ulosteista saattanut jäädä häkkeihin eikä niitä ole tutkittu. On kuitenkin epätodennäköistä, että juuri häkkeihin jääneet papanat olisivat sisältäneet kaikki ulos tulleet loiset. Jos loiset ovat tulleet ulos ryppäinä, on osa papanoista sisältänyt runsaasti loisia ja osa ollut loisettomia. Koska kaikkia ulosteita ei tutkittu, ovat runsaasti loisia sisältäneet papanat voineet jäädä tutkimatta.

Rotan luontaiseen käyttäytymiseen kuuluu omien ulosteiden syönti. Rotat elivät kokeen ajan häkeissä, joissa ne saattoivat helposti syödä ulosteitaan. Jos *Trichinella*-loisilla on taipumus kerääntyä juuri niihin papanoihin, jotka rotta syö, ovat kokeessa

kerätyt ulosteet sisältäneet vain vähän loisia. Loisten kutikula on kuitenkin hyvin kestävä, joten toiseen kertaan ruuansulatuskanavaan joutuneista loisista olisi luultavasti näkynyt jäänteitä tutkimukseen kerätyissä papanoissakin. Jos loisia on puolestaan tullut tasaisesti ulosteen mukana koko kokeen ajan, ei yhteen yhden gramman tutkittavaan näytteeseen ole osunut montaakaan loista. Jos kaikkien ulosteiden tutkiminen olisi ollut mahdollista, olisi loisia löytynyt suuremmalla todennäköisyydellä kuin tutkittaessa vain osa papanoista.

Huolimatta siitä, että vain osa papanoista tutkittiin, oli loisten löytyminen hyvin todennäköistä. Infektoitujen rottien ulosteista tutkittiin 5 % eli yhteensä 125 näytettä, joista jokainen painoi yhden gramman. Jokainen rotta infektoitiin 2000 larvalla, joten rotan päivittäiseen ulostemäärään suhteutettuna yksi gramma ulostetta sisälsi 9,7 toukkaa. Tämä tarkoittaa sitä, että tutkitusta ulostemäärästä olisi pitänyt löytyä yli 1200 larvaa, mikäli toukat olisivat tulleet ulos tasaisesti ja kehittymättä aikuisiksi. Loisten määrä ulosteessa oli todellisuudessa vieläkin suurempi ottaen huomioon aikuisiksi kehittyneiden loisten tuottamat larvat sekä kuolleet aikuiset. Koska yksi naaras voi synnyttää 500-1500 toukkaa, on loisia ollut suolessa paljon enemmän kuin pelkkä infektioannoksen loismäärä.

Näytteen käsittelyssä pyrittiin varovaisuuteen, ja jokainen näyte käsiteltiin samalla tavalla. Ennen kuin näyte pipetoidaan FLOTAC-kammioihin, on näytettä käsitelty useassa vaiheessa. *Trichinella*-loisilla on taipumus tarttua esimerkiksi muovisiin pipetin kärkiin. Jos loiset ovat näytteen käsittelyn yhteydessä kiinnittyneet välineiden tai astioiden pintoihin, eivät loiset ole päätyneet FLOTAC-kammioihin asti. Tämä on melko epätodennäköistä, sillä menetelmää testattaessa loiset päätyivät kammioihin asti, kun ulosteet ja niihin lisätyt loiset käsiteltiin samoin kuin varsinaisessa kokeessa. Jos loisten tarttuminen muovipintoihin olisi ollut ongelma, olisi kokeessa voitu käyttää välineitä, jotka eivät ole materiaaliltaan muovia. Esimerkiksi muovipipettien sijaan olisi voitu käyttää lasipipettejä. Muovipipetit olivat kuitenkin lasipipettejä käytännöllisempiä, sillä lasipipettien pesu olisi vienyt paljon aikaa.

Rotat olivat lihasnäytteiden perusteella infektoituneita, joten eläinten suolistossa on kokeen aikana varmasti ollut *Trichinella*-loisia. Rottien lopetuksen yhteydessä tutkitut

suolet eivät kuitenkaan sisältäneet loisia, joten toukkien voidaan olettaa tulleen ulosteen mukana pois rottien ruuansulatuskanavista. Jos ulosteiden tutkimiseen olisi FLOTAC-menetelmän sijaan käytetty kvantitatiivista PCR:ää, olisivat tulokset voineet olla toisenlaiset. Ulosteista olisi tällöin etsitty *Trichinella*-loisten DNA:ta. Näytteet olisivat mitä todennäköisimmin olleet positiivisia, koska loisia oli suolistossa ja niiden DNA:ta olisi siten ollut myös ulosteessa. PCR olisi ilmaissut FLOTAC-menetelmää herkemmin loisten olemassaolon ulosteissa, mutta muu informaatio olisi jäänyt puuttumaan. FLOTAC-menetelmää käytettiin, koska haluttiin selvittää ulos tulleiden loisten määrä, sukupuoli ja kehitysvaihe (aikuinen vai NBL). Lisäksi haluttiin selvittää, miten infektion alusta kulunut aika liittyy ulos tulevien loisten sukupuolijakaumaan, määrään sekä kehitysvaiheeseen. Ulosteesta olisi voitu myös etsiä *Trichinella*-antigeeneja ELISA-menetelmällä. Tällöin positiivinen tulos olisi tarkoittanut, että *Trichinella*-antigeeneja ja siten myös loisia tai niiden osia olisi ollut ulosteessa.

Rottien lihaksista lasketut LPG-arvot olivat odotusten mukaiset, sillä *T. spiralis*-lajilla infektoiduilla rotilla LPG-arvot olivat suurempia kuin rotilla, joilla oli *T. nativa*-infektio. Toisaalta lihaksista löytyneiden toukkien perusteella voidaan todeta, että infektoinnit olivat onnistuneet, ja loiset ovat lisääntyneet suolistossa.

Rottien painonkehitystä kuvaavasta kuvaajasta havaitaan mielenkiintoinen ero infektoidujen rottien ja kontrolliyksilöiden painojen kehityksessä. Infektointipäivään asti kaikkien rottien painot kohosivat tasaisesti, minkä jälkeen infektoidujen rottien painonkehitys hidastui verrattuna kontrollirottiin. Kahden infektoidun ryhmän välillä eroa kasvussa ei kuitenkaan havaita. Noin viikko infektointien jälkeen kasvuvauhti kontrollirottien ja infektoidujen eläinten välillä alkoi tasoittua, mutta infektoidut rotat jäivät pienemmiksi kuin kontrollit. Voidaan siis päätellä, että *Trichinella*-infektion alkuvaiheessa, jossa loiset pääsevät suolistoon, rotan kasvu hidastuu infektion vaikutuksesta. Kasvun hidastuminen on kuitenkin ohimenevää ja rotta jatkaa normaalia kasvua pienen notkahduksen jälkeen. Vaikutus kasvuun näyttää olevan sama, olipa infektion aiheuttajan sitten *T. nativa* tai *T. spiralis*. Käyttämämme infektoannokset oli laskettu sen mukaan, ettei rotille aiheutuisi vakavaa ja oireilevaa infektiota. Rotat söivät, joivat ja olivat virkeitä koko kokeen ajan, vaikka kasvu infektion jälkeen hidastuikin. Syytä infektoidujen rottien kasvun hidastumiselle ei voi tarkkaan

sanoa, mutta on mahdollista, että infektio häiritsee ravintoaineiden imeytymistä tai aiheuttaa huonovointisuutta ja siten hieman alentunutta ruokahalua.

Jos loisia olisi löytynyt näytteistä, olisi ollut mielekästä kuvata loisten esiintymistä ulosteissa taulukon avulla. Kahta *Trichinella*-lajia, joilla on eri infektivisyys rotassa, olisi voitu vertailla ja todeta, poistuvatko *T. nativa* -loiset nopeammin rotan suolistosta kuin *T. spiralis* -loiset. Jos poistuminen suolistosta ei eroa lajien välillä, on syytä olettaa, että rotan puolustus *T. nativa* -loista kohtaan tapahtuu parenteraalivaiheessa.

7. KIRJALLISUUSLUETTELO

- Alkarmi T, Behbehani K, Abdou S, Ooi HK (1990) Infectivity, reproductive capacity and distribution of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* larvae in experimentally infected sheep. The Japanese journal of veterinary research 38:139-46.
- Airas N, Saari S, Mikkonen T, Virtala A-M, Pellikka J, Oksanen A, Isomursu M, Kilpelä S-S, Lim CW, Sukura A (2010) Sylvatic *Trichinella* spp. infection in Finland. The Journal of parasitology 96:67-76.
- Baruch AM, Despommier DD (1991) Blood vessels in *Trichinella spiralis* infections: a study using vascular casts. The Journal of parasitology 77:99-103.
- Beck R, Mihaljević Z, Marinculić A (2005) Comparison of trichinelloscopy with a digestion method for the detection of *Trichinella* larvae in muscle tissue from naturally infected pigs with low level infections. Veterinary parasitology 132:97-100.
- Bell RG, Adams LS, Ogden RW (1984) Intestinal mucus trapping in the rapid expulsion of *Trichinella spiralis* by rats: induction and expression analyzed by quantitative worm recovery. Infection and immunity 45:267-72.
- Bell RG, Liu WM (1988) *Trichinella spiralis*: quantitative relationships between intestinal worm burden, worm rejection, and the measurement of intestinal immunity in inbred mice. Experimental parasitology 66:44-56.
- Blackwood LL, Molinari JA (1981) Dose dependence of *Trichinella spiralis*-induced immunopotentiality. International archives of allergy and applied immunology 66:55-8.
- Blaga R, Cretu CM, Gherman C, Draghici A, Pozio E, Noeckler K, Kapel CMO, Dida I, Cozma V, Boireau P (2009) *Trichinella* spp. infection in horses of Romania: serological and parasitological survey. Veterinary parasitology 159:285-9.
- Bowman DD, Frongillo MF, Johnston KB, Johnson RC (1991) Signs, larval burdens, and serological responses of dogs experimentally infected with *Trichinella spiralis* Owen, 1835. Folia parasitologica 38:245-53.
- Bruschi F, Murrell KD (2002) New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. Postgraduate medical journal 78:15-22.
- Campbell WC (1988) Trichinosis revisited--another look at modes of transmission. Parasitology today (Personal ed.) 4:83-6.
- Capó VA, Despommier DD, Polvere RI (1998) *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. The Journal of parasitology 84:209-14.

- Capó V, Despommier DD (1996) Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clinical microbiology reviews* 9:47-54.
- Cui J, Wang J, Wang Z-Q, Niu H-T (2008) Minimum dose of *Trichinella spiralis* muscle larvae to infect mice. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases* 26:73-4.
- Darwish RA, Sanad MM, Youssef SM (1996) Immunization against *Trichinella spiralis* using antigens from different life-cycle stages experimental study in mice. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 26:19-26.
- Davidson RK, Handeland K, Kapel CMO (2008) High tolerance to repeated cycles of freezing and thawing in different *Trichinella nativa* isolates. *Parasitology research* 103:1005-10.
- Dea-Ayuela MA, Rama-lñiguez S, Torrado-Santiago S, Bolas-Fernandez F (2006a) Microcapsules formulated in the enteric coating copolymer Eudragit L100 as delivery systems for oral vaccination against infections by gastrointestinal nematode parasites. *Journal of drug targeting* 14:567-75.
- Despommier Dickson (1983) *Trichinella* and trichinellosis (C W., Ed.). Plenum Press New York and London.
- Despommier Dickson (1990) *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus. *Parasitology Today* 6:193-196.
- Despommier D (1975) Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*. *The American journal of pathology* 78:477-96.
- Despommier DD (1998) How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? *Parasitology today (Personal ed.)* 14:318-23.
- Despommier DD (1993) *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *The Journal of parasitology* 79:472-82.
- deVos T, Danell G, Dick TA (1992) *Trichinella spiralis*: dose dependence and kinetics of the mucosal immune response in mice. *Experimental parasitology* 75:99-111.
- Dick TA (1983) Infectivity of isolates of *Trichinella* and the ability of an arctic isolate to survive freezing temperatures in the raccoon, *Procyon lotor*, under experimental conditions. *Journal of wildlife diseases* 19:333-6.
- Dupoy-Camet J., Robert F., Guillou J. P., Vallet C. Perret C. & Soulé C (1993) Genetic Analysis of *Trichinella* Isolates with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. In *Trichinellosis. Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis* Campbell, W. C., Pozio E. & Bruschi F. (eds). Istituto Superiore de SanitÃ Press, Rome Italy. 1994, pp. 83-88.

- Dupouy-Camet J (2000) Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary parasitology* 93:191-200.
- Dupouy-Camet J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas-Fernandez F, Pozio E (2002) Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert opinion on pharmacotherapy* 3:1117-30.
- Dupouy-Camet J, Murrell KD (2007) *FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis.* Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), World Organisation for Animal Health (OIE)
- Dworkin MS, Gamble HR, Zarlenga DS, Tennican PO (1996) Outbreak of trichinellosis associated with eating cougar jerky. *The Journal of infectious diseases* 174:663-6.
- Euroopan Unionin komission asetus (EY) N:o 2075/2005
<http://wwwb.mmm.fi/el/laki/j/2075_2005_EY_fi.pdf>, haettu 13.1.2011
- Forbes LB (2000) The occurrence and ecology of *Trichinella* in marine mammals. *Veterinary parasitology* 93:321-34.
- Frey CF, Schuppers ME, Eidam V, Boujon P, Waldvogel A, Gottstein B (2009) Occurrence of *Trichinella* spp. in wild boar in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 151:485-9.
- Gamble HR, Pyburn D, Anderson LA, Miller LE (2001) Verification of good production practices that reduce the risk of exposure of pigs to *Trichinella*. *Parasite (Paris, France)* 8:S233-5.
- Giessen J van der, Fonville M, Bouwknecht M, Langelaar M, Vollema A (2007) Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Veterinary parasitology* 148:371-4.
- Golab E, Rozej W, Wnukowska N, Rabczenko D, Masny A (2009) Detection of *Trichinella spiralis* DNA in mouse faeces during the early stage of infection. *Journal of microbiological methods* 78:213-5.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K (2009) Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical microbiology reviews* 22:127-45, Table of Contents.
- Hill DE, Forbes L, Gajadhar AA, Gamble HR (2007) Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue. *Veterinary parasitology* 146:102-6.
- Jovic S, Djordjevic M, Kulisic Z, Pavlovic S, Radenkovic B (2001) Infectivity of *Trichinella spiralis* larvae in pork buried in the ground. *Parasite (Paris, France)* 8:S213-5.
- Kapel C. M (2001) Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *J. Parasitol.* 87:309-314.

- Kapel CMO (2005) Changes in the EU legislation on *Trichinella* inspection--new challenges in the epidemiology. *Veterinary parasitology* 132:189-94.
- Kapel CMO, Measures L, Møller LN, Forbes L, Gajadhar A (2003) Experimental *Trichinella* infection in seals. *International journal for parasitology* 33:1463-70.
- Kapel CM, Pozio E, Sacchi L, Prestrud P (1999) Freeze tolerance, morphology, and RAPD-PCR identification of *Trichinella nativa* in naturally infected arctic foxes. *The Journal of parasitology* 85:144-7.
- Kjos-Hanssen B (1984) *Trichinella* isolates from polar bears in Svalbard. Freeze resistance and infectivity in rats and swine. *Nordisk veterinærmedicin* 36:57-61.
- Kotula AW, Murrell KD, Acosta-Stein L, Lamb L, Douglass L (1983) *Trichinella spiralis*: Effect of high temperature on infectivity in pork. *Experimental Parasitology* 56:15-19.
- Kotula AW, Sharar AK, Paroczay E, Gamble HR, Murrell KD, Douglass L (1990) Infectivity of *Trichinella spiralis* from frozen pork. *Journal of food protection* v. 53(7) p.
- Kozek WJ (1971) The molting pattern in *Trichinella spiralis*. I. A light microscope study. *The Journal of parasitology* 57:1015-28.
- Köller J von, Kapel CM, Enemark HL, Hindsbo O (2001) Infectivity of *Trichinella* spp. recovered from decaying mouse and fox muscle tissue. *Parasite (Paris, France)* 8:S209-12.
- Leiby DA, Duffy CH, Murrell KD, Schad GA (1990) *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission in the rat population. *The Journal of parasitology* 76:360-4.
- Lichtenfels JR, Murrell KD, Pilitt PA (1983) Comparison of three subspecies of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. *The Journal of parasitology* 69:1131-40.
- Liciardi M, Marucci G, Addis G, Ludovisi A, Gomez Morales MA, Deiana B, Cabaj W, Pozio E (2009) *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* mixed infection in a horse from Poland. *Veterinary parasitology* 161:345-8.
- Long Y-Q, Tong J-J, Qian W, Hou X-H (2010) Altered expression of intestinal cytokines in development of postinfectious irritable bowel syndrome mouse model. *Zhonghua yi xue za zhi* 90:2415-2419.
- Maa- ja metsätalousministeriön asetus nro 38/EEO/2006 liite 5.
<<http://wwwb.mmm.fi/el/laki/j/Liha-asetus.pdf> haettu 13.1.2011>, haettu 13.1.2011

- Madariaga MG, Cachay ER, Zarlenga DS (2007) A probable case of human neurotrichinellosis in the United States. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 77:347-9.
- Malakauskas A, Kapel CM, Webster P (2001) Infectivity, persistence and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. *Parasite (Paris, France)* 8:S216-22.
- Marti HP, Murrell KD (1986) *Trichinella spiralis*: antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Experimental parasitology* 62:370-5.
- McIntyre L, Pollock SL, Fyfe M, Gajadhar A, Isaac-Renton J, Fung J, Morshed M (2007) Trichinellosis from consumption of wild game meat. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 176:449-51.
- Mikkonen T, Oivanen L, Näreaho A, Helin H, Sukura A (2001) Predilection muscles and physical condition of raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) experimentally infected with *Trichinella spiralis* and *Trichinella nativa*. *Acta veterinaria Scandinavica* 42:441-52.
- Mikkonen T, Valkama J, Wihiman H, Sukura A (2005) Spatial variation of *Trichinella* prevalence in rats in Finnish waste disposal sites. *The Journal of parasitology* 91:210-3.
- Murrell KD (1985) *Trichinella spiralis*: acquired immunity in swine. *Experimental parasitology* 59:347-54.
- Murrell KD, Bruschi F (1994) Clinical trichinellosis. *Progress in clinical parasitology* 4:117 - 50.
- Møller LN, Petersen E, Kapel CMO, Melbye M, Koch A (2005) Outbreak of trichinellosis associated with consumption of game meat in West Greenland. *Veterinary parasitology* 132:131-6.
- Müller N, Sager H, Schuppers M, Gottstein B (2006) Methods for investigating *Trichinella* infections in domestic and wild animals. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 148:463-71.
- Näreaho A, Sankari S, Mikkonen T, Oivanen L, Sukura A (2000) Clinical features of experimental trichinellosis in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). *Veterinary parasitology* 91:79-91.
- Näreaho A, Saari S, Meri S, Sukura A (2009) Complement membrane attack complex formation and infectivity of *Trichinella spiralis* and *T. nativa* in rats. *Veterinary parasitology* 159:263-7.
- Oivanen L, Mikkonen T, Haltia L, Karhula H, Saloniemi H, Sukura A (2002) Persistence of *Trichinella spiralis* in rat carcasses experimentally mixed in different feed. *Acta veterinaria Scandinavica* 43:203-10.

- Oivanen L., Kapel C. M., Pozio E., La Rosa G., Mikkonen T. & Sukura A (2002) Associations between *Trichinella* species and host species in Finland. *J. Parasitol.* 88:84-88.
- Oivanen L, Mikkonen T, Sukura A (2000) An outbreak of trichinellosis in farmed wild boar in Finland. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 108:814-8.
- Oivanen L, Oksanen A (2009) Synanthropic *Trichinella* infection in Finland. *Veterinary parasitology* 159:281-4.
- Polvere RI, Kabbash CA, Capó VA, Kadan I, Despommier DD (1997) *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Experimental parasitology* 86:191-9.
- Pozio E (2000) Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Veterinary parasitology* 93:241-62.
- Pozio E (2001) New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary parasitology* 98:133-48.
- Pozio E (1998) Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitology today (Personal ed.)* 14:35-8.
- Pozio E, Bandi C, La Rosa G, Jarvis T, Miller I, Kapel CM (1995) Concurrent infection with sibling *Trichinella* species in a natural host. *International journal for parasitology* 25:1247-50.
- Pozio E, La Rosa G, Murrell KD, Lichtenfels JR (1992a) Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *The Journal of parasitology* 78:654-9.
- Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell KD (1992b) Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *The Journal of parasitology* 78:647-53.
- Pozio E, Serrano FJ, La Rosa G, Reina D, Perez-Martin E, Navarrete I (1997) Evidence of potential gene flow in *Trichinella spiralis* and in *Trichinella britovi* in nature. *The Journal of parasitology* 83:163-6.
- Pozio E., Marucci G., Casulli A., Sacchi L., Mukaratirwa S. & Foggin C. M. (2004) *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* induce infection in experimentally infected varans, caimans, pythons and turtles. *Parasitology* 128:333-342
- Pozio E, Murrell P (2006) Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology* 63:367-439.
- Pozio E, Nöckler K, Hoffman L, Voigt WP (2000) Autochthonous and imported *Trichinella* isolates in Germany. *Veterinary parasitology* 87:157-61.

- Pozio E. & La Rosa G (2000) *Trichinella murrelli* n. sp: Etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J. Parasitol. 86:134-139.
- Pozio E, Rosa GL (2005) Evaluation of the infectivity of *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* for equatorial freshwater fishes. Veterinary parasitology 132:113-4.
- Pozio E, Tamburrini A, La Rosa G (2001) Horse trichinellosis, an unresolved puzzle. Parasite (Paris, France) 8:S263-5.
- Pozio E, Zarlenga DS (2005) Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. International journal for parasitology 35:1191-204.
- Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS (2009) Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 9:606-16.
- Robinson HA, Olsen OW (1960) The Role of Rats and Mice in the Transmission of the Porkworm, *Trichinella spiralis* (Owens, 1835) Raillett, 1895. The Journal of Parasitology 46:589 - 597.
- Rosenthal BM, LaRosa G, Zarlenga D, Dunams D, Chunyu Y, Mingyuan L, Pozio E (2008) Human dispersal of *Trichinella spiralis* in domesticated pigs. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases 8:799-805.
- Schad GA, Duffy CH, Leiby DA, Murrell KD, Zirkle EW (1987) *Trichinella spiralis* in an Agricultural Ecosystem: Transmission under Natural and Experimentally Modified On-Farm Conditions. The Journal of Parasitology 73:95 - 102.
- Schmitt N, Saville JM, Greenway JA, Stovell PL, Friis L, Hole L (1978) Sylvatic trichinosis in British Columbia: potential threat to human health from an independent cycle. Public health reports (Washington, D.C. : 1974) 93:189-93.
- Silberstein DS, Despommier DD (1984) Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 132:898-904.
- Smith HJ (1987a) Vaccination of rats and pigs against *Trichinella spiralis spiralis* using the subspecies, *T. spiralis nativa*. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire 51:370-2.
- Smith HJ, Kay ED (1987b) Role of Rats in the Transmission of *Trichinella spiralis spiralis* to Swine. The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne 28:604.

- Smith HJ, Snowdon KE, Finley GG, Laflamme LF (1990) Pathogenesis and serodiagnosis of experimental *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis nativa* infections in cattle. Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire 54:355-9.
- Soulsby EJ, Mönning HO. Helminths, arthropods, & protozoa of domesticated animals. 6. p. Williams and Wilkins Co. , Baltimore 1968.
- Stewart GL, Read CP (1974) Studies on biochemical pathology in trichinosis. I. Changes in myoglobin, free creatine, phosphocreatine, and two protein fractions of mouse diaphragm muscle. The Journal of parasitology 60:996-1000.
- Sukhdeo MV (1991) The relationship between intestinal location and fecundity in adult *Trichinella spiralis*. International journal for parasitology 21:855-8.
- Sukhdeo MV, Croll NA (1981) The location of parasites within their hosts: factors affecting longitudinal distribution of *Trichinella spiralis* in the small intestine of mice. International journal for parasitology 11:163-8.
- Sukura A, Nareaho A, Mikkonen T, Niemi M, Oivanen L (2002) *Trichinella nativa* and *T. spiralis* induce distinguishable histopathologic and humoral responses in the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*). Veterinary pathology 39:257-65.
- Sukura A, Näreaho A, Veijalainen P, Oivanen L (2001) Trichinellosis in farmed wild boar: meat inspection findings and seroprevalence. Parasite (Paris, France) 8:S243-5.
- Suzuki T, Sasaki T, Takagi H, Sato K, Ueda K (2008) The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. Parasitology research 103:1289-95.
- Takumi K, Franssen F, Fonville M, Grasset A, Vallée I, Boireau P, Teunis P, Giessen J van der (2010) Within-host dynamics of *Trichinella spiralis* predict persistent parasite transmission in rat populations. International journal for parasitology 40:1317-24.
- Taylor (2007) Veterinary Parasitology. In: Veterinary Parasitology. 3rd edn. Blackwell Publishing, pp 9-10, 302, 324-326.
- Theodoropoulos G, Kapel CM, Webster P, Saravanos L, Zaki J, Koutsotolis K (2000) Infectivity, predilection sites, and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. Parasitology research 86:401-5.
- Theodoropoulos G, Styliara M, Petrakos M, Kapel CMO (2003) Effect of fox, pig, sheep, and poultry bile on the establishment of domestic and sylvatic species of *Trichinella* in rats. Parasitology 126:461-4.

Wacker K, Rodriguez E, Garate T, Geue L, Tackmann K, Selhorst T, Staubach C, Conraths FJ (1999) Epidemiological analysis of *Trichinella spiralis* infections of foxes in Brandenburg, Germany. *Epidemiology and infection* 123:139-47.

Webster P, Malakauskas A, Kapel CMO (2002) Infectivity of *Trichinella papuae* for experimentally infected red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary parasitology* 105:215-8.