



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

TRICHINELLA SPIRALIS ΣΤΑ ΚΡΕΑΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Συγγραφέας

Κουρρής Κωνσταντίνος

ΑΜ: 17117

Επιβλέπων καθηγητής

Μάντης Φώτιος

Αθήνα, Ιούλιος 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

TRICHINELLA SPIRALIS ΣΤΑ ΚΡΕΑΤΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

Εξεταστική Επιτροπή

Α/Α	Όνοματεπώνυμο	Υπογραφή
01	Μάντης Φώτιος	
02	Παπαδοπούλου Όλγα	
03	Τσάκαλη Ευσταθία	

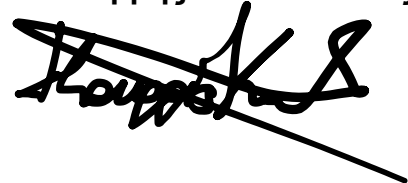
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **Κουρρής Κωνσταντίνος** του **Γεωργίου**, με αριθμό μητρώου **17117** φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής **Επιστήμης Τροφίμων** του Τμήματος **Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών
Κουρρής Κωνσταντίνος



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΙΝΑΚΕΣ	6
ΕΙΚΟΝΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΣΚΟΠΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
TRICHINELLA SPIRALIS.....	10
1.1 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ TRICHINELLA SPIRALIS.....	10
1.2 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ TRICHINELLA SPIRALIS ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	17
ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗ.....	17
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	17
2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	18
2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΥΚΛΟΙ.....	20
2.3 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ	21
2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ	22
2.5 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ.....	23
2.6 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ TRICHINELLA SPIRALIS	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:.....	27
ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ - ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	27
3.1 ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ.....	27
3.2 ΣΥΣΤΗΜΑ HACCP	30
3.3 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ TRICHINELLA SPIRALIS.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	33
ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	33
4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΨΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	33
4.1.1 Μέθοδος αναφοράς: Πέψη ομάδων δειγμάτων με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα	33
4.1.2 Μέθοδος της μηχανικά υποβοηθούμενης πέψης ομάδας δειγμάτων/ τεχνική της απομόνωσης με καθίζηση.....	34
4.1.3 Μέθοδος της αυτόματης πέψης για ομαδικά δείγματα μέχρι 35g	35
4.1.4 Πέψη συγχωνευμένων (ή συνενωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο μαγνητικού αναδευτήρα/ «απομόνωση σε ηθμό» και ανίχνευση προνυμφών με δοκιμασία συγκόλλησης του λατέξ.....	36

4.1.5 Δοκιμή τεχνητής πέψης για <i>in vitro</i> ανίχνευση προνυμφών <i>Trichinella spp</i> σε δείγματα κρέατος, PrioCHECK <i>Trichinella</i> AAD Kit.....	37
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ	37
4.2.1 Τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων	38
4.2.2 ELISA	39
4.2.3 Δοκιμασία <i>Western blot</i>	41
4.2.3 Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης <i>Trichinella</i>	42
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Παραδείγματα τριχινέλλωσης	18
Πίνακας 2: Αντικαρκινική δράση <i>T. spiralis</i>	25
Πίνακας 3: ELISA αντιγόνα για ανίχνευση αντισώματος <i>Trichinella</i>	39

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Είδη <i>Trichinella</i> στην υφήλιο.....	12
Εικόνα 2: Στάδια ανάπτυξης <i>Trichinella spiralis</i> . Α) Ενήλικες σκώληκες και νεογέννητες προνύμφες Β) Προνύμφες σε μυϊκό ιστό σε θύλακα Γ) Ενήλικος σκώληκας	13
Εικόνα 3: Δομή ενηλίκων σκωλήκων <i>Trichinella spiralis</i> (a) αρσενικό άτομο (b) θηλυκό άτομο.....	14
Εικόνα 4: Κύκλος ζωής <i>T. spiralis</i>	16
Εικόνα 5: Μετάδοση και κύκλος ζωής <i>Trichinella</i>	21
Εικόνα 6: Μικροσκοπική εξέταση στα 100μm Α) Ανεπαρκή βήματα έκπλυσης, διακρίνονται προνύμφες <i>Trichinella</i> , αλλά όχι καθαρά. Β) Επαρκή βήματα έκπλυσης	34
Εικόνα 7: Beta tyvelose	40
Εικόνα 8: Western blot ανάλυση για δείγματα χοίρου Α) αρνητικά σε <i>Trichinella</i> Β) θετικά σε <i>Trichinella</i> C) θετικά σε άλλα νηματώδη παράσιτα	42
Εικόνα 9: Σχηματικά αναπαράσταση της μεθόδου ChLIA	43
Εικόνα 10: Αρχή ,λειτουργίας MALDI-TOF	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει σαν θέμα την *Trichinella spiralis* στα κρεατικά σκευάσματα. Πρόκειται για ένα νηματώδες παράσιτο που μολύνει πολλά θηλαστικά και μέσω της τροφικής αλυσίδας μεταδίδεται και στον άνθρωπο. Οι ώριμες προνύμφες εισέρχονται στο γαστρεντερικό σύστημα, εγκαθίστανται στη βλεννογόνο του λεπτού εντέρου, μετατρέπονται σε ενήλικες σκώληκες, αναπαράγονται και οι νεογέννητες προνύμφες μεταφέρονται στους σκελετικούς μύες, όπου εγκαθίστανται. Η συχνότερη αιτία για την ανθρώπινη μόλυνση, γνωστή ως τριχινέλλωση, είναι η κατανάλωση ωμού ή μη σωστά μαγειρεμένου χοιρινού κρέατος. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές περιστατικών που σχετίζονται με την κατανάλωση κρέατος αλόγου, θηραμάτων ή ακόμη και θαλάσσιων θηλαστικών. Η αντιμετώπιση της τριχινέλλωσης είναι τόσο πιο αποτελεσματική όσο πιο έγκαιρα γίνεται. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει κανονισμούς που καθορίζουν τις απαιτήσεις υγιεινής για τα ζωικά σκευάσματα απέναντι στους βιολογικούς κινδύνους, αλλά και συγκεκριμένα απέναντι στην *Trichinella*. Η προστασία του καταναλωτή από την μόλυνση με *T. spiralis* είναι ευθύνη της μονάδας εκτροφής των ζώων που θα οδηγηθούν σε σφαγή, των σφαγείων, των μονάδων επεξεργασίας του κρέατος, των αρμόδιων αρχών ελέγχου, αλλά και του ίδιου του ατόμου που πρέπει να φροντίζει να μην καταναλώνει δυνητικά επικίνδυνα προϊόντα. Η ανίχνευση του μολυσμένου κρέατος ή κρεατοσκευάσματος μπορεί να γίνει με μεθόδους πέψης όπου ελευθερώνονται οι ώριμες προνύμφες και ελέγχεται μικροσκοπικά η παρουσία τους, με μεθόδους ανίχνευσης αντισωμάτων, όπως η ELISA ή το τεστ Western blot.

SUMMARY

This dissertation deals with *Trichinella spiralis* in meat preparations. It is a nematode parasite that infects many mammals and is transmitted to humans through the food chain. Mature larvae enter the gastrointestinal tract, settle in the mucosa of the small intestine, turn into adult worms, reproduce and the newborn larvae are transported to the skeletal muscles, where they settle. The most common cause of human infection, known as trichinosis, is the consumption of raw or improperly cooked pork. However, there are reports of cases related to the consumption of horse meat, prey or even marine mammals. The treatment of trichinosis is as effective as possible. The European Union has adopted regulations laying down the hygiene requirements for animal preparations against biological hazards, but also specifically for *Trichinella*. Protecting the consumer from *T. spiralis* infection is the responsibility of the slaughterhouse, the slaughterhouses, the meat processing plants, the competent control authorities, but also the person who must take care not to consume potentially dangerous products. Detection of contaminated meat or meat products can be detected by digestion methods where mature larvae are released and their presence is microscopically monitored by antibody detection methods such as ELISA or the Western blot test.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη του *Trichinella spiralis* στα κρεατικά σκευάσματα. Πρόκειται για ένα νηματώδες παράσιτο, όπου εξετάζεται η βιολογία και η επιδημιολογία του, καθώς και η διαχείριση της ασφάλειας των κρεατικών σκευασμάτων και οι τρόποι ανίχνευσης και αντιμετώπισής του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

TRICHINELLA SPIRALIS

1.1 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ TRICHINELLA SPIRALIS

Το γένος *Trichinella* αποτελείται από εννέα διαφορετικά είδη και μέχρι στιγμής υπάρχουν αναφορές για τέσσερις επιπλέον γονότυπους, που ακόμη δεν έχουν ταξινομικά καθοριστεί (Rainova et al, 2016). Μία διάκριση σε δύο ομάδες (clades) γίνεται ανάλογα με το αν κύτταρα του ξενιστή στα οποία εγκαθίστανται περιβάλλονται από έναν θύλακα (ενθυλακωμένα - encapsulated) ή όχι (μη ενθυλακωμένα - non-encapsulated) (Ng-Nguyen et al, 2017). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα είδη: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. patagoniensis* και *T. chanchalensis* και τους γονότυπους T6, T8, T9 (Ribicich et al, 2021; ICT, 2022a)

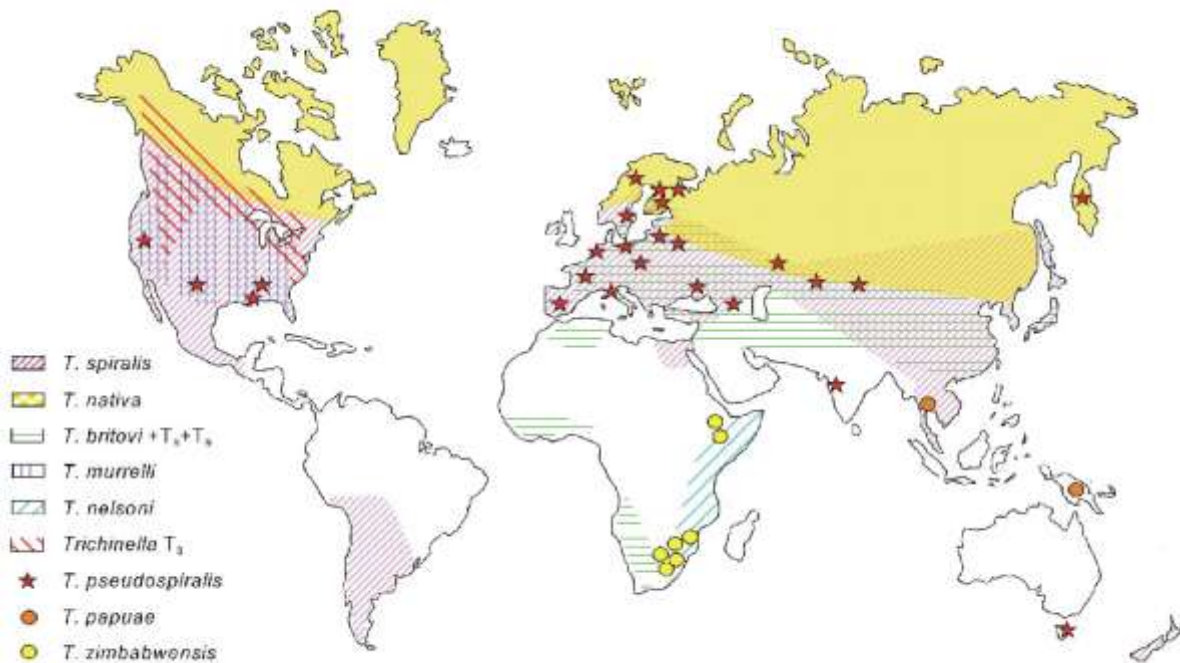
- *T. spiralis* (T-1) είναι το πιο διαδεδομένο και αναγνωρίσιμο είδος παγκοσμίως. Ανιχνεύεται σε σαρκοφάγα και παμφάγα ζώα και είναι πολύ μολυσματικό για χοίρους, αγριόχοιρους, και τρωκτικά.
- *T. nativa* (T-2) είναι ένα είδος που έχει προσαρμοστεί καλά στο ψυχρό κλίμα, ακόμη και σε συνθήκες κατάψυξης και μολύνει τους ανθρώπους σε αρκτικές και υποαρκτικές περιοχές. Δεν αποτελεί σοβαρό μολυσματικό κίνδυνο για τους χοίρους, αλλά απαντάται πιο συχνά σε άγρια κυνοειδή, αρκούδες και θαλάσσιους ίππους.
- *T. britovi* (T-3) ανιχνεύεται κυρίως σε άγρια ζώα, αν και δεν αποκλείεται η περιστασιακή μόλυνση σε χοίρους ή άλογα. Είναι ευρέως διαδεδομένο στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης και της Ασίας. Είναι το είδος εκείνο συσχετίζεται με τα θηράματα και την ανθρώπινη μόλυνση μετά από κατανάλωση μισοψημένων κρεάτων θηραμάτων.
- *T. murrelli* (T-5) έχει εντοπισθεί σε άγρια ζώα στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε περιοχές του Καναδά. Δεν υπάρχουν αναφορές που να αφορούν χοίρους ή άλογα. Μπορεί να μολύνει τον άνθρωπο όταν καταναλώσει ένα άγριο ζώο (θήραμα) που δεν το έχει μαγειρέψει επαρκώς.

- *T. nelsoni* (T-7) έχει απομονωθεί σποραδικά από τα άγρια ζώα στην Αφρική. Αντέχει σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τα υπόλοιπα είδη *Trichinella* (2-3° C μεγαλύτερες)
- Ο γονότυπος T-6 έχει εντοπισθεί σε σαρκοφάγα ζώα της Βόρειας Αμερικής και στον Καναδά. Έχει παρόμοια αντοχή με το *T. nativa* στο ψύχος και ανέχεται συνθήκες κατάψυξης, επιβιώνοντας στο ζωικό ιστό αλλά γεωγραφικά δεν εκτείνεται τόσο βόρεια. Διακρίνεται από το *T. nativa*, καθώς έχει διαφορετικούς βιοχημικούς και μοριακούς χαρακτήρες.
- Ο γονότυπος T-8 έχει αναφερθεί μόνο στην Αφρική. Έχει κοινά χαρακτηριστικά με το *T. britovi*, αλλά μπορεί να διακριθεί λόγω διαφορετικών βιοχημικών και μοριακών χαρακτήρων.
- Ο γονότυπος T-9 έχει αναφερθεί στην άγρια ζωή της Ιαπωνίας και μπορεί να διαφοροποιηθεί από το *T. britovi* με μοριακές μεθόδους.

Στη δεύτερη ομάδα, των μη ενθυλακωμένων ειδών ανήκουν τα *T. pseudospiralis*, *T. parvae* και *T. zimbabwensis* (ICT, 2022a):

- Το *T. pseudospiralis* έχει ταυτοποιηθεί σε αρπακτικά πτηνά, άγρια σαρκοφάγα ζώα, συμπεριλαμβανομένων αγριόχοιρων, αρουραίων και μαρσιποφόρων στην Ευρώπη, την Ασία, τη Βόρεια Αμερική και Αυστραλία. Έχουν αναφερθεί αρκετές επιδημίες σε ανθρώπους στις οποίες υπεύθυνο είναι το *T. pseudospiralis*.
- Το *T. parvae* έχει ανιχνευθεί τόσο σε οικόσιτους χοίρους όσο και σε αγριόχοιρους. Επίσης, έχει εντοπισθεί σε κροκόδειλους θαλασσινού νερού, οι οποίοι πιθανολογείται ότι κατανάλωσαν μολυσμένο χοιρινό κρέας, στην Παπούα Νέα Γουινέα. Έχουν αναφερθεί περιστατικά τριχινέλωσης σε ανθρώπου από την κατανάλωση κρέατος χελώνας και σαύρας. Θεωρείται πιθανόν το *T. parvae* να είναι υπεύθυνο για αυτές τις μολύνσεις καθώς έχει την ικανότητα να μολύνει ερπετά.
- Το *T. zimbabwensis* είναι παρόμοιο με το *T. parvae* στην ικανότητά του να μολύνει ερπετά και άγρια σαρκοφάγα. Έχει αναφερθεί σε πολλά μέρη της Αφρικής, αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν ότι έχει εμπλακεί σε ανθρώπινες ασθένειες.

Στην παρακάτω εικόνα 1 διακρίνεται η κατανομή των διαφορετικών ειδών στον παγκόσμιο χάρτη.



Εικόνα 1: Είδη Trichinella στην υφήλιο

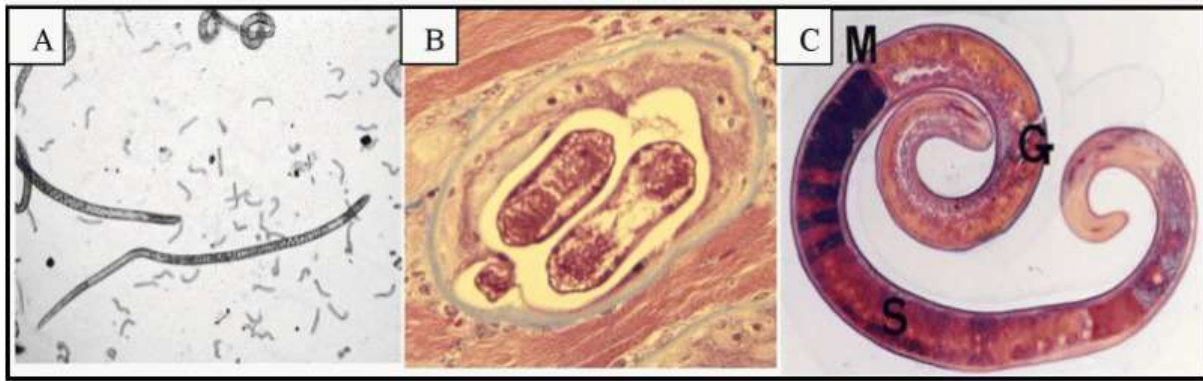
Πηγή: http://www.trichinellosis.org/Distribution___Transmiss.html

1.2 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ TRICHINELLA SPIRALIS ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Είναι παρασιτικός οργανισμός που αναπτύσσεται μέσα σε σπονδυλωτό ξενιστή. Ένα μολυσμένο ζώο μπορεί να χρησιμεύσει ως ξενιστής το ίδιο, αλλά μπορεί και να λειτουργήσει ως ενδιάμεσο για τη μόλυνση άλλων ζώων (Wu et al., 2020)

Τα στάδια ανάπτυξης είναι (CDC, 2017) (εικόνα 2):

- Νεογέννητες προνύμφες.
- Προνύμφες
- Ενήλικα σκουλήκια.

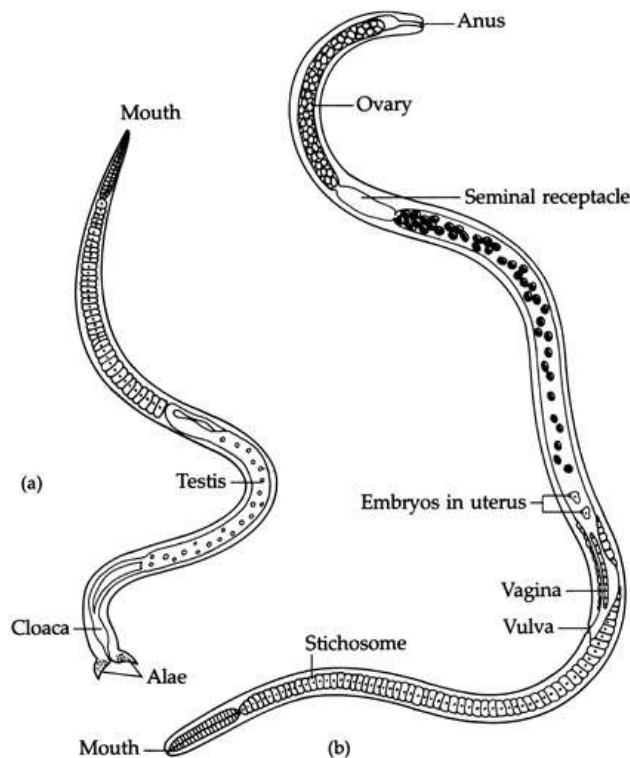


Εικόνα 2:Στάδια ανάπτυξης *Trichinella spiralis*. Α) Ενήλικες σκώληκες και νεογέννητες προνύμφες Β)Προνύμφες σε μυϊκό ιστό σε θύλακα Γ) Ενήλικος σκώληκας

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19691/>

Οι ενήλικες σκώληκες εξελίσσονται από τις νεογέννητες προνύμφες εντός 20 ημερών και μπορούν να παραμείνουν στον μυϊκό ιστό για μεγάλα διαστήματα. Τα ενήλικα και πλήρως ανεπτυγμένα σκουλήκια *Trichinella* διαθέτουν έναν χαρακτηριστικό στιχοσωμικό (stichosome) οισοφάγο. Πρόκειται για έναν τριχοειδές σωλήνα που περιβάλλεται από μία σειρά αδενικών κυττάρων (στιχοκύτταρα - stichocytes). Τα αρσενικά σκουλήκια του *T. spiralis* έχουν μήκος που κυμαίνεται από 1,4 ως 1,6 mm, ενώ η διάμετρος τους είναι περίπου 40 μm. Στο οπίσθιο κυρτό άκρο υπάρχουν δύο κωνικές προεξοχές, δύο λοβωτά μέρη που ονομάζονται alae. Δεν σχηματίζουν σπείρες (εικόνα 3a) (Marchiondo et al., 2019). Το αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού *T. spiralis*, βρίσκεται στο οπίσθιο τρίτο τμήμα του σώματος και φέρει ενσωματωμένο τον όρχι του παρασίτου (Bogitsh et al., 2013).

Αμέσως μετά τη σύζευξη, το αρσενικό περνά έξω από τον ξενιστή, ενώ το θηλυκό διεισδύει βαθύτερα στον βλεννογόνο και τον υποβλεννογόνο, ενώ μερικές φορές εισχωρεί στους λεμφικούς πόρους για να μεταφερθεί στους μεσεντέριους λεμφαδένες



Εικόνα 3: Δομή ενηλίκων σκωλήκων *Trichinella spiralis* (a) αρσενικό άτομο (b) θηλυκό άτομο

Πηγή:

https://www.bugando.ac.tz/schools/parasitology/assets/pages/handouts/Handouts%20helminths/16.trichinella_dracunculus_complete.pdf

Τα θηλυκά σκουλήκια του *T. spiralis* είναι ζωτόκα με μήκος 3 ως 4 mm και διάμετρο 60 μm (μεγαλύτερες διαστάσεις από τα αρσενικά) και μπορούν να παραμείνουν στο έντερο του ξενιστή για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται μεταξύ 6 και 8 εβδομάδες. Το οπίσθιο άκρο είναι αμβλύ και στρογγυλεμένο. Τα γονιμοποιημένα ωάρια έχουν μέγεθος 40x30 μm και εκκολάπτονται στη μήτρα (εικόνα 3b). Υπολογίζεται ότι ένα και μόνο ενήλικο θηλυκό *T. spiralis* μπορεί να παράγει 1.500 προνύμφες μέσα σε 5 ως 10 ημέρες. Τελικά το θηλυκό που έχει διεισδύσει βαθιά στις λάχνες του λεπτού εντέρου πεθαίνει (Bogitsh et al., 2013).

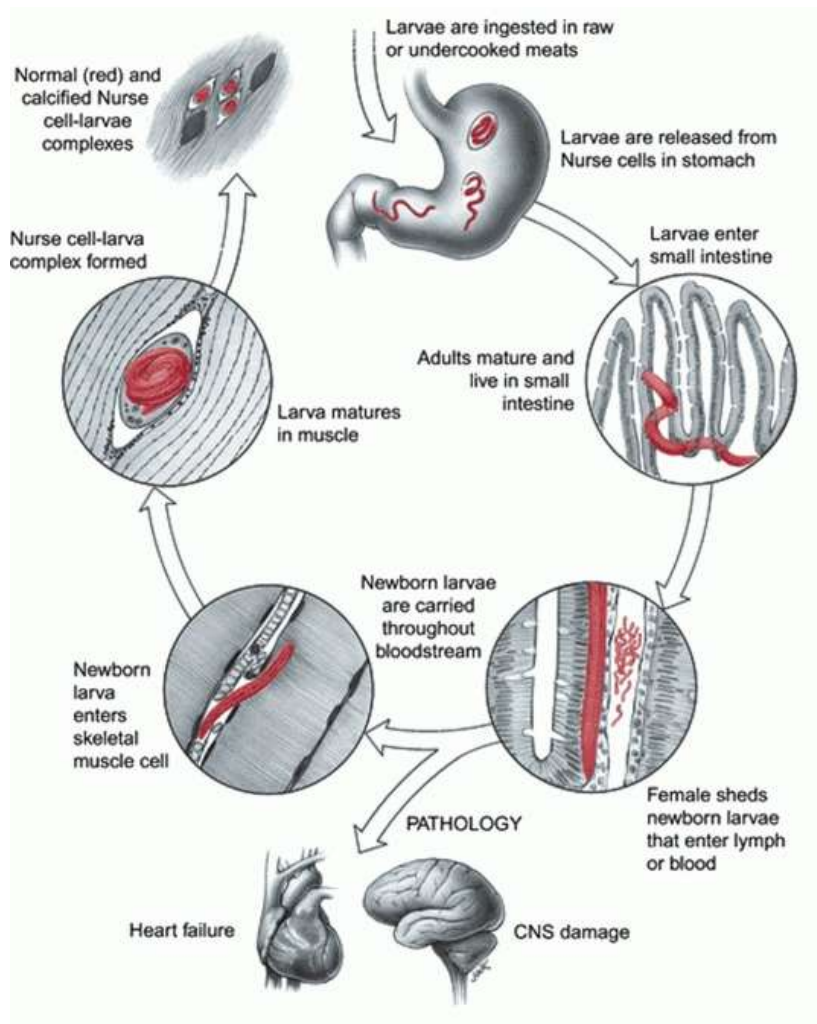
Κάθε νεογέννητη – ανώριμη προνύμφη που εισέρχεται στα λεμφικά αγγεία στη συνέχεια μεταναστεύει στους γραμμωτούς μύες, όπως του διαφράγματος, της γνάθου, της γλώσσας, του λάρυγγα και των ματιών, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η είσοδος στο μυϊκό κύτταρο πραγματοποιείται μόλις 1 ώρα αφότου η ανώριμη προνύμφη περάσει στην κυκλοφορία του αίματος (5 ως 6 ημέρες μετά την ημέρα μόλυνσης) Εκεί, διεισδύουν βίαια και μηχανικά στη μυϊκή ίνα (τυλιγμένα σε σπειροειδή ή σε σχήμα κουλουριού), και ουσιαστικά «επαναπρογραμματίζουν» τα κύτταρα του

ξενιστή ώστε να τους επιτρέψουν την επιβίωσή τους. Τα μυοϊνίδια (myofilaments) στην περιοχή διείσδυσης ουσιαστικά καταστρέφονται, τα μιτοχόνδρια εκφυλίζονται, το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο οδηγείται σε αύξηση και οι πυρήνες σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα που περιβάλλει την προνύμφη. Λίγο αργότερα παράγεται κολλαγόνο από γειτονικούς ινοβλάστες και οι προνύμφες περιβάλλονται από το κολλαγόνο. Το κολλαγόνο, οι πυρήνες και η προνύμφη δημιουργούν έναν σχηματισμό που μοιάζει με κύστη (κύτταρο νοσηλευτής – nurse cell (Bogitsh et al., 2013; Marchiondo et al., 2019;)).

Η προνύμφη που έχει εγκατασταθεί στα μυϊκά κύτταρα αναπτύσσεται με ταχύ ρυθμό και καθώς το μήκος της αυξάνει αναδιπλώνεται. Το μήκος της γίνεται περίπου 1 mm μέσα σε διάστημα 8 εβδομάδων, οπότε και την περίοδο αυτή γίνεται μολυσματική. Η ενθυλάκωση ξεκινά περίπου την 21^η ημέρα από τη στιγμή της μόλυνσης του ξενιστή. Σταδιακά ο ξενιστής δημιουργεί μία κάψουλα, ελλειψοειδούς σχήματος γύρω από το κύτταρο νοσηλευτή, μήκους 0,25 ως 0,5 mm. Η εξωτερική μεμβράνη της κάψουλας προέρχεται από το σαρκόλημμα, (μεμβράνη που περιβάλλει τα ραβδωτά κύτταρα των μυικών ινών) ενώ η εσωτερική μεμβράνη είναι ένας συνδυασμός εκφυλιστικών μυοϊνών και άλλων κυττάρων όπως οι ινοβλάστες. Ο σχηματισμός της κάψουλας ολοκληρώνεται σε περίπου 3 μήνες. (Bogitsh et al., 2013).

Η κάψουλα σχεδόν 6 μήνες μετά την αρχική μόλυνση, ξεκινάει να ασβεστοποιείται. Πρόκειται για μία διαδικασία που αν διεξαχθεί ομαλά, ολοκληρώνεται σε ένα διάστημα περίπου 18 μηνών. Μόλις η προνύμφη αποκοπεί από το περιβάλλον, πεθαίνει. Ωστόσο, αν η ασβεστοποίηση καθυστερήσει, η ώριμη προνύμφη μπορεί να παραμείνει μολυσματική για χρόνια (Marchiondo et al., 2019).

Στην εικόνα 4, διακρίνονται τα στάδια ανάπτυξης της *T.spiralis*, από τη στιγμή που οργανισμός έχει καταναλώσει μολυσμένο κρέας και η ενθυλακωμένη προνύμφη εισέρχεται στο γαστρεντερικό σύστημα του ξενιστή, εκκρίνεται και ξεκινάει η μόλυνση μέχρι το στάδιο, όπου οι ώριμες προνύμφες έχουν δημιουργήσει θύλακες στο μυϊκά κύτταρα του ξενιστή.



Εικόνα 4: Κύκλος ζωής *T. axei*

Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19691/>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το *Trichinella spiralis* είναι ένα εντερικό νηματώδη παράσιτο με την ικανότητα να μολύνει πολλά θηλαστικά, όπως τους χοίρους, τα άλογα, τα ερπετά, τα πτηνά αλλά και τον άνθρωπο. Η τριχινέλλωση είναι τροφιμογενής ζωνόσος που μπορεί να προκύψει από την κατανάλωση ακατάλληλα μαγειρεμένου ή ωμού κρέατος οικόσιτων ζώων, αλλά και από την κατανάλωση κρέατος άγριων θηραμάτων, τα οποία περιέχουν μυϊκές προνύμφες. Ορισμένες αναφορές αναφέρουν μια περιστασιακή μόλυνση με την κατάποση κρέατος ερπετών, συμπεριλαμβανομένων σαυρών και χελωνών. Δεν υπάρχουν αναφορές για μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο (Wu et al., 2020).

Ιστορικά, η τριχινέλλωση θεωρούνταν ασθένεια που μεταδιδόταν στον άνθρωπο από τους χοίρους. Πιο πρόσφατα, οι αυξημένοι έλεγχοι και οι καλύτεροι μέθοδοι ανίχνευσης έχουν οδηγήσει σε μείωση των λοιμώξεων που προέρχονται από το χοιρινό του εμπορίου, αλλά έχει αυξηθεί η συχνότητα των λοιμώξεων από άγρια θηράματα. Στις πιο εύκρατες ζώνες, η αρκούδα, ο αγριόχοιρος και η αλεπού έχουν εμπλακεί σε λοιμώξεις τριχινέλλωσης, ενώ στις περιοχές με χαμηλές θερμοκρασίες πιο κοινές είναι οι λοιμώξεις από αρκούδα, φώκια, θαλάσσιο ίππο και iguana, το οποίο είναι ένα είδος ζυμωμένο κρέας από θαλάσσια θηλαστικά. Στο παρελθόν, πίστευαν ότι οι αρουραίοι και άλλα τρωκτικά λειτουργούσαν ως ενδημικές δεξαμενές της *Trichinella* για τις κτηνοτροφικές μονάδες. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα τρωκτικά είναι στην πραγματικότητα περισσότερο ένας τυχαίος ξενιστής (Marchiondo et al., 2019).

Το είδος *Trichinella* που συχνότερα φαίνεται να εμπλέκεται σε μόλυνση των ανθρώπων είναι το *Trichinella spiralis* και ακολουθεί το *T. britovi*, ενώ έχουν περιστασιακά ανιχνευθεί τα *T. nativa*, *T. nelson*, , *T. pseudospiralis*, *T. murelli*, *T. papuae* (Rainova et al, 2016).

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η τριχινέλλωση εμφανίζεται σε όλη την υφήλιο και οι εκτιμήσεις που γίνονται είναι ότι κατά μέσω ετησίως παρουσιάζονται περίπου 10.000 περιπτώσεις, αλλά με μικρό ποσοστό θνησιμότητας, περίπου 2%. Σε χώρες όπου το σύστημα υγειονομικής περίθαλψης είναι υπό ανάπτυξη, τα δεδομένα και η αναφορά των περιπτώσεων ασθένειας μπορεί να είναι ανακριβή και περιορισμένα (Biska-Zajac et al., 2021).

Οι Murrell & Pozio, (2011) ανέλυσαν τα επίσημα καταγεγραμμένα περιστατικά επιδημιών τριχινέλλωσης για τη χρονική περίοδο 1986-2009 από έξι διεθνείς βάσεις δεδομένων. Από τις 494 αναφορές που εντοπίστηκαν, επιλέχθηκαν για τη μελέτη οι 261, οι οποίες θεωρήθηκαν επαρκώς αξιόπιστες. Τα στοιχεία έδειξαν ένα σύνολο 65.818 κρουσμάτων και 42 θανάτων από 41 χώρες. Στην Ευρώπη εντοπίστηκε το μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων (87%) εκ των οποίων το 50% αυτών καταγράφηκαν στη Ρουμανία, κυρίως κατά την περίοδο 1990–1999 (20.059 περιστατικά). Η μέση ηλικία των ατόμων που εμφάνισαν τριχινέλλωση ήταν 33,1 έτη και δεν υπήρξε σημαντική διάκριση μεταξύ ανδρών (51%) και γυναικών (49%) (Murrell & Pozio, 2011).

Τα κρούσματα συνήθως τείνουν να εμφανίζονται σε ομάδες ανθρώπων που έχουν καταναλώσει το μολυσμένο κρέας από ένα κοινό ζώο, συχνά χοιρινό. Ο μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων φαίνεται να είναι στην Κίνα, όπου η κατανάλωση χοίρων είναι η υψηλότερη στον κόσμο. Στην Αρκτική, οι πολικές αρκούδες, οι φώκιες και ο θαλάσσιος ίππος έχουν αναγνωρισθεί ως φορείς *Trichinella*. Επίσης, τα τελευταία χρόνια, ο περιορισμός της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, επέτρεψε την αύξηση της *Trichinella* στον ευρωπαϊκό χώρο (Biska-Zajac et al., 2021).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ορισμένα περιστατικά τριχινέλλωσης.

Πίνακας 1: Παραδείγματα τριχινέλλωσης

Περιοχή προέλευσης, έτος	Περιγραφή περιστατικού ή έρευνας	Αναφορά
Αργεντινή (Sierra Grande της επαρχίας Rio Negro), 2000-2002	2 περιπτώσεις τριχινέλλωσης το 2000. Για τη διερεύνηση του περιστατικού, την περίοδο 2000-2002, οι χοίροι που σφάχτηκαν για κατανάλωση, ελέγχθηκαν για μόλυνση και 12 από τους 300 βρέθηκαν θετικοί (5,6%). Συλλέγει δείγμα αίματος	Larrieu et al., 2004

	από επιπλέον 181 χοίρους εκ των οποίων 36 (19,9%) βρέθηκαν οροθετικά σύμφωνα με τις μεθόδους ELISA και με ανοσοαποτύπωμα western. Δηλαδή, περίπου το 20% των χοίρων της περιοχής ετησίως, μολύνονταν με <i>Trichinella</i> .	
Κίνα 1999-2004	Αναφέρθηκαν 17 επεισόδια έξαρσης ανθρώπινης τριχινέλλωσης, όπου συνολικά περιλάμβαναν 828 κρούσματα και 11 θανάτους σε 8 διαφορετικές περιφέρειες της Κίνας. Σε χοίρους στα σφαγεία, σύμφωνα με τη μέθοδο ELISA, βρέθηκαν οροθετικά από 1,63 ως 15,21% των δειγμάτων. Η μετάδοση στα ζώα γίνεται κυρίως μέσω της διατροφής των χοίρων μικρών κυρίως αγροκτημάτων με ωμό χυλό που φτιάχνεται από τα υπολείμματα των εστιατορίων ή από χοίρους που εκτρέφονται σε εξωτερικούς χώρους.	Cui et al, 2006
Δήμος Ammassalik, ανατολική Γροιλανδία, 2004	Η τριχινέλλωση είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στα άγρια ζώα της Αρκτικής. Προσδιορισμός οροεπιπολασμού <i>Trichinella</i> σε κυνηγετική κοινότητα. Εξετάστηκαν 998 κάτοικοι για αντισώματα IgG, ειδικά για την τριχινέλλωση. Θετικότητα 1,4% για ηλικίες 10-40 ετών και 12% για ηλικίες άνω των 60. Παράγοντες : ηλικία, ενασχόληση με το κυνήγι ή το ψάρεμα και κατανάλωση κρέατος πολικής αρκούδας.	Moller et al, 2010
Κομητεία Brasov, Ρουμανία (1983 -2007)	Από ένα σύνολο 3.345 ατόμων που κατανάλωσαν μολυσμένο κρέας, οι 2.179 μολύνθηκαν οι ίδιοι. Το μολυσμένο κρέας ήταν χοιρινό ή επεξεργασμένα χοιρινά προϊόντα, τα οποία καταναλώνονταν κυρίως κατά τις διακοπές, χειμώνα ή άνοιξη, σε οικογενειακές γιορτές. Κύρια αιτία: ο μειωμένος έλεγχος και η εκτροφή χοίρων για οικογενειακή κατανάλωση, χωρίς να προηγηθεί έλεγχος. Βελτίωση της κατάστασης τα τελευταία χρόνια λόγω αυξημένων ελέγχων	Dobrescu et al., 2014
Βουλγαρία 2008-2014	Στοιχεία σύμφωνα με το Εθνικό Κέντρο Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων στη Σόφια. Καταγράφηκαν 20 περιστατικά έξαρσης της νόσου. Αναφέρθηκαν 1670 άτομα που κατανάλωσαν κρέας ή προϊόντα κρέατος με προνύμφες <i>Trichinella</i> , εκ των οποίων οι 710 νόσησαν. Στελέχη που εντοπίστηκαν: <i>Trichinella spiralis</i> και <i>Trichinella britovi</i>	Rainova et al., 2016

Βόρειο και βορειοανατολικό Βιετνάμ 1970-2012	Συστηματική ανασκόπηση. 5 εξάρσεις τριχινέλλωσης(1970- 2001- 2004- 2008- 2012) με συνολικά 114 κρούσματα (26-22-20-22-24 κρούσματα, αντίστοιχα) και 8 θανάτους. Αιτία :παραδοσιακά κατανάλωση ελαφρώς μαγειρεμένου ή ωμού κρέατος άγριου χοίρου σε εκδηλώσεις όπως σεληνιακή Πρωτοχρονιά, γάμοι ή κηδείες. Στην ίδια περιοχή μελέτες σε χοίρους έδειξαν υψηλά ποσοστά μόλυνσης με <i>Trichinella</i> και το είδος που ταυτοποιήθηκε ήταν το <i>T.spiralis</i> . Αιτία: ελεύθερη περιφορά χοίρων και κατανάλωση σκουπιδιών που περιέχουν ωμά κρέατα.	Ng-Nguyen et al., 2017
Αργεντινή 2012-2019	Ανασκόπηση Αριθμός ύποπτων κρουσμάτων: 6.662. Το 2018 εντοπίστηκε στην Παταγονία της Αργεντινής θαλάσσιος λέοντας της Νότιας Αμερικής (<i>Otaria flavescens</i>) μολυσμένος με <i>T. spiralis</i> .	Ribicich et al, 2021
Χιλή 2005-2015	258 επιβεβαιωμένα περιστατικά. Τα περισσότερα κρούσματα παρουσιάστηκαν στο Santiago και τα περίχωρα (29,5%) και στη Lake (17,4%).	Ribicich et al, 2021
Κίνα 2009-2020	8 εξάρσεις, όπου αναφέρθηκαν 479 περιστατικά νόσησης και 2 θάνατοι. Από τις 8 εξάρσεις, οι 7 είχαν σαν αιτία την κατανάλωση ωμού ή μισομαγειρεμένου κρέατος χοίρων. Οροθετικός επιπολασμός σε 11 επαρχίες: 0-42,11%. Κυρίως χοίροι από μικρές φάρμες ή ελεύθερης βοσκής.	Zhang et al., 2022

2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΚΥΚΛΟΙ

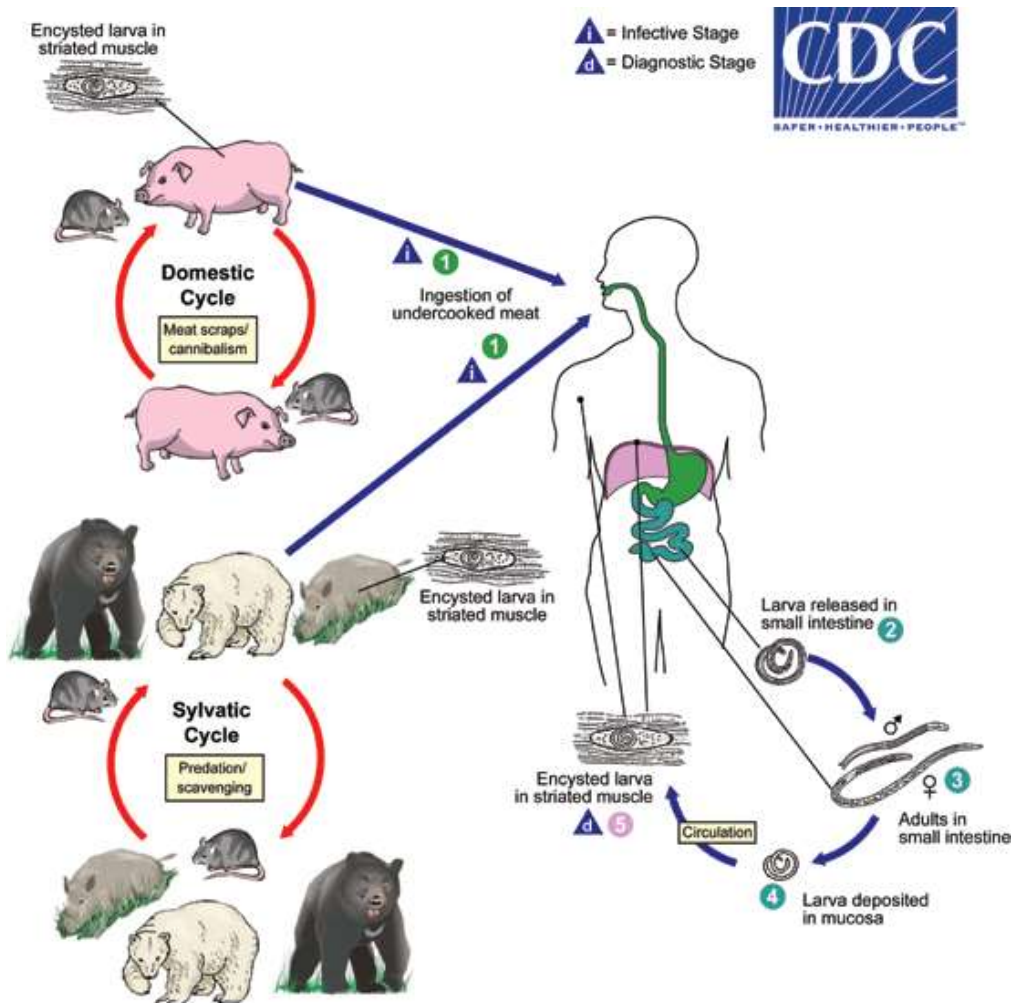
Η κατάποση μισοψημένου ή ωμού κρέατος από οικόσιτα ή συλοβετοειδή ζώα που έχουν μολυνθεί με προνύμφες του είδους *Trichinella* μπορεί να οδηγήσει σε τριχινέλλωση. Οι προνύμφες και τα ενήλικα σκουλήκια παραμένουν και ζουν ως παράσιτα στον ίδιο ξενιστή (Wu et al., 2020).

Υπάρχουν δύο επιδημιολογικοί κύκλοι για την *Trichinella* (Ng-Nguyen et al, 2017):

- **Οικιακός κύκλος:** Συμβαίνει μεταξύ οικόσιτων ζώων και ιδιαίτερα αφορά τους χοίρους, τα τρωκτικά και τα άλογα.

- **Συλβατικός κύκλος:** Επηρεάζει την άγρια ζωή όπως η αρκούδα, ο αγριόχοιρος και οι άλκες

Στην εικόνα 5, διακρίνεται οι δύο επιδημιολογικοί κύκλοι, οικιακό και συλβατικός, των παρασίτων *Trichinella*, καθώς και τα στάδια εξέλιξης της νόσου.



Εικόνα 5: Μετάδοση και κύκλος ζωής *Trichinella*

Πηγή: CDC, 2017

2.3 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ

Οι κύριες φάσεις εξέλιξης της νόσου είναι δύο, κοινές για ανθρώπους και μολυσμένα ζώα (Rainova et al, 2016; CDC, 2017):

- **Εντερική ή γαστρεντερική φάση.** Μετά την κατανάλωση μολυσμένου κρέατος, το ένζυμο πεψίνη και το υδροχλωρικό οξύ (HCl), τα οποία δρουν στο στομάχι, προκαλούν την απελευθέρωση των προνυμφών που ήταν ενθυλακωμένες στο

κρέας, στον οργανισμό-ξενιστή. Οι προνύμφες εισβάλλουν και εγκαθίστανται στο λεπτό έντερο και, συγκεκριμένα στις εντερικές λάχνες που έχει ο βλενογόνος του δωδεκαδακτύλου. Το αρχικό αυτό στάδιο της νόσου, συνήθως είναι ασυμπτωματικό για τον άνθρωπο ή παρουσιάζεται κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία ή/και έμετος, τα οποία όμως είναι συμπτώματα κοινά σε πολλές ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος. Στη συνέχεια, μέσα στις επόμενες 24 με 30 ώρες, οι προνύμφες στις εντερικές λάχνες ξεκινούν να μεγαλώνουν και μετατρέπονται σε ενήλικες σκώληκες. Οι ενήλικες σκώληκες με τη σειρά τους ζευγαρώνουν και έτσι ξεκινάει η αναπαραγωγή τους στον ξενιστή. Νέες προνύμφες δημιουργούνται στο σώμα του ξενιστή, περίπου μία βδομάδα μετά την μόλυνση. Η διάρκεια ζωής του παρασίτου στη βλενογόνο του λεπτού εντέρου είναι περίπου 28 ημέρες. Η απελευθέρωση των νεογέννητων προνυμφών δηλώνει και την ολοκλήρωση της γαστρεντερικής ή εντερικής φάσης.

- **Συστηματική ή παρεντερική φάση:** Οι νεογέννητες προνύμφες εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα και στη συνέχεια στο αίμα. Μεταφέρονται στους σκελετικούς μύες, το μυοκάρδιο και τον εγκέφαλο, όπου η περιεκτικότητα σε οξυγόνο είναι υψηλή και ευνοϊκή για την ανάπτυξή τους. Σε αυτή τη φάση εξέλιξης της νόσου εμφανίζεται πιο έντονη συμπτωματολογία στον άνθρωπο, όπως περικογχικό οίδημα (δηλαδή οίδημα βλεφάρων ή ακόμη και προσώπου), μυαλγία, πυρετός, μυοσίτιδα (φλεγμονή των μυών), αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα και θρομβοεμβολική νόσος.

2.4 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η διάγνωση της τριχινέλλωσης στον άνθρωπο γίνεται με βάση την κλινική εικόνα και τα συμπτώματα που παρουσιάζει και στη συνέχεια επιβεβαιώνεται εργαστηριακά με τη βοήθεια ορολογικών εξετάσεων, όπου προσδιορίζονται τα ηωσινόφιλα και μυϊκά ένζυμα, όπως είναι η κρεατινοφωσφοκινάση, CPK, γαλακτική αφυδρογονάση, LDH) Οι προνύμφες προκαλούν σημαντική ηωσινοφιλία, ιδιαίτερα σε ασθενείς που αναπτύσσουν καρδιακή και δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (CDC, 2017).

Μπορεί, επίσης, να πραγματοποιηθεί βιοψία σε μυϊκό δείγμα. Η βιοψία επιτρέπει την άμεση παρατήρηση των προνύμφων, άρα η διάγνωση είναι ταχεία και ακριβής. Η προετοιμασία των δειγμάτων για μικροσκοπική εξέταση, ώστε να γίνουν ορατές ή να απελευθερωθούν οι προνύμφες από το δείγμα, μπορεί να γίνει με τρεις κύριους τρόπους (CDC, 2017):

- συμπίεση δειγμάτων ιστού μεταξύ 2 πλακών
- πέψη ενός λεπτοκομμένου τμήματος του δείγματος βιοψίας με τη βοήθεια διαλυμάτων HCl και πεψίνης
- ιστολογική εξέταση με τη βοήθεια χρωστικών ουσιών

Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανοσοδιαγνωστικές εξετάσεις, όπου αναγνωρίζουν και υπολογίζουν το επίπεδο των αντισωμάτων IgG, IgM και IgE. Ωστόσο, σημειώνεται ότι τα επίπεδα αντισωμάτων γίνονται ανιχνεύσιμα μετά τις 3 – 5 βδομάδες από τη στιγμή της μόλυνσης. Κορυφώνονται 2- 3 μήνες μετά τη μόλυνση και στη συνέχεια παραμένουν ακόμη και για χρόνια σταθερά (CDC, 2017).

2.5 ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΤΡΙΧΙΝΕΛΛΩΣΗΣ

Η αντιμετώπιση της τριχινέλλωσης είναι πιο αποτελεσματική αν διαγνωσθεί στα αρχικά στάδια, πριν δηλαδή οι προνύμφες μεταφερθούν από το λεπτό έντερο στα υπόλοιπα όργανα του ξενιστή. Οι ενήλικες σκώληκες μπορούν, με τη βοήθεια φαρμακευτικής αγωγής, να θανατωθούν πλήρως. Οι προνύμφες που έχουν εγκατασταθεί στα κύτταρα των μυών, 3 – 4 βδομάδες μετά τη μόλυνση, μπορεί να μην εξαλειφθούν από τα φάρμακα και να χρειαστεί να παραταθεί ή να επαναληφθεί ο κύκλος θεραπείας (CDC, 2017).

Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης της τριχινέλλωσης, ωστόσο, είναι η πρόληψη. Στα περισσότερα περιστατικά εξάρσεων που εντοπίστηκαν, η αιτία νόσησης ήταν η κατανάλωση κρέατος χοίρων, ωμού ή όχι καλά μαγειρεμένου. Για τον έλεγχο και τον περιορισμό της συγκεκριμένης τροφιμογενούς νόσου, απαιτείται η λήψη προληπτικών μέτρων. Για παράδειγμα, η εκτροφή των χοίρων θα πρέπει να γίνεται υπό ελεγχόμενες συνθήκες και τα ζώα που σφάζονται θα πρέπει υποχρεωτικά να εξετάζονται για την παρουσία *Trichinella*. Ο έλεγχος δεν πρέπει να αφορά μόνο τις μεγάλες χοιροτροφικές μονάδες, αλλά ακόμη και τη σφαγή μεμονωμένων ζώων σε

μικρά αγροκτήματα, αλλά και θηράματα κυνηγιού, όπως αγριόχοιρους ή αρκούδες (Zhang et al., 2022).

Είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό ότι τα προληπτικά μέτρα που ο άνθρωπος μπορεί να λάβει σχετίζονται περισσότερο με τον οικόσπιτο κύκλο, όπου μπορεί με την βοήθεια ελέγχων να μειώσει ή και να εξαλείψει τη διασπορά του παράσιτου, καθώς και να εντοπίσει τα μολυσμένα ζώα πριν οδηγηθούν στην κατανάλωση. Στον συλβατικό κύκλο, η μετάδοση μεταξύ των ζώων δεν είναι ελεγχόμενη από τον άνθρωπο. Είναι απαραίτητο, λοιπόν, για την αποφυγή της μετάδοσης στον άνθρωπο τα θηράματα να ελέγχονται πριν την κατανάλωση και το κρέας να μαγειρεύεται επαρκώς (Biska-Zajac et al., 2021).

Η προσέγγιση One Health με συμμετοχή και συνεργασία κυβερνήσεων, αρμόδιων αρχών, ιατρών και κτηνιάτρων είναι σημαντική (Zhang et al., 2022).

2.6 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ TRICHINELLA SPIRALIS

Μία εναλλακτική στρατηγική που έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της ιατρικής κοινότητας για την πρόληψη και την αντιμετώπιση καρκινικών όγκων είναι η βιοθεραπεία. Η βιοθεραπεία όγκων στην πράξη έχει χρησιμοποιήσει εμβόλια ιντερφερόνες, μονοκλωνικά αντισώματα, ανοσοτοξίνες, στοχευμένη θεραπεία με ραδιονουκλεοτίδια, βλαστοκύτταρα, παράγοντες ανάπτυξης. Έχουν. Επίσης, δοκιμαστεί και άλλοι βιολογικοί παράγοντες, όπως βακτήρια, ζύμες, ιοί ή παράσιτα, με αρκετά ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Η βιοθεραπεία στηρίζεται σε μηχανισμούς που κινητοποιούν την άμυνα του ξενιστή, αυξάνουν την αντικαρκινική απόκριση του ατόμου και την ικανότητα των κυττάρων που είναι φυσιολογικά να αντιστέκονται στις βλάβες, να δημιουργούν απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, να περιορίζουν τις μεταστάσεις και να προκαλούν καταστολή των παραγόντων που προκαλούν την αύξηση των όγκων (Liao et al, 2018).

Το *Trichinella spiralis* έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για την πιθανή νεοπλασματική δράση που παρουσιάζει, από τη δεκαετία του 1970 και μετά. Μελετώνται ο μηχανισμός δράσης και η συσχέτιση μεταξύ του βακτηρίου και της πρόληψης ή θεραπείας των καρκινικών όγκων. Ταυτόχρονα, ορισμένες έρευνες ασχολούνται με τη πιθανότητα να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην εξέλιξη του

καρκίνου, καθώς μπορεί να επιβαρύνει την κατάσταση του ασθενούς με μία λοίμωξη τριχινέλλωσης (Liao et al, 2018).

Στον παρακάτω πίνακα 2, παρουσιάζονται συνοπτικά ορισμένες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με το *T.spiralis* με σκοπό να αξιολογήσουν την αποτελεσματικότητά του ως αντικαρκινικό παράγοντα, καθώς και τα αποτελέσματα στα οποία οι έρευνες αυτές κατέληξαν.

Πίνακας 2: Αντικαρκινική δράση *T.spiralis*

Τύπος καρκινικού όγκου	Πειραματική διαδικασία (δείγμα / δοσολογία / διάρκεια)	Αποτελέσματα	Αναφορά
Μελάνωμα	C57BL/6 ποντίκια. Μόλυνση από το στόμα <i>T.spiralis</i> . 40 μέρες μετά, υποδόρια χορήγηση κυττάρων όγκου. Έλεγχος για την ανάπτυξη όγκων- 10, 13, 15, 18, 21 και 25 ^η ημέρα	Παρεμπόδιση αύξησης όγκων. Απόπτωση	Vasilev et al., 2015
Κύτταρα μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα	Ποντίκια μολύνθηκαν με <i>T.spiralis</i> για 30 ημέρες. Προϊόντα απέκκρισης-έκκρισης (excretory-secretory product - ESP) προνυμφών <i>T.spiralis</i> συλλέχθηκαν. In vitro δοκιμή. Επώαση καρκινικών κυττάρων με ESP για 24, 36 και 48 ώρες	Αναστολή πολλαπλασιασμού και αύξηση της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων.	Wu, 2020
Καρκίνος ήπατος	Αλμπίνο αρουραίοι. 4 ομάδες: ομάδα ελέγχου (GI) – ομάδα με <i>T.spiralis</i> (GII)– ομάδα με επαγόμενο καρκίνο ήπατος (GIII)- ομάδα με επαγόμενο καρκίνο ήπατος και <i>T.spiralis</i> (GIV). Παρακολούθηση για 40 ημέρες.	Υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και επιβράδυνση της ανάπτυξης των καρκινικών όγκων της ομάδας GIV έναντι της ομάδας GIII	Elhasawy et al., 2021
Καρκινικά κύτταρα ήπατος	In vivo δοκιμή σε ποντίκια. Μόλυνση με καρκινικά κύτταρα και στη συνέχεια με <i>T.spiralis</i>	Παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων στα ποντίκια	Ding et al., 2022

	<p>In vitro δοκιμή. Καρκινικά κύτταρα επωάστηκαν με προϊόντα απέκκρισης-έκκρισης (excretory-secretory product) σκουληκιών και προνύμφων <i>T.spiralis</i>. Μελέτη μηχανισμού δράσης του προϊόντος απέκκρισης – έκκρισης</p>	<p>Έμμεσα αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμό με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή και άμεσα απόπτωση.</p>	
--	---	--	--

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ - ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΤΗΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

3.1 ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει προχωρήσει στη θέσπιση κοινοτικών κανόνων και απαιτήσεων υγιεινής για το κρέας και τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Παράλληλα έχει καθορίσει τους επίσημους ελέγχους που απαιτούνται και τις απαραίτητες προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται, ώστε τα αντίστοιχα τρόφιμα να είναι ασφαλή για κατανάλωση.

- Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004 : Καθορίζει τους ειδικούς κανόνες υγιεινής που πρέπει να τηρούνται από τις επιχειρήσεις τροφίμων για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Οι απαιτήσεις στις οποίες οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να συμμορφώνονται αφορούν όλα τα στάδια επεξεργασίας του κρέατος και των κρεατικών σκευασμάτων, από τη μεταφορά στο σφαγείο μέχρι την έξοδο από το σφαγείο και την αποθήκευση των ζώων στις κατάλληλες συνθήκες. Αναφέρονται σε κατοικίδια σπληφόρα ζώα, πουλερικά και λαγόμορφα, εκτρεφόμενα θηράματα, ακόμη και άγρια θηράματα, δίθυρα μαλάκια, χτένια και αλιευτικά προϊόντα.
- Κανονισμός (ΕΚ) 854/2004 [αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/65] : Καθορίζει ειδικές διατάξεις για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης τα οποία προορίζονται να καταναλωθούν από τον άνθρωπο. Οι έλεγχοι που διεξάγονται από τις αρμόδιες αρχές αφορούν την έγκριση της καταλληλότητας των εγκαταστάσεων επεξεργασίας και διάθεσης προϊόντων ζωικής προέλευσης στην αγορά, την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων, τη τήρηση των αρχών ορθής υγιεινής πρακτικής και ορθής μεταχείρισης των ζώων,
- Κανονισμός (ΕΚ) 882/2004 [αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/65]: Αφορά τη διενέργεια των επίσημων ελέγχων που σχετίζονται με την

εξασφάλιση ότι οι επιχειρήσεις συμμορφώνονται με τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και με τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων. Καλύπτονται τομείς όπως η διατροφή των ζώων, η κατανάλωση φαρμακικών ζωοτροφών, περιλαμβάνει ελέγχους για την υγιεινή ζωοτροφών και τροφίμων, για ζωνοδόσους και την αντιμετώπισή τους, για την παρουσία φυτοφαρμάκων στις τροφές, για την χρήση πρόσθετων ακόμη και τις απαιτήσεις του πόσιμου νερού, των νέων τροφίμων και των γενετικώς τροποποιημένων τροφίμων.

- Κανονισμός (ΕΕ) 2017/625: Τροποποιεί και καταργεί παλαιότερους κανονισμούς, ενσωματώνοντας στις διατάξεις του κανόνες για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων και άλλως επίσημων δραστηριοτήτων, που διενεργούνται με σκοπό την εξασφάλιση της εφαρμογής της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, τις ζωοτροφές, την τήρηση των κανόνων για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων, την υγεία των φυτών και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Επιπρόσθετα για την *Trichinella* έχουν θεσπιστεί ειδικότεροι κανόνες.

- Εκτελεστικός κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375. Αφορά το κρέας των χοίρων, των αγριόχοιρων, των αλόγων και άλλων ζωικών ειδών που μπορεί να μολυνθούν με *Trichinella* και στη συνέχεια να καταναλωθούν από τον άνθρωπο και να προκαλέσουν σοβαρή νόσο. Καθορίζονται ο τρόπος δειγματοληψίας των σφαγίων των διαφορετικών ειδών, οι μέθοδοι ανίχνευσης των νηματωδών στα δείγματα, οι συνθήκες που επικρατούν στα σφαγεία και στις μονάδες τεμαχισμού, οι συνθήκες μεταφοράς και αποθήκευσης. Η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) το 2011 χαρακτήρισε την *Trichinella* ως μέτριο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία συνδεδεμένο με την κατανάλωση χοιρινού κρέατος και πρότεινε την λήψη προληπτικών μέτρων και ελέγχων, πριν τη διάθεση στην αγορά. Σύμφωνα με τον κανονισμό 2015/1375 είναι υποχρεωτική η καταγραφή των περιστατικών τριχινέλλωσης. Σε περίπτωση μόλυνσης, οι αρμόδιες αρχές των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης οφείλουν να έχουν αναπτύξει σχέδια για τις ενέργειες που πρέπει να πραγματοποιούνται, όπως ιχνηλασιμότητα των μολυσμένων σφαγίων και των τμημάτων τους, μέτρα για τον χειρισμό τους, έρευνα για τον εντοπισμό της πηγής μόλυνσης ώστε να μην εξαπλωθεί στην άγρια πανίδα, μέτρα για την

προστασία του καταναλωτή, μέτρα για την περίπτωση όπου ο προσδιορισμός των μολυσμένων κρεάτων δεν είναι εφικτός.

- Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΕ) 2016/1843. Αφορά την παρέκκλιση από τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα εργαστήρια που έχουν λάβει διαπίστευση επίσημα και πραγματοποιούν δοκιμές ανίχνευσης *Trichinella*.
- Κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τις ελάχιστες συστάσεις για τα επίσημα εργαστήρια. Πρόκειται για τις ελάχιστες προϋποθέσεις που πρέπει να πληροί ένα εργαστήριο ώστε να ορίζεται ως κατάλληλο για τη διενέργεια επίσημων ελέγχων *Trichinella* στο κρέας. Ως απαραίτητα στοιχεία και απαιτήσεις αναφέρονται:

1. Σύστημα διαχείρισης ποιότητας (Quality Management System – QMS). Το πιστοποιημένο εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει σύστημα διαχείρισης το οποίο θα έχουν εγκρίνει οι αρμόδιες αρχές.
2. Προσωπικό. Απαιτείται επάρκεια προσωπικού. Απαιτείται τουλάχιστον ένας επόπτης ή επικεφαλής του εργαστηρίου, που θα έχει εμπειρία και γνώσεις για την επιδημιολογία, τη βιολογία και τη διάγνωση νηματωδών του γένους *Trichinella*, καθώς και αναλυτές με βασικές γνώσεις πάνω στο παράσιτο.
3. Μέθοδοι δοκιμής. Θα πρέπει να εφαρμόζεται η μέθοδος αναφοράς του Κανονισμού (ΕΕ) 2015/1375 (πέψη με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα) ή οι ισοδύναμες μέθοδοι που περιγράφονται στον κανονισμό
4. Εργαστηριακές εγκαταστάσεις. Επαρκείς χώροι, που ελέγχονται από την αρμόδια αρχή. Σε περίπτωση που βρίσκονται στον ίδιο συγκρότημα με τα σφαγεία, απαιτείται σαφής διάκριση μεταξύ τους.
5. Εξοπλισμός. Ο ελάχιστος απαραίτητος ώστε να ανταποκρίνεται στο συνήθη ημερήσιο αριθμό δειγμάτων. Σε περίπτωση έκτακτης ανάγκης, θα πρέπει να έχει εξασφαλιστεί ότι τουλάχιστον μία συσκευή για κάθε τύπο θα είναι διαθέσιμη στους αναλυτές. Απαιτείται έλεγχος των αναλώσιμων και χημικών υλικών, αντικατάσταση σε περίπτωση φθοράς, περιοδικοί έλεγχοι. Θα πρέπει να διαμορφωθεί κατάλογος με όλους τους εξειδικευμένους προμηθευτές υλικών και συσκευών.

6. Χειρισμός δειγμάτων. Θα πρέπει να υπάρχει έγγραφο που θα περιγράφει το χειρισμό του δείγματος, καθώς και τα όρια αποδοχής και απόρριψης, τον τρόπο με τον οποίο ταυτοποιούνται, αποθηκεύονται και συντηρούνται τα δείγματα.
7. Ιχνηλασιμότητα. Είναι ευθύνη του επικεφαλής του εργαστηρίου να διασφαλίσει την ιχνηλασιμότητα του δείγματος από το σφάγιο στο εργαστήριο, και από το εργαστήριο ως την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Θα πρέπει να τηρούνται τεχνικά αρχεία που να δίνουν στοιχεία για την πορεία του δείγματος, το προσωπικό που ασχολήθηκε με το δείγμα, τη διαχείριση των θετικών αποτελεσμάτων
8. Εκπαίδευση προσωπικού. Το προσωπικό θα πρέπει να είναι εκπαιδευμένο. Η εκπαίδευσή του θα πρέπει να περιλαμβάνει τη συμμετοχή σε ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου που αφορά δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση *Trichinella*, καθώς και την τακτική αξιολόγηση του πάνω στις διαδικασίες δοκιμής, καταγραφής και ανάλυσης που έχει υιοθετήσει το εργαστήριο
9. Τεστ επάρκειας. Το προσωπικό πρέπει να διενεργεί τη δοκιμή για την ανίχνευση της *Trichinella* MSL στο κρέας σε τακτά χρονικά διαστήματα και να εξασφαλίζει ικανοποιητικές επιδόσεις.

3.2 ΣΥΣΤΗΜΑ HACCP

Η ασφάλεια ενός προϊόντος σε μία βιομηχανία τροφίμων αντιμετωπίζεται συνήθως με τα σχέδια Ανάλυσης Κινδύνου και Κρίσιμων σημείου ελέγχου (Hazard Analysis and Critical Control Point - HACCP). Το σύστημα HACCP διαμορφώνεται από την επιχείρηση ώστε να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των αρμόδιων αρχών και να εξασφαλίζει ότι όταν το προϊόν θα φθάσει στον καταναλωτή θα είναι ποιοτικό και ασφαλές (Hill et al., 2017).

Το σύστημα HACCP διακρίνει τους κινδύνους που μπορούν να απειλήσουν την ασφάλεια και την υγιεινή ενός τροφίμου σε τρεις κατηγορίες: βιολογικούς ή μικροβιολογικούς, χημικούς και φυσικούς κινδύνους. Η μόλυνση κρέατος ή κρεατικών σκευασμάτων από *T. spiralis* ανήκει στους βιολογικούς κινδύνους. Το σύστημα HACCP διέπεται από 7 βασικές αρχές που σχετίζονται με τον εντοπισμό των δυνητικών κινδύνων και την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους. Οι βασικές αρχές

HACCP, όπως παρουσιάζονται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (U.S. Food & Drug Administration) είναι (FDA, 2022):

- Αρχή 1: Διεξαγωγή ανάλυσης κινδύνου.
- Αρχή 2: Προσδιορισμός των κρίσιμων σημείων ελέγχου (CCP)
- Αρχή 3: Καθιέρωση των κρίσιμων ορίων
- Αρχή 4: Καθιέρωση διαδικασιών παρακολούθησης
- Αρχή 5: Καθιέρωση διορθωτικών ενεργειών.
- Αρχή 6: Καθιέρωση διαδικασιών επαλήθευσης.
- Αρχή 7: Καθιέρωση διαδικασιών τήρησης αρχείων και τεκμηρίωσης.

Κάθε επιχείρηση τροφίμων καλείται να αναπτύξει το δικό της σχέδιο HACCP, ανάλογα τις ανάγκες που έχει, το μέγεθος της επιχείρησης, το προϊόν που παράγει και τις διεργασίες που ακολουθεί. (FDA, 2022):

Στην περίπτωση, για παράδειγμα, που διαχειρίζεται ή/και εμπορεύεται χοιρινό κρέας, ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου είναι ο έλεγχος για μόλυνση από *Trichinella*. Το σημείο ελέγχου πιθανόν να πρέπει να είναι κατά την παραλαβή του χοιρινού, πριν την είσοδο στο χώρο των εγκαταστάσεων και την επαφή με τον εξοπλισμό.

3.3 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ TRICHINELLA SPIRALIS

Αν ένα προϊόν κρέατος, είναι έτοιμο να δοθεί στην αγορά, αλλά δεν έχει ελεγχθεί για *T.spiralis*, θα πρέπει να καταστεί ασφαλές από τον κίνδυνο έκθεσης στον συγκεκριμένο παρασιτικό οργανισμό. Στην περίπτωση αυτή μπορούν να δημιουργηθούν συνθήκες αδρανοποίησης του κατά τις διαδικασίες ωρίμανσης (curing processes). Μπορούν να εφαρμοστούν μέθοδοι επεξεργασίας όπως κατάψυξη, μαγείρεμα ή ακόμη και ακτινοβόληση.

Οι Hill et al, (2017) πραγματοποίησαν μελέτη με σκοπό να αξιολογήσουν την επίδραση πέντε μεταβλητών στην αδρανοποίηση της *T.spiralis* σε λουκάνικο από ξηρό ωριμασμένο κρέας. Οι μεταβλητές αυτές δοκιμάστηκαν μεμονωμένα αλλά και συνδυαστικά. Πιο αναλυτικά, οι μεταβλητές ήταν η συγκέντρωση αλατιού/άλμης, η ενεργότητα νερού (aw), το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος και κυμάνθηκαν μεταξύ ενός ανώτερου κατώτερου ορίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) πάνω από 1,3%, σε συνδυασμό με pH 5,2 ή χαμηλότερο,

οδήγησαν σε αδρανοποίηση των προνυμφών της *Trichinella* σε ποσοστό μεγαλύτερο από 96% μέσα στις πρώτες 24-28 ώρες. Όλες οι προνύμφες, απενεργοποιήθηκαν 7-10 ημέρες μετά τη γέμιση των λουκάνικων και την εφαρμογή των συνθηκών (Hill et al., 2017).

Παρόμοια μελέτη πραγματοποίησαν ο Johne et al., (2021) όπου διερεύνησαν την επιβίωση του *T.spiralis* σε ωριμασμένα λουκάνικα από ωμό κρέας. Παρασκεύασαν τέσσερις διαφορετικούς τύπους λουκάνικων (Knackwurst, συσκευασμένο σε κενό αέρος Knackwurst, κοντό ώριμο σαλάμι, σαλάμι μακράς ωρίμανσης) με κρέας αλεσμένο και μολυσμένο με *T.spiralis*. Οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ήταν η ενεργότητα του νερού (aw), το pH, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Τα λουκάνικα μετά την παρασκευή τους αφέθηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες ωρίμανσης για 35 μέρες. Κατά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα όπου υποβλήθηκαν σε πέψη με μαγνητικό αναδευτήρα και ελέγχθηκε η βιωσιμότητα και η μολυσματική ικανότητα των προνυμφών *T.spiralis*. Παρατηρήθηκε ότι στο κοντό ώριμο σαλάμι οι προνύμφες ήταν δυνητικά μολυσματικά ως την 2^η μέρα, ενώ στο σαλάμι μακράς ωρίμανσης ως την 3^η ημέρα. Στο σαλάμι Knackwurst υπό κενό, η μολυσματική ικανότητα των προνυμφών διήρκησε ως την 24^η ημέρα. Σύμφωνα, λοιπόν με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας, η συσκευασία μπορεί να επηρεάσει την επιβίωση του *T.spirallis* και τον χρόνο που απαιτείται ώστε να αδρανοποιηθεί (Johne et al., 2021).

Οι Franssen et al. (2021) σε in vitro μελέτη, αξιολόγησαν την επίδραση της θερμότητας στην αδρανοποίηση των μολυσματικών προνυμφών *Trichinella*. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κατάλληλο υπόστρωμα τοποθέτησαν ζωντανές προνύμφες και εφάρμοσαν θερμοκρασίες 40°C ως 80°C. Με τη μέθοδο χρώση κυανού του μεθυλενίου όαο και μορφολογική εξέταση που επικύρωσαν με βιοδοκιμή έλεγξαν την αδρανοποίηση των προνυμφών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι προνύμφες που εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 60°C για χρονικό διάστημα 12- 12,5 min δεν ήταν μολυσματικές (Franssen et al., 2021). Η θερμική επεξεργασία είναι μία αποτελεσματική μέθοδο αδρανοποίησης της *Trichinella*, αλλά πρέπει να αξιολογηθούν οι επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος, καθώς και η αποδοχή του από το καταναλωτικό κοινό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ

4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΨΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

4.1.1 Μέθοδος αναφοράς: Πέψη ομάδων δειγμάτων με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα

Σύμφωνα με τον εκτελεστικό Κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375 ως μέθοδος ανίχνευσης αναφοράς ορίζεται η μέθοδος πέψης ομάδων δειγμάτων με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η μέθοδος αυτή περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι/Κεφάλαιο Ι (Μέθοδοι ανίχνευσης) της αντίστοιχης νομοθεσίας.

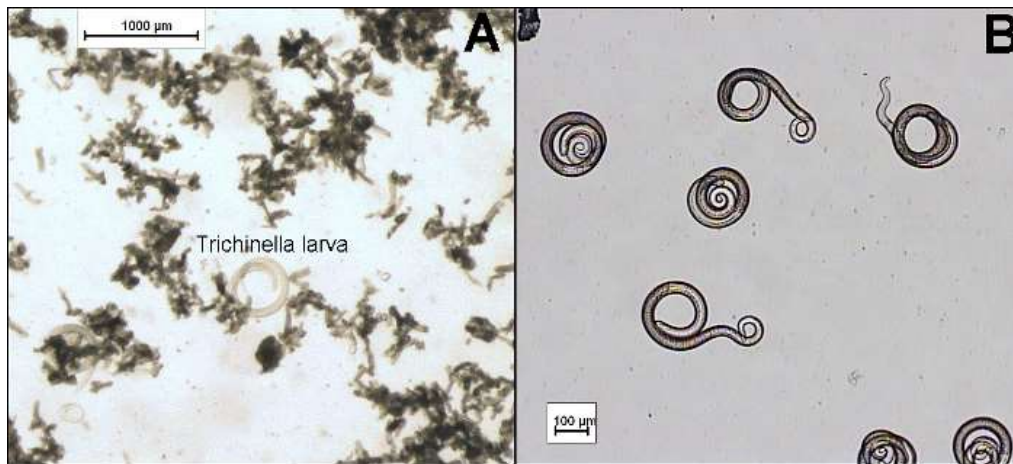
Τα δείγματα των μυών των εξεταζόμενων ζώων αρχικά υποβάλλονται σε ενζυμική πέψη. Ακολουθεί διήθηση και καθίζηση. Η ανίχνευση των προνυμφών *Trichinella* πραγματοποιείται με μικροσκόπιο. Αν και πρόκειται για μία αξιόπιστη και εύκολη στην εφαρμογή μέθοδο, για την οποία δεν απαιτείται η αγορά ειδικού και ακριβού εξοπλισμού, θα πρέπει να εφαρμόζεται με αυστηρή τήρηση των τεχνικών λεπτομερειών. Σε διαφορετική περίπτωση, μπορεί να υπάρξουν προβλήματα στην ευαισθησίας της μεθόδου, άρα και στην ασφάλεια του τροφίμου (Mayer-Scholl et al., 2017).

Τα κυριότερα στάδια της διαδικασίας είναι (Κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375):

1. Συλλογή δειγμάτων.
2. Προετοιμασία του διαλύματος πέψης. Σε ποτήρι ζέσης (3l) τοποθετούνται 2,0 l νερό βρύσης, προθερμασμένο στους 46-48°C και προστίθενται 16±0,5 ml υδροχλωρικό οξύ (HCl). Το διάλυμα οδηγείται για ανάδευση και θέρμανση σε πλάκα. Τέλος, γίνεται προσθήκη 10±0,2 g πεψίνης ή 30±0,5 ml υγρής πεψίνης
3. Προετοιμασία του μυϊκού δείγματος. Τεμαχισμός στον αναμείκτη δείγμα περίπου 100g
4. Πέψη μυϊκού δείγματος. Μεταφορά του τεμαχισμένου κρέατος στο ποτήρι ζέσης με το νερό, το HCl και το ένζυμο πεψίνη. Ανάδευση για 30 λεπτά για τα οικόσιτα ζώα και μεγαλύτερος χρόνος για τα θηράματα ή τη γλώσσα (ως 60

min) περίπου με τη βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα, σε σταθερή θερμοκρασία 44 – 46°C.

5. Διήθηση και καθίζηση του υγρού πέψης. Αφού τα μόρια κρέατος διαλυθούν στο υγρό πέψης, ώστε να μην διακρίνονται, η ανάδευση σταματά και το υγρό δείγμα διέρχεται μέσα από κόσκινο και μεταφέρεται σε χωνί καθίζησης.
6. Προσδιορισμός ποσότητας ιστού που δεν υπέστη πέψη. Η ποσότητα του δείγματος που παραμένει στο κόσκινο δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του αρχικού βάρους, ώστε η διαδικασία να θεωρηθεί ολοκληρωμένη.
7. Καθίζηση του υγρού πέψης. Αφήνεται σε ηρεμία στον κύλινδρο για 30 min
8. Εξέταση με μικροσκόπιο



Εικόνα 6: Μικροσκοπική εξέταση στα 100μm A) Ανεπαρκή βήματα έκπτυξης, διακρίνονται προνύμφες *Trichinella*, αλλά όχι καθαρά. B) Επαρκή βήματα έκπτυξης

Πηγή: Mayer- Scholl et al., 2017

4.1.2 Μέθοδος της μηχανικά υποβοηθούμενης πέψης ομάδας δειγμάτων/ τεχνική της απομόνωσης με καθίζηση

Πρόκειται για μία τεχνική που χρησιμοποιείται ως ισοδύναμη της μεθόδου αναφοράς. Τα κυριότερα στάδια της διαδικασίας είναι (Κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375):

1. Συλλογή δειγμάτων.
2. Προετοιμασία του δείγματος . Άλεση με τη χρήση κρεατομηχανής.
3. Προετοιμασία διαδικασίας πέψης. Ομογενοποιητής Stomacher lab- blender, ρυθμίζεται σε σταθερή θερμοκρασία 40 – 41°C και τοποθετείται διπλή

πλαστική σακούλα, με 1,5 l νερό προθερμασμένο στους 40 – 41°C και 25 ml δ/μα HCl 17,5%.

4. Πέψη μυϊκού δείγματος. Μεταφορά του αλεσμένου κρέατος στη σακούλα με το νερό και το υδροχλωρικό οξύ. Προσθήκη 6g πεψίνης ή 18 ml υγρής πεψίνης. Η προσθήκη της πεψίνης γίνεται στο τέλος ώστε να μην υποστεί αποσύνθεση. Ο ομογενοποιητής τίθεται σε λειτουργία για 25 min περίπου.
5. Διήθηση υγρού πέψης. Η ομογενοποίηση σταματά και το υγρό δείγμα από τη σακούλα διέρχεται μέσα από κόσκινο και μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως. Η σακούλα ξεπλένεται με 100 ml νερό και τα εκπλύματα χρησιμοποιούνται και για την έκπλυση του κόσκινου.
6. Καθίζηση του υγρού πέψης. Στο ποτήρι ζέσεως προστίθεται πάγος και αναδεύεται. Το παγωμένο δείγμα μεταφέρεται σε χωνί διαχωρισμού που φέρει δονητή. Αφήνεται να κατακαθίσει για 30 min, κατά την διάρκεια των οποίων ασκούνται επανειλημμένες δονήσεις (1min δόνηση- 1 min ηρεμία). 60 ml ίζημα μεταφέρονται σε κύλινδρο, και αφήνονται σε ηρεμία για 10min. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα (περίπου 15ml)
7. Το ίζημα (περίπου 15ml) εξετάζεται στο μικροσκόπιο ή το τριχινοσκόπιο.

4.1.3 Μέθοδος της αυτόματης πέψης για ομαδικά δείγματα μέχρι 35g

Συνοπτικά, τα βασικά βήματα της αυτόματης πέψης είναι:

1. Συλλογή δειγμάτων.
2. Αναμείκτης Trichomatic 35® με ένθετη διάταξη διηθήσεως τίθεται σε λειτουργία και παράλληλα ξεκινάει και η θέρμανση του δείγματος. Προστίθενται τα δείγματα, νερό ως το χείλος του θαλάμου υγρών που συνδέεται με το αναμείκτη (~400 ml), 30ml δ/μα HCl (8,5%) στον μικρότερο θάλαμο υγρών και 7g πεψίνης ή 21 ml υγρής πεψίνης.
3. Πέψη δειγμάτων. Περίπου 5 min για τους χοίρους που έχουν κανονική ηλικία σφαγής και 8 min για τα υπόλοιπα δείγματα. Η διαδικασία πλήρωσης και πέψης ξεκινάει αυτόματα μόλις πατηθεί το πλήκτρο εκκινήσεως και ακολουθεί η διήθηση. Όλη η διαδικασία διαρκεί περίπου 10-13 min.

4. Απομόνωση προνυμφών. Η διηθητική μεμβράνη ελέγχεται με μικροσκόπιο ή τριχινοσκόπιο.

4.1.4 Πέψη συγχωνευμένων (ή συνενωμένων δειγμάτων με τη μέθοδο μαγνητικού αναδευτήρα/ «απομόνωση σε ηθμό» και ανίχνευση προνυμφών με δοκιμασία συγκόλλησης του λατέξ

Η μέθοδος αυτής ανίχνευσης είναι ισοδύναμη με τη μέθοδο αναφοράς μόνο για τα δείγματα κρέατος κατοικίδιων χοίρων. Τα κυριότερα στάδια της διαδικασίας είναι (Κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375):

1. Συλλογή δειγμάτων.
2. Προετοιμασία του διαλύματος πέψης. Σε ποτήρι ζέσεως (3l) τοποθετούνται 2,0 l νερό βρύσης, προθερμασμένο στους 46-48°C και προστίθενται 16±0,5 ml υδροχλωρικό οξύ (HCl) 25%. Το διάλυμα οδηγείται για ανάδευση και θέρμανση σε πλάκα. Τέλος, γίνεται προσθήκη 10±1 g πεψίνης ή 30±3 ml υγρής πεψίνης
3. Προετοιμασία δειγμάτων. Τεμαχισμός με αναμείκτη παρουσία 150 ±15ml προθερμασμένου διαλύματος πέψης και μεταφορά στο ποτήρι ζέσεως με το νερό, το υδροχλωρικό οξύ και τη πηκτίνη.
4. Πέψη. Ανάμειξη με μαγνητικό αναδευτήρα σε σταθερή θερμοκρασία 44 - 46°C, ως πλήρους ανάμιξης. Το υγρό πέψης διέρχεται από κόσκινο και συλλέγεται σε χωνί καθίζησης. Ελέγχεται η ποσότητα που παραμένει στο κόσκινο ώστε να μην υπερβαίνει το 5% του αρχικού βάρους του δείγματος.
5. Ακολουθεί διήθηση. Χρησιμοποιείται ηθμός από νάιλον με οπές 20μm και κόσκινο οπών 180μm. Με τη βοήθεια αντλίας κενού το υγρό πέψης διέρχεται από το σύστημα διήθησης.
6. Η μεμβράνη διήθησης διπλώνεται στα τέσσερα και τοποθετείται σε κωνική φιάλη και με τη βοήθεια ύπερου (γουδοχέρι) ασκείται έντονη πίεση.
7. Αρνητικός και θετικός μάρτυρας τοποθετούνται στα πεδία της κάρτας συγκόλλησης και προστίθενται και τα σφαιρίδια λατέξ. Η κάρτα συγκόλλησης τοποθετείται σε τρισδιάστατο τάρακτρο και αναταράσσεται για 10±1 min. Αν το δείγμα είναι θετικό θα εμφανιστούν συσσωματώματα σφαιριδίων.

4.1.5 Δοκιμή τεχνητής πέψης για in vitro ανίχνευση προνυμφών *Trichinella* spp σε δείγματα κρέατος, PrioCHECK *Trichinella* AAD Kit

Η μέθοδος αυτής ανίχνευσης είναι ισοδύναμη με τη μέθοδο αναφοράς μόνο για τα δείγματα κρέατος κατοικίδιων χοίρων. Το kit είναι μία εναλλακτική μέθοδος τεχνητής πέψης που ανιχνεύει τις προνύμφες *Trichinella* στο κρέας. Το χρησιμοποιούμενο ένζυμο είναι η ενδοπεπτιδάση σερίνης (serin endopeptidase) και δεν απαιτείται η προσθήκη οξέος. Το κρέας ψιλοκόβεται και ακολουθεί επώαση σε ένα προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα πέψης, παρουσία του ενζύμου. Το μίγμα πέψης περνάει από κόσκινο στη διαχωριστική χοάνη. Ακολουθεί καθίζηση σε δύο στάδια και το ίζημα εξετάζεται για την παρουσία προνυμφών *Trichinella* (ThermoFisher, 2022)

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Για την διάγνωση της τριχινέλλωσης σε ανθρώπους και ζώα έχουν αναπτυχθεί ορισμένες ορολογικές τεχνικές (serological techniques) οι οποίες ανιχνεύουν την παρουσία συγκεκριμένων αντισωμάτων και παρασιτικών αντιγόνων στον ορό ή στα υγρά των ιστών. Στα ζώα, οι ορολογικές εξετάσεις, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή για την Τριχινέλλωση (International Commission on Trichinellosis – ICT) δεν είναι συνιστώμενες για ελέγχους σε κρέατα σφαγίων, αλλά είναι περισσότερο κατάλληλες για την παρακολούθηση κατοικίδιων ζώων και άγριων ζώων. Μέσα από αυτές τις μετρήσεις μπορεί να παρακολουθήσουν την εξάπλωση της *Trichinella* και να εκτιμήσουν τον κίνδυνο που αντιπροσωπεύει σε μία περιοχή για τον άνθρωπο (Yang et al., 2016).

Τα αντιγόνα *Trichinella* που ανιχνεύονται στον ξενιστή, διακρίνονται σε δύο ομάδες (Yang et al., 2016):

- Ομάδα I: Σωματικά (somatic) αντιγόνα που ανιχνεύονται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μόλυνση, περίπου 2 βδομάδες αργότερα. Η ανίχνευση σωματικών αντιγόνων μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα. Τα σωματικά αντιγόνα περιέχουν φωσφορυλοχλωρίνη (phosphorylchlorine), η οποία όμως έχει βρεθεί και σε άλλα παράσιτα (*Ascaris suum*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Toxocara canis* και *Trichuris suis*) αλλά και στο κυτταρικό

τοίχωμα βακτηρίων και μυκήτων, με αποτέλεσμα πολλές φορές να δημιουργείται σύγχυση.

- Ομάδα II: Επιδερμικά (cuticular) και απεκκριτικά/εκκριτικά (excretory/secretory) αντιγόνα που προέρχονται από τις μυϊκές προνύμφες και ανιχνεύονται αφού οι προνύμφες εγκατασταθούν στον μυϊκό ιστό, δηλαδή 4-5 βδομάδες μετά την μόλυνση του οργανισμού. Τα επιδερμικά αντιγόνα βρίσκονται, όπως δηλώνει και η ονομασία τους, στην επιφάνεια των προνυμφών και είναι σε σημεία όπου ο ξενιστής και το παράσιτο έρχονται σε επαφή. Οι νεογέννητες προνύμφες έχουν τέσσερα κύρια αντιγόνα με μοριακή μάζα 20, 30, 58 και 64 kDa. Οι προνύμφες έχουν τέσσερα κύρια αντιγόνα με μοριακές μάζες 47, 55, 90 και 105 kDa. Ενώ στον ενήλικο σκώληκα υπάρχουν τρία κύρια αντιγόνα με μοριακές μάζες 20, 33 και 40 kDa. Τα απεκκριτικά/εκκριτικά αντιγόνα παράγονται από το στιχόσωμα που βρίσκεται στον οισοφάγο των παρασίτων και διαφέρουν ως προς την αντιγονικότητα και τη σύνθεση των αντιγόνων ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης που βρίσκεται το παράσιτο. Τα αντιγόνα αυτά των προνυμφών που έχουν εγκατασταθεί στο μυϊκό ιστό αποτελούνται μία ομάδα γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες είναι δομικά συγγενείς, με μοριακά βάρη 45 ως 53 Da. Τα ενήλικα παράσιτα δεν παράγουν αυτά τα αντιγόνα.

4.2.1 Τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων

Η τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων (Indirect Fluorescent Antibody Technique -IFAT) χρησιμοποιεί το σώμα του *T. spiralis* ως μία σειρά αντιγόνων. Συνήθως ως φθορίζουσα χρωστική ουσία χρησιμοποιείται η φλουορεσίνη. Πρόκειται για μία τεχνική που παρουσιάζει ευαισθησία, αλλά η εφαρμογή της είναι περιορισμένη, καθώς η παρουσία ορισμένων άλλων παρασιτικών οργανισμών όπως είναι τα filariae (*Onchocera spp.*), του *Schistoma mansoni* μπορούν να οδηγήσουν σε ψευδή θετικά αποτελέσματα. Επίσης, πρόκειται για μία τεχνική που απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, εξειδικευμένους και έμπειρους αναλυτές και απαιτούνται διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων, μία διαδικασία που είναι χρονοβόρα και ακατάλληλη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων (Yang et al., 2016).

4.2.2 ELISA

Η ELISA είναι μία ενζυμική ανοσοπροσοφνητική μέθοδος ανίχνευσης της τριχινέλλωσης που χρησιμοποιείται συχνά τόσο σε ορολογικά δείγματα από ανθρώπους όσο και από ζώα. Παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με άλλους μεθόδους. Είναι εύκολη στην εφαρμογή, ειδική, γρήγορη και με δυνατότητα αυτοματοποίησης. Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία (1 προνύμφη / 100 g ιστού) στην ανίχνευση του παράσιτου της *Trichinella*, ακόμη και σε ζώα με μικρό μολυσματικό φορτίο (Yang et al., 2016).

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από το αντιγόνο που επιλέγεται αλλά και από τον ξενιστή. Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζεται η ευαισθησία και η εξειδίκευση συγκεκριμένων αντιγόνων σε συνάρτηση με διαφορετικού ξενιστές (ανθρώπους, χοίρους, άλογα)

Πίνακας 3: ELISA αντιγόνα για ανίχνευση αντισώματος *Trichinella*

Αντιγόνα	Ευαισθησία (sensitivity)	Ειδικότητα (specificity) ¹
Ακατέργαστη πηγή αντιγόνου (crude antigens)	99% (άνθρωποι, χοίροι)	60% (άνθρωποι)
Απεκκριτικά/εκκριτικά αντιγόνα (ES antigens)	99% (άνθρωποι) 93,1-99,2% (χοίροι) 98% (άλογα)	91-96% (άνθρωποι) 90,6-99,6% (χοίροι) 98% (άλογα)
β - τυβελόζη (beta tyvelose)	<98% (χοίροι) <98% (άλογα)	>99% (χοίροι)

Πηγή: Yang et al., 2016

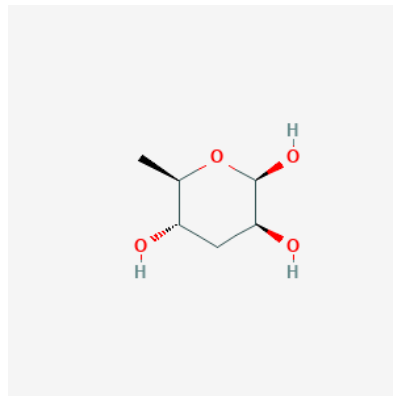
Αρχικά, κατά τη δοκιμασία ELISA εκτός από τα παραπάνω αντιγόνα, χρησιμοποιήθηκαν και σωματικά αντιγόνα των μυϊκών προνυμφών. Ωστόσο, αν και η παρασκευή τους συγκριτικά με τα υπόλοιπα αντιγόνα ήταν οικονομικότερη και ευκολότερη, ήταν μη ειδικά, με αποτέλεσμα να δίνουν ψευδή θετικά αποτελέσματα

¹ Ειδικότητα αντισώματος: Είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να εκφράσει τη συμπληρωματικότητα της στερεοδομής μεταξύ της περιοχής σύνδεσης του αντιγόνου και του αντισώματος. Βλ. <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/DIAT102/lianidou%20BIO%20immunoassays%20FULL%2009-10.pdf>

παρουσία άλλων παράσιτων όπως *A. suum* ή *T.suis*. Οπότε η χρήση τους περιορίστηκε στο ελάχιστο.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η χρήση των επεκκριτικών/εκκριτικών αντιγόνων στις δοκιμές ELISA αν οι μικροπεριβαλλοντικές συνθήκες δεν είναι σταθερές κατά την καλλιέργεια των προνυμφών, η ποιότητα του αντιγόνου που παραλαμβάνεται υποβαθμίζεται και έτσι δημιουργούνται προβλήματα τυποποίησης. Επίσης, μπορούν να δωθούν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αν η μόλυνση είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο (Yang et al., 2016).

Η β-τυβελόζη (εικόνα 7) είναι συνθετικό αντιγόνο. Πρόκειται για έναν υδατάνθρακα ο οποίος είναι ο κύριος ανοσοεπικρατής επίτοπος² των κυρίαρχων αντιγόνων της *Trichinella* (TSL-1), έχει συντεθεί και χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των αντίστοιχων αντισωμάτων του παράσιτου. Η β-τυβελόζη χαρακτηρίζεται από σταθερότητα και τυποποίηση. Σε ανθρώπους και χοίρους, παρουσιάζει ίδια ειδικότητα με την ειδικότητα που παρουσίασαν τα επεκκριτικά/εκκριτικά αντιγόνα. Ωστόσο, έχει μικρότερη ευαισθησία, οπότε θεωρείται από αρκετούς ερευνητές ως ακατάλληλο για την παρακολούθηση της τριχινέλλωσης σε κοπάδια χοίρων (Yang et al., 2016)..



Εικόνα 7: Beta tyvelose

Πηγή: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Tyvelose>

Οι Aranzamendi et al. (2011) πρότειναν ως πιθανόν αντιγόνο για την ανίχνευση της *Trichinella* με τη μέθοδο ELISA μία μικροσυστοιχία γλυκάνης (GalNAcβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc-R (LDNF). Κατά την πειραματική επαλήθευση της πρότασης τους τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πρόκειται για ένα αντιγόνο με καλή ευαισθησία και

² Επίτοπος: πολύ μικρή περιοχή του αντιγόνου που συνήθως αποτελείται από 5-7 αμινοξέα και συνδέεται με το αντίσωμα βλ. <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/DIAT102/lianidou%20BIO%20immunoassays%20FULL%2009-10.pdf>

ειδικότητα, πιθανόν κατάλληλο για να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα (Aranzamendi et al., 2021).

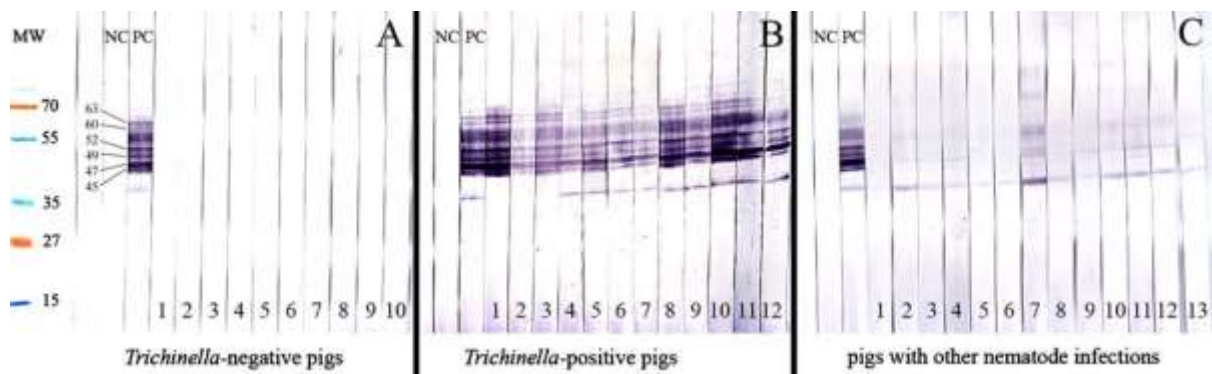
4.2.3 Δοκιμασία Western blot

Η δοκιμασία Western blot ή μέθοδος ανοσοαποτύπωσης, βασίζεται είτε σε απεκκριτικά/εκκρινικά αντιγόνα (ES) είτε σε ακατέργαστα εκχυλίσματα σκουληκιών (crude worm extracts) των μυϊκών προνυμφών. Περιλαμβάνει δύο στάδια: την εκχύλιση πρωτεϊνών από κατάλληλη καλλιέργεια και διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης. Αρχικά οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και κατά την ηλεκτροφόρηση στη γέλη κινούνται από την κάθοδο προς την άνοδο (Yang et al., 2016)..

Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών αντιγόνων *Trichinella* και μπορεί να διακρίνει τα αντισώματα που δίνουν διασταυρούμενη αντίδραση (cross-reaction), δηλαδή αντισώματα με παρόμοιο αντιγονικό επίτοπο που μπορούν να ενωθούν με το αντιγόνο. Ωστόσο, πρόκειται για μία δοκιμή που απαιτεί εμπειρία από τον αναλυτή, είναι χρονοβόρα, με υψηλό κόστος. Συνήθως, η τεχνική αυτή δεν χρησιμοποιείται για ελέγχους ρουτίνας, αλλά ως συμπληρωματική μέθοδος ώστε να επιβεβαιώσει τα θετικά αποτελέσματα άλλων δοκιμών, όπως της ELISA (Yang et al., 2016).

Οι Frey et al, (2009) πραγματοποίησαν μελέτη με σκοπό να αξιολογήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα που μία δοκιμασία Western Blot μπορεί να παρουσιάζει με βάση το σωματικό αντιγόνο *T. spiralis* που βρίσκεται στο στάδιο της προνύμφης που έχει εγκατασταθεί στο μυϊκό ιστό. Χρησιμοποίησαν 295 δείγματα εκχυλίσματος κρέατος και ορού από χοίρους που είχαν ελεγχθεί με πέψη για παρουσία προνυμφών *Trichinella* και είχαν βρεθεί αρνητικά, 74 δείγματα ορών χοίρων μολυσμένα με άλλα παράσιτα με δυνητικά διασταυρούμενη αντίδραση και 93 δείγματα εκχυλίσματος κρέατος θετικών στην παρουσία προνυμφών *Trichinella*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ευαισθησία της μεθόδου κυμάνθηκε μεταξύ 95,8% - 96,0% και η ειδικότητα ήταν 99,5% - 99,6%. Πρόκειται, λοιπόν, για μία δοκιμασία ακριβής, ειδικής και κατάλληλης να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα άλλων δοκιμών (Frey et al., 2009).

Στην παρακάτω εικόνα 8 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης Western blot για δείγματα που έχουν ελεγχθεί για την παρουσία *Trichinella*.



Εικόνα 8: Western blot ανάλυση για δείγματα χοίρου A) αρνητικά σε *Trichinella* B) θετικά σε *Trichinella* C) θετικά σε άλλα νηματώδη παράσιτα

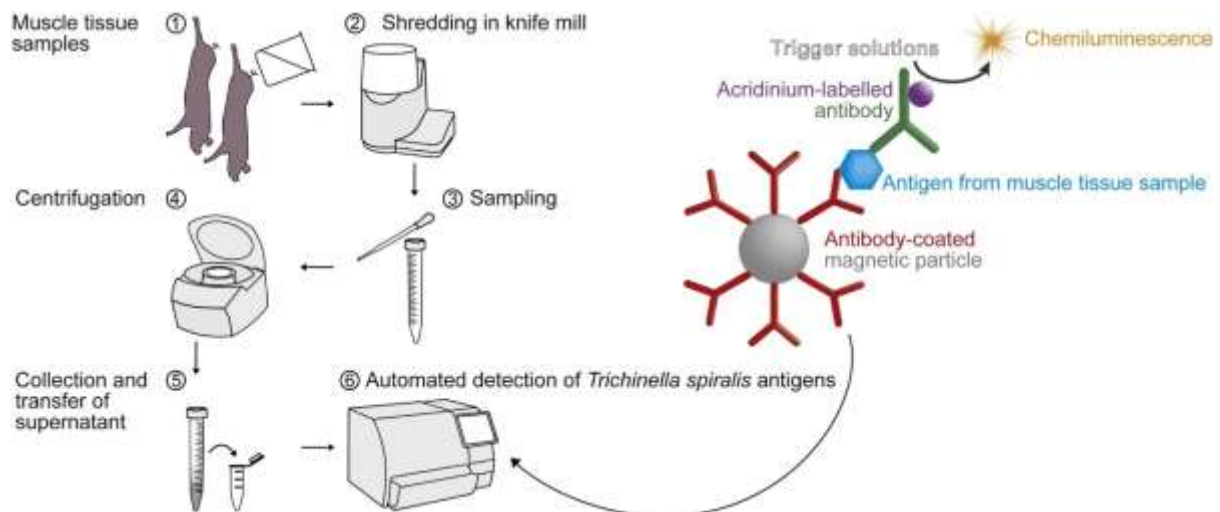
Πηγή: Frey et al., 2009

4.2.3 Άλλες μέθοδοι ανίχνευσης *Trichinella*

Μέθοδος συμπίεσης. Άμεση ανίχνευση *Trichinella*. Πρόκειται για μία από τις παλαιότερες μεθόδους ανίχνευσης της *Trichinella* και χρησιμοποιείται συχνά, καθώς είναι απλή και γρήγορη. Μικρά κομμάτια κρέατος ή ιστού, χοιρινού ή άλλου ζώου που θεωρείται ύποπτο ότι έχει μολυνθεί, συλλέγεται κατά προτίμηση από τους πυλώνες (pillars) του διαφράγματος. Τοποθετείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών με μεγάλο πάχος και συμπιέζονται. Το συμπιεσμένο δείγμα εξετάζεται στο μικροσκόπιο. Απαιτείται δείγμα περίπου 1g και θεωρείται ότι έχει ευαισθησία 1 προνύμφη/g, αν και πρακτικά έχει αποδειχθεί ότι η ευαισθησία είναι 3 προνύμφες/g. Θεωρείται κατάλληλη μέθοδος για μικρό αριθμό δειγμάτων και για τα σφάγια άγριων σαρκοφάγων θηραμάτων τα οποία θα καταναλωθούν από τον άνθρωπο (ICT, 2022b).

Ανοσοδοκιμασία βασισμένη στη χημειοφωταύγεια (immunoassay based on chemiluminescence – ChLIA): Οι Braach et al. (2020) εισήγαγαν μία νέα μέθοδο ανίχνευσης της *Trichinella*, η οποία βασίζεται στη χημειοφωταύγεια και παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία (ανιχνεύει 1 προνύμφη σε 100g κρέατος χοίρου). Για την αξιολόγηση της μεθόδου χρησιμοποίησαν 37 δείγματα μυϊκού ιστού από μη μολυσμένους χοίρους, 56 δείγματα ιστού μη μολυσμένων χοίρων με ενσωματωμένες ποσότητες μη ενθυλακωμένων προνυμφών *Trichinella*, 32 δείγματα μυϊκού ιστού από μολυσμένους χοίρους με ενθυλακωμένες σε κολλαγόνο προνύμφες *T. spiralis* και 30 δείγματα μολυσμένα με παράσιτα που μπορούν αν δώσουν διασταυρούμενη

αντίδραση (*T. suis*, *A. suum*, *T. godnii*, *S. papillosus*, *T. cati*). Τα δείγματα αρχικά τεμαχίστηκαν σε μύλο με μαχαιρία και οι προνύμφες καταστράφηκαν. Ακολούθησε φυγοκέντρηση όπου έγινε συλλογή του υπερκείμενου υγρού (εκχύλισμα κρέατος). Το υγρό αυτό περιείχε μέσα και απελευθερωμένα από τις προνύμφες απεκκριτικά και εκκριτικά αντιγόνα. Εφαρμόστηκε η μέθοδος ChLIA στα εκχυλίσματα των δειγμάτων και τα απελευθερωμένα αντιγόνα δεσμεύτηκαν από τα επιλεγμένα αντισώματα. Μετρήθηκε η χημειοφωταύγεια των δειγμάτων. Βρέθηκε συνολική ακρίβεια 97.6% και ειδικότητα. Στα μολυσμένα δείγματα ιστών χοίρου η ακρίβεια ήταν 100%. Δεν παρατηρήθηκε διασταυρούμενη αντίδραση και είναι μία μέθοδος γρήγορη και απλή στην εφαρμογή της (Braasch et al., 2020). Στην εικόνα 9 είναι η σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων βημάτων που ακολουθήθηκαν.



Εικόνα 9: Σχηματικά αναπαράσταση της μεθόδου ChLIA

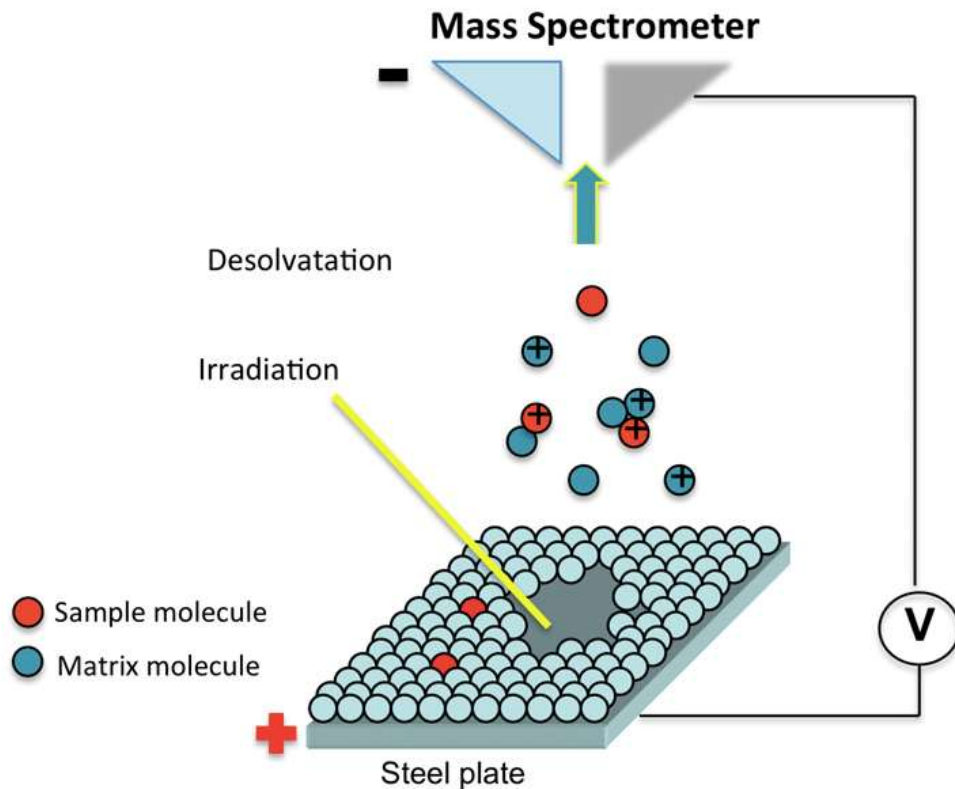
Πηγή: Braash et al., 2020

Πρωτεομική ανάλυση. Βασίζεται στην ανάλυση του πρωτεόματος, δηλαδή το σύνολο των πρωτεϊνικών μορίων ενός οργανικού, ενός ιστού ή ενός κυττάρου. Σύμφωνα με μελέτες, το *T. spiralis* κατά τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, παρουσιάζει διαφορετική έκφραση πρωτεϊνών. Ορισμένες πρωτεΐνες μπορούν να ανιχνευθούν από αντισώματα που απομονώθηκαν από ποντίκια τα οποία είχαν μολυνθεί με το παράσιτο. Μία προοπτική που εξετάζεται είναι οι πρωτεΐνες αυτές να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση της μόλυνσης αλλά και στον σχεδιασμό εμβολίων κατά του *T. spiralis* (Bermudez-Cruz et al., 2016).

Οι Bermudez-Cruz et al. (2016) εφαρμόζοντας αναλύσεις πρωτεομίας και φασματοφωτομετρίας μάζας κατάφεραν να ταυτοποιήσουν τα αντιγόνα του *T. spiralis* από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του παρασίτου, συγκεκριμένα τις προνύμφες που

εγκαθίστανται στον μυϊκό ιστό (αντιγόνα TS1) και τις νεογέννητες προνύμφες. Έλαβαν δείγματα 6h, 18h και 30h μετά τη μόλυνση. Τα ευρήματα έδειξαν μια διαφορετική έκφραση αρκετών πρωτεϊνών με διαφορετική λειτουργία στα δύο στάδια ανάπτυξης με μοριακές μάζες στην περιοχή 13-224 kDa και εύρος pI 4,54-9,89 (Bermudez-Cruz et al., 2016).

Διαφορές δεν παρουσιάζονται μόνο μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών *Trichinellas*. Οι Gondek et al. (2020) σε μελέτη που πραγματοποίησαν εξέτασαν το προφίλ έκφρασης των πρωτεϊνών του ορού τριών ομάδων μολυσμένων πειραματικά χοίρων με *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* και *Trichinella pseudospiralis* αντίστοιχα κατά την 13^η και 60^η ημέρα. Η πρωτεϊνική έκφραση των μολυσμένων χοίρων συγκρίθηκε με την πρωτεϊνική έκφραση μη μολυσμένων χοίρων (δείγματα ελέγχου). Η διαδικασία πρωτεομικής ανάλυσης έγινε με ηλεκτροφόρηση γέλης δύο διαστάσεων (two-dimensional gel electrophoresis) και στη συνέχεια ακολούθησε φασματομετρία μάζας με μηχανισμό εκρόφησης/ιοντισμού με λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI-TOF) (εικόνα 10). Η μέθοδος MALDI-TOF βασίζεται στην παραγωγή μεμονωμένων ιόντων πρωτεΐνης τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη αναλογία της μάζας προς φορτίο (m/z). Τα ιόντα εισέρχονται μέσα σε ένα σταθερό ηλεκτρικό πεδίο και επιταχύνονται μέχρι που φθάνουν σε ένα σωλήνα χρόνου πτήσης (field-free time-of flight) ο οποίος δεν έχει πεδίο και λειτουργεί ως ανιχνευτής. Η ταχύτητα τους εξαρτάται από την αναλογία μάζας/ φορτίο και εισέρχονται στο σωλήνα σε διαφορετικούς χρόνους λόγω των διαφορετικών μαζών. Προκύπτει ένα φάσμα στο οποίο ταυτοποιούνται οι πρωτεΐνες με τη βοήθεια δεδομένων βιβλιοθηκών αναφοράς.



Εικόνα 10: Αρχή λειτουργίας MALDI-TOF

Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/The-principle-of-matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time-of-flight-mass_fig3_275518433

Στο πείραμα των Gondek et al., (2020) η πρωτεομική ανάλυση της ομάδας δειγμάτων που είχαν μολυνθεί με *T. spiralis* συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου έδειξε 5 διαφορετικά εκφραζόμενα σημεία και στις 13 και στις 60 d.p.i. Ομοίως διαφορές παρουσιάστηκαν και μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των δειγμάτων που οι χοίροι είχαν μολυνθεί με *T. britoni* (3 αλλαγές έκφρασης στις 13 d.p.i. και 6 πρωτεϊνικές στα 60 d.p.i.) και με *T. pseudospiralis* (6 διαφορετικά αλλαγμένα σημεία στις 13 d.p.i. και 2 στα 60 d.p.i) (Gondek et al., 2020).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το *Trichinella spiralis* είναι παρασιτικός οργανισμός που μολύνει θηλαστικά ζώα, οικόσιτα ή άγρια ζώα, ακόμη και τον άνθρωπο. Το παράσιτο εισέρχεται στον οργανισμό- ξενιστή μέσω μολυσμένης τροφής. Στο έντερο ελευθερώνονται με τη βοήθεια των υγρών του στομάχου οι προνύμφες που βρίσκονταν στους μυϊκούς ιστούς στο κρέας που καταναλώθηκε. Αυτές οι προνύμφες, ενηλικιώνονται, αναπαραγόνται και οι νεαρές προνύμφες κινούνται με τη βοήθεια του αίματος σε γραμμωτούς μύες του σώματος όπου και εισέρχονται στον ιστό, όπου και ενθυλακώνονται.

Τα περιστατικά μόλυνσης με *Trichinella* οφείλονται κυρίως στην κατανάλωση κρέατος χοίρου το οποίο δεν έχει υποστεί σωστή θερμική επεξεργασία, δηλαδή είναι ωμό ή κακώς μαγειρεμένο. Η τριχινέλλωση είναι μία λοίμωξη που αντιμετωπίζεται δύσκολα όταν το παράσιτο έχει εγκατασταθεί στο μυϊκό ιστό και συνοδεύεται από ειδικά (περικογχικό οίδημα) ή μη ειδικά (μυαλγία, πυρετός). Μπορεί να προκαλέσει και πιο σοβαρά συμπτώματα όπως μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα και θρομβοεμβολική νόσος και να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο.

Μέσω νομοθεσίας καθορίζεται η μέθοδος αναφοράς για την ανίχνευση *Trichinella* σε ζώα και ζωϊκά προϊόντα (πέψη με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα), καθώς και οι εναλλακτικές μέθοδοι που μπορούν να την αντικαταστήσουν, όπως είναι η μηχανικά υποβοηθούμενη πέψη/ τεχνική της απομόνωσης με καθίζηση, η αυτόματη πέψη, η πέψη συγχωνευμένων δειγμάτων, η δοκιμή PrioCheck *Trichinella* AAD Kit . Ωστόσο έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται ευρέως νέες τεχνικές οι οποίες προσφέρουν ταχύτητα, ακρίβεια, ειδικότητα και ευαισθησία στην ανίχνευση του παράσιτου, όπως η μέθοδος ELISA και η μέθοδος Western blot. Ένα θετικό αποτέλεσμα θα πρέπει να επαληθευθεί με κάποια από τις μεθόδους που επιτρέπει η νομοθεσία.

Απαιτείται προσοχή κατά την κατανάλωση κρέατος και κρεατικών σκευασμάτων. Ο καταναλωτής θα πρέπει να επιλέγει κρέατα που έχουν υποβληθεί σε έλεγχο για μόλυνση από *T. spiralis*. Θα πρέπει να αποφεύγει να καταναλώνει ωμό ή μη θερμικά επεξεργασμένο χοιρινό κρέας ή θήραμα. Η ενημέρωση του καταναλωτή για τον σωστό τρόπο επιλογής και χειρισμού του κρέατος είναι απαραίτητος.

Οι αρμόδιες αρχές, αλλά και οι κτηνοτροφικές μονάδες και τα σφαγεία θα πρέπει να ασκούν συνεχείς ελέγχους στα ζώα που προορίζονται για σφαγή και κατανάλωση, ενώ θα πρέπει να τηρούνται οι κανόνες υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων, καθώς και οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής.

Στον ερευνητικό τομέα, είναι χρήσιμο να συνεχισθεί η προσπάθεια για την εύρεση νέων μεθόδων ανίχνευσης του *T.spiralis*, οι οποίες θα είναι ταχείς, απλές και ακριβείς.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Aranzamendi, C., Tefsen, B., Jansen, M., Chumiento, L., Bruschi, F., Kortbeek, T., Smith, D.F., Cumming, R.D., Pinelli, E., Van Die, I.** (2011). Glycan microarray profiling of parasite infection antigen for serodiagnosis of trichinellosis. *Experimental Parasitology*, 12 (3): 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.08.015>
- **Bermudez-Cruz, R.M., Fonseca-Linan, R., Grijalva-Contreras, L.E., Mendoza-Hernandez, G., Ortega-Pierres, M.G.** (2016). Proteomic analysis and immunodetection of antigens from early developmental stages of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*, 231: 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.029>
- **Biska-Zajac, E. Thompson, P., Rosenthl, V., Rozycki, M., Cencek, T.** (2021). Infection, genetics, and evolution of *Trichinella*: Historical insights and application to molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 95: 105080. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105080>
- **Bogitsh, B.J., Carter, C.E., Oeltmann, T.N.** (2013). Chapter 16 – Intestinal Nematodes. In: *Human Parasitology* (Fourth Edition): 291-327. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415915-0.00016-9>
- **Braasch, J., Ostermann, S., Mackiewicz, M., Bardot, C., Pagneux, C., Bochart-Loholter, V., Lattwein, E.** (2020). *Trichinella spiralis* – New method for sample preparation and objective detection of specific antigens using a chemiluminescence immunoassay. *Veterinary Parasitology*, 277: 10033. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2020.100033>
- **CDC** (Centers for Disease Control and Prevention). (2017). Trichinellosis. *Trichinella* spp. Available online [23/06/2022]: <https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html>
- **Cui, J., Wang, Q., Hu, D.S.** (2006). The epidemiology of swine trichinellosis in China during 1999-2004. *Helminthologia*, 43: 21-26. <https://doi.org/10.2478/s11687-006-0005-1>
- **Ding, J., Tang, B., Liu, X., Bai, X., Wang, Y, Li, S., Li, J., Liu, M., Wang, X.** (2022). Excretory -secretory product of *Trichinella spiralis* inhibits tumor cell growth by

regulating the immune response and inducing apoptosis. *Acta Tropica*, 225: 106172.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106172>

• **Dobrescu, C., Hriscu, H., Emandi, M., Zamfir, C., Nemet, C.** (2014). Consumption of untested pork contributed to over two-thousand clinical cases of human trichinellosis in Romania. *Folia Parasitologica*, 61 (6): 558-560. doi: 10.14411/fp.2014.055

• **Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΕ) 2015/1375** της Επιτροπής της 10^{ης} Αυγούστου 2015 για τη θέσπιση ειδικών κανόνων σχετικά με τους επίσημους ελέγχους για ανίχνευση *Trichinella* (τριχίνης) στο κρέας. L212/7. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022] : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1375&from=en>

• **Εκτελεστικός Κανονισμός (ΕΕ) 2016/1843** της Επιτροπής της 18^{ης} Οκτωβρίου 2016 για τη λήψη μεταβατικών μέτρων για τη λήψη μεταβατικών μέτρων σχετικά με την εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με τη διαπίστωση των επίσημων εργαστηρίων που πραγματοποιούν επίσημες δοκιμές ανίχνευσης *Trichinella*. L 282/38. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022] : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R1843&from=EN>

• **Elhasawy, F.A., Ashour, D.S., ElSaka, A.M., Ismail, H.** (2021). The Apoptotic Effect of *Trichinella spiralis* Infection Against Experimentally Induced Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pasific Journal of Cancer Prevention*, 22 (3): 935-946.
<https://doi.org/10.31557%2FAPJCP.2021.22.3.935>

• **European Commission.** Guidelines on minimum recommendations for official laboratory appointed for the detection of *Trichinella* in meat Endorsed by qualified majority by the Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed during its meeting on 1 February 2018. In the article: *Control of Trichinella*. Available online [23/06/2022]: https://ec.europa.eu/food/system/files/2018-02/biosafety_food-borne-disease_trich_testing-lab-recom.pdf

• **FDA** (U.S. Food & Drug Administration. (2022). HACCP Principles & Application Guidelines. Available online [23/06/2022]: <https://www.fda.gov/food/hazard-analysis-critical-control-point-haccp/haccp-principles-application-guidelines>

• **Franssen, F., Deng, H., Swart, A., Marinovic, A.B., Liu, X., Liu, M, Van der Giessen, J.** (2021). Inactivation of *Trichinella* muscle larvae at different time-temperature heating profiles simulating home-cooking. *Experimental Parasitology*, 224: 108099. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2021.108099>

• **Frey, C.F., Schuppers, M.E., Nockler, K., Marinculic, A., Pozio, E., Kihm, E., Gottstein, B.** (2009). Validation of a Western Blot for the detection of anti-*Trichinella* spp., antibodies in domestic pigs. *Parasitology Research*, 104 (6): 1269-1277. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1321-9>

• **Gondek, M., Herosimczyk, A., Knysz, P., Ozgo, M., Lepczynski, A., Szkucik, K.** (2020). Comparative Proteomic Analysis of Serum from Pigs Experimentally Infected with *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, and *Trichinella pseudospiralis*. *Pathogens*, 9 (1): 55. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010055>

• **Hill, D.E., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Gamble, H.R., Hawkins – Cooper, D.S., Gajadhar, A.A., Holley, R., Juneja, V.K., Dubey, J.P.** (2017). Curing conditions to inactivate *Trichinella spiralis* muscle larvae in ready – eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology*, 6-7: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.06.001>

• **ICT** (International Commission on Trichinellosis). (2022a). Species and Genotypes of *Trichinella*. Available online [18/05/2022]: http://www.trichinellosis.org/Species_and_Genotypes.html

• **ICT** (International Commission on Trichinellosis). (2022b). Control and Prevention in Pork and Other Meat from Food Animals. Available online [18/05/2022]: http://www.trichinellosis.org/Control_and_Prevention.html

• **Johne, A., Filter, M., Gayda, J., Buschulte, A., Bandick, N., Nockler, K., Mayer-Scholl, A.** (2021). Reprint of: Survival of *Trichinella spiralis* in cured meat products. *Veterinary Parasitology*, 297: 109544. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109544>

• **Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29^{ης} Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. L139/55. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0853&from=GA>

• **Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 854/2004** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29^{ης} Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών διατάξεων για την οργάνωση των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. *L 139/206*. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0854&from=EN>

• **Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 882/2004** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29^{ης} Απριλίου 2004 για τη διενέργεια επισήμων ελέγχων της συμμόρφωσης προς τη νομοθεσία περί ζωοτροφών και τροφίμων και προς τους κανόνες για την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων. *EE L191 Τροποποίηση 20.03.2008*. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02004R0882-20080320&from=LT>

• **Κανονισμός (ΕΕ) 2017/625** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της ης 15ης Μαρτίου 2017 για τους επίσημους ελέγχους και τις άλλες επίσημες δραστηριότητες που διενεργούνται με σκοπό την εξασφάλιση της εφαρμογής της νομοθεσίας για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και των κανόνων για την υγεία και την καλή μεταχείριση των ζώων, την υγεία των φυτών και τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, για την τροποποίηση των κανονισμών του άρθρου και του Συμβουλίου (ΕΚ) 999/ 2001, (ΕΚ) αριθ. 396/2005, (ΕΚ) αριθ. 1069/2009, (ΕΚ) αριθ. 1107/2009, (ΕΕ) αριθ. 1151/2012, (ΕΕ) αριθ. 652/2014, (ΕΕ) 2016/429 και (ΕΕ) 2016/2031, των κανονισμών του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1/2005 και (ΕΚ) αριθ. 1099/2009 και των οδηγιών του Συμβουλίου 98/58/ΕΚ, 1999/74/ΕΚ, 2007/43/ΕΚ, 2008/ 119/ΕΚ και 2008/120/ΕΚ και για την κατάργηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 854/2004 και (ΕΚ) αριθ. 882/2004, των οδηγιών του Συμβουλίου 89/608/ΕΟΚ, 89/ 662/ΕΟΚ, 90/425/ΕΟΚ, 91/496/ΕΟΚ, 96/23/ΕΚ, 96/93/ΕΚ και 97/78/ΕΚ και της απόφασης 92/438/ΕΟΚ του Συμβουλίου (κανονισμός για τους επίσημους ελέγχους). *L 95/1*. Διατίθεται στο διαδίκτυο [23/06/2022]: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0625&from=EN>

• **Larrieu, E., Molina, V. Albarracin, S., Mancini, S., Bigatti, R., Ledesma, L., Chiosso, C., Krivokapich, S., Herrero, E., Guarnera, E.** (2004). Porcine and rodent infection with *Trichinella*, in Siera Grande area of Rion Negro province, Argentina.

Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 98 (7): 725-731.
<https://doi.org/10.1179/000349804225021460>

• **Liao, C., Cheng, X., Liu, M., Wang, X., Boireau, P.** (2018). Trichinella spiralis and Tumors: Cause Coincidence or Treatment? *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 18 (8) :1091-1099.
<https://doi.org/10.2174%2F1871520617666171121115847>

• **Marchiondo, A.A., Cruthers, L.R., Zarlenga, D.S., Yazwinski, T.A.** (2019). Chapter 2i – Nematoda, Trichinelloida. In book: Marchiondo, A.A., Cruthers, L.R., Fourie, J.J (editors). , vol.2: 309-313. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816577-5.00007-7>

• **Mayer-Scholl, A., Pozio, E., Gayda, J., Thaben, N., Bahn, P., Nockler, K.** (2017). Magnetic Stirrer Method for the Detection of Trichinella Larvae in Muscle Samples. *Journal of Visualized Experiments*, (121): 55354.
<https://doi.org/10.3791%2F55354>

• **Moller, L.N., Koch, A., Petersen, E., Hjuler, T., Kapel, C.M.O., Andersen, A., Melbye, M.** (2010). Trichinella infection in a hunting community in East Greenland. *Epidemiology and Infection*, 138 (9): 1252-1256.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0950268810000282>

• **Murell, K.D. & Pozio, E.** (2011). Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (12): 2193-2202.
<https://doi.org/10.3201%2F1712.110896>

• **Ng-Nguyen, D., Stevenson, M., Traub, R.** (2017). A systematic review of taeniasis, cysticercosis and trichinellosis in Vietnam. *Parasites & Vectors*, 10: 150.
<https://doi.org/10.1007/s10389-016-0724-9>

• **Rainova, I., Kaftandjiev, I., Harazanov, R., Tsvetkova, N., Jordanova, D., Marinova, I., Kurdova, R., Kantardjiev, T., Lalkovski, N.** (2016). Outbreaks of human trichinellosis, still a challenge for the public health authorities in Bulgaria. *Journal of Public Health*, 24: 291-297. <https://doi.org/10.1007/s10389-016-0724-9>

• **Ribicich, M.M., Farina, F.A., Aronowicz, T., Ercole, M.E., Bessi, C., Winter, M., Pasqualetti, M.** (2021). Reprint of: A review on Trichinella infection in South

America. *Veterinary Parasitology*, 297: 109540.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109540>

• **ThermoFisher Scientific.** (2022). PrioCHECK™ Trichinella Alternative Artificial Digestion (AAD) Kit. Available online [23/06/2022]:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/7620030>

• **Vasilev, S., Ilic, N., Gruden-Movsesijan, A., Vasilijic, S., Bosic, M., Sofronic-Milosavljevic, L.** (2015). Necrosis and apoptosis in *Trichinella spiralis* - mediated tumour reduction. *Central European Journal of Immunology*. 40 (1): 42-53.
<https://doi.org/10.5114%2Fceji.2015.50832>

• **Wu, H., Li, M., Shao, X., An, Z., Du, J., Yin, H., Pan, J., Li, S., Zhang, Y., Du, L.** (2020). *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory/ secretory products trigger apoptosis and S-phase arrest of the non-small- cell lung cancer line A549. *Experimental Parasitology*, 218: 10783.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107983>

• **Yang, Y., Cai, Y.N., Tong, M.W., Sun, N., Xuan, Y.H., Kang, Y.J., Vallee, I., Boireau, P., Cheng, S.P., Liu, M.Y.** (2016). Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health* 2: 25-30.
<https://doi.org/10.1016%2Fj.onehlt.2015.11.005>

• **Zhang, X.Z., Wang, Z.Q., Cui, J.** (2022). Epidemiology of trichinellosis in the People's Republic of China during 2009-2020. *Acta Tropica*, 229: 106388.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106388>