

Włośnica u zwierząt wolno żyjących i świń w Polsce^{*})

WŁADYSŁAW CABAJ, BOŻENA MOSKWA, KATARZYNA PASTUSIAK,
ANDRZEJ MALCZEWSKI

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

Cabaj W., Moskwa B., Pastusiak K., Malczewski A.

Trichinellosis in wild animals and domestic pigs in Poland

Summary

The aim of the present survey was to determine the distribution of *Trichinella* species in wild animals such as red fox, wolves, wild boar, and domestic pigs in Poland. Muscles, mainly from the diaphragm and forelegs, have been collected from animals killed by hunters in different regions of Poland between 1999-2003. *Trichinella* larvae have been collected after artificial digestion of the muscles and preserved in absolute alcohol until molecular identification. Muscle larvae were identified at the species level by several analyses based on polymerase chain reaction (i.e., RAPD, PCR-RFLP and multiplex PCR). Of 53 *Trichinella* isolates from red foxes, 40 resulted from *T. britovi*, 6 *T. spiralis*, 4 were of mixed infection with two species and 3 remained unidentified. Of 66 *Trichinella* isolates from wild boars, 42 resulted from *T. spiralis*, 16 *T. britovi*, 1 from mixed infection and 6 were unidentified. Of 6 examined wolves from the Bieszczady region 3 animals resulted positive for *Trichinella* larvae and harboured *T. britovi*. Of 19 *Trichinella* isolates from domestic pigs, 18 resulted from *T. spiralis* and 1 from *T. britovi*. These results show that two *Trichinella* species are involved in the epidemiology of trichinellosis among wildlife in Poland. *T. britovi* is the dominant species in red foxes, in contrast to wild boars where *T. spiralis* dominates. *Trichinella spiralis* is the prevalent etiologic agent of domestic trichinellosis, although the sylvatic species *T. britovi* can also be present in the domestic habitat, suggesting a link between the sylvatic and domestic cycle.

Keywords: wild animals, pigs, *Trichinella*

Trichinella spiralis (Railliet, 1895) – włosień kręty jest nicieniem rozdzielnopłciowym, należącym do typu *Nematoda*, gromady *Adenophorea*, rodziny *Trichinellidae* (7). Jest pasożytem poliksenicznym. Praktycznie wszystkie gatunki ssaków są podatne na doświadczalne zarażenie *Trichinella*. W sposób naturalny, *per os*, zaraża się człowiek i zwierzęta drapieżne (koty, psy, wilki, lisy, rysie, niedźwiedzie), wszystkożerne (świnie, dziki) i gryzonie (szczury, myszy). Inne zwierzęta, jak: koń, baran, owca, królik są również podatne na zarażenie larwami *Trichinella*, a więc mogą stanowić rezerwuar i źródło inwazji dla człowieka. Włośnica jest typowym przykładem zoonozy pasożytniczej, w której proces epizootologiczny jest złożony, z uwagi na możliwość krążenia pasożyta w różnych środowiskach (synantropijne/związane z działalnością człowieka oraz naturalne/leśne) i różnych strefach zoogeograficznych. W Europie występują cztery gatunki włośni: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa* oraz *T. pseudospiralis*. W Polsce, do 1998 r., pisano o *T. spiralis* przy różnego rodzaju badaniach epidemiologiczno-epizootologicznych. Po raz pierwszy *T. britovi* stwierdzono u dwóch lisów z okolic Poznania (8), a następnie

u dalszych 38 lisów z innych rejonów Polski (4). Przedstawiane obecnie wyniki są kontynuacją badań nad występowaniem włośni u zwierząt wolno żyjących (lisy, wilki, dziki) oraz świń domowych. Dwa ostatnie gatunki są ważne dla człowieka, ponieważ mogą stanowić bezpośrednie źródło inwazji (tradycja spożywania mięsa wieprzowego i dziczyzny w Polsce).

Materiał i metody

Pozyskane od myśliwych tuszki lisów i dzików, jak również fragmenty tuszek wilków, jenotów i kuny wytrawiano zgodnie z powszechnie obowiązującą metodą wytrawiania (3). Odzyskane larwy przetrzymywano do dalszych badań w alkoholu (75%), temp. -20°C lub w głębokim mrożeniu (-80°C). Fragmenty tuszek zarażonych dzików i świń domowych pozyskano od współpracujących z Instytutem wojewódzkich lekarzy weterynarii oraz z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach. Larwy włośni przesyłano do Międzynarodowego Centrum Referencyjnego dla nicieni z rodzaju *Trichinella* (ITRC) w Rzymie w celu dokonania rejestracji i identyfikacji gatunkowej izolatów włośni metodami biologii molekularnej RAPD (1), PCR-RFLP (13) oraz multiplex-PCR (14). W Instytucie stosowano metodę identyfikacji RAPD (1) oraz w ostatnim roku badań własną metodę identyfikacji larw *T. britovi* i *T. spiralis* (2).

^{*} Badania finansowane częściowo w ramach grantu KBN Nr 6 PO4C 02218.

Wyniki i omówienie

W latach 1996-2002 pozyskano łącznie 141 izolaty włośni od różnych gatunków zwierząt ubitych w różnych rejonach Polski.

Lisy. Wcześniejsze wyniki badań prowadzonych przez zespół zostały opublikowane w 2000 r. (4). Od tego czasu udało się zidentyfikować kolejnych 9 izolatów włośni pochodzących od lisów upolowanych w okolicach Miastka (2 osobniki), Brzegów Dolnych, Bukowca Lasu k. Tczewa (2 osobniki), Stężycy k. Kościerzyny, Kielna k. Wejherowa, Lipusza k. Kościerzyny, Gardeji k. Kwidzyna. Tylko jeden izolat z okolic Miastka zidentyfikowano jako *T. spiralis*, a pozostałe jako *T. britovi*. Populacja lisa w Polsce z roku na rok rośnie i obecnie waha się w granicach 120-130 tysięcy osobników. Łącznie na 1290 przebadanych tuszek lisów 81 osobników okazało się zarażonych larwami *Trichinella spp.*, co stanowi 6,3% przebadanej populacji. Do badań molekularnych użyto 53 izolatów. Czterdzieści zidentyfikowano jako *T. britovi*, 6 – *T. spiralis*, u 4 osobników stwierdzono mieszane inwazje dwoma gatunkami włośni. Natomiast larwy od 3 osobników pozostają niezidentyfikowane (prawdopodobnie zdegradowany DNA).

Wilki. W Polsce wilki są gatunkiem zwierząt objętym całkowitą ochroną. Fragmenty tuszek padłych wilków w rejonie Bieszczad (przyczyna trudna do ustalenia) otrzymano od dr. Romana Guli z Międzynarodo-

Tab. 1. Wyniki badań w kierunku *Trichinella spp.* u dzików i świń domowych w Polsce*

Rok	Liczba dzików			Liczba świń		
	zbadanych	zarażonych	%	zbadanych	zarażonych	%
1996	51 738	145	0,28	18 257 375	172	0,00094
1997	33 713	105	0,31	17 567 346	75	0,00043
1998	41 868	69	0,16	18 483 016	66	0,00036
1999	48 674	116	0,24	19 000 000	135	0,00071
2000	44 378	80	0,18	18 672 000	88	0,00047
2001	54 042	105	0,19	13 018 893	33	0,00025

Objaśnienia: * Dane ze sprawozdań z wyników urzędowego badania zwierząt rzeźnych i mięsa, drobiu i królików za wymienione lata (RRW-6, Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi)

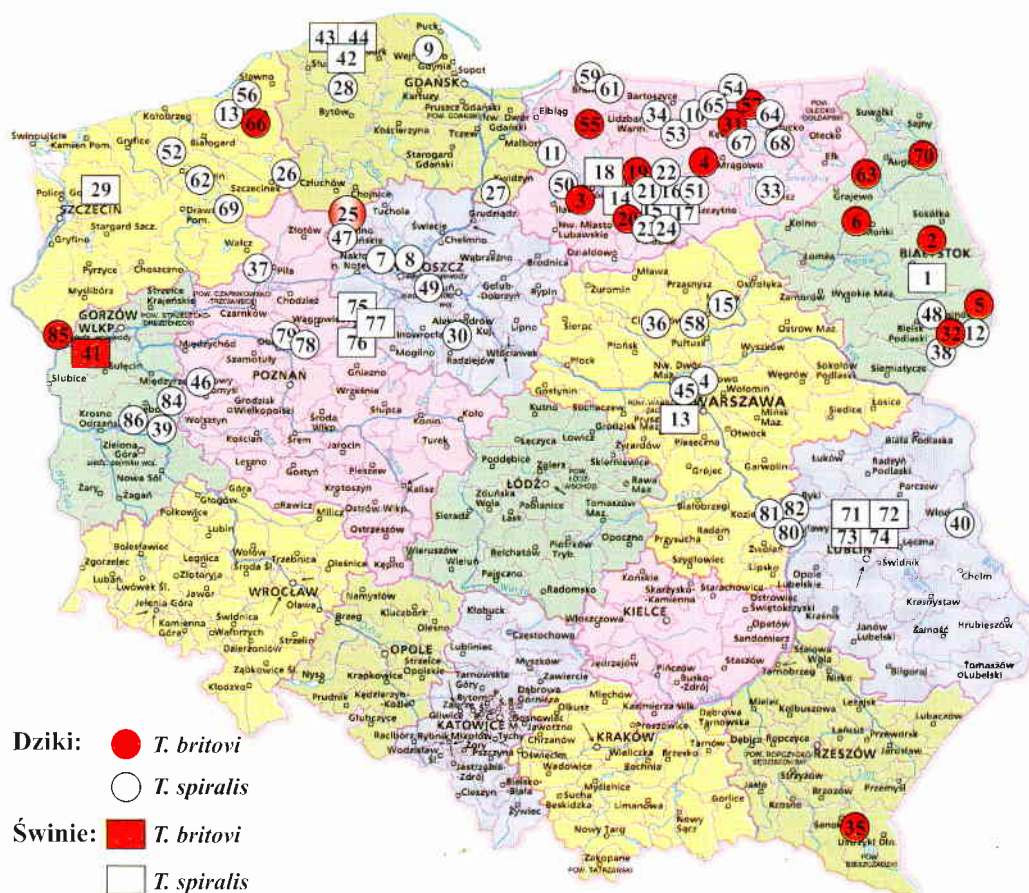
wego Centrum Ekologicznego, Oddział Karpaty w Ustrzykach Dolnych. Z sześciu przebadanych fragmentów tuszek wilków 3 okazały się zarażone włośniami i wszystkie oznaczone zostały jako *T. britovi*.

Dziki. W latach 1997-2001 w Polsce upolowano ponad 22 000 dzików. Liczbę zarażonych zwierząt oraz procent zarażenia włośniami w poszczególnych latach przedstawiono w tab. 1. Do badań molekularnych w ciągu ostatnich dwóch lat (2001-2002) udało się odzyskać larwy od 66 zwierząt (tab. 2, ryc. 1). Larwy od 42 osobników zidentyfikowano jako *T. spiralis*, 16 to *T. britovi*, u jednego osobnika stwierdzono mieszaną inwazję dwoma gatunkami włośni, a 6 izolatów nie udało się zidentyfikować ze względu na złą jakość pozyskanego DNA.

Świnie. Produkcja trzody chlewnej jest jedną z głównych gałęzi produkcji rolniczej w Polsce. Rokrocznie poddawane jest ubojowi kilkanaście milionów świń. Pełne dane zostały przedstawione w tab. 1. W 2001 r. wśród 13 018 893 świń poddanych ubojowi stwierdzono 33 osobniki zarażone włośniami (RRW-6, sprawozdanie z wyników urzędowego badania zwierząt rzeźnych i mięsa, drobiu, dziczyzny i królików za 2001 r.).

Do badań molekularnych dysponowano larwami odzyskanymi od 19 osobników (tab. 2, ryc. 1). Tylko larwy pozyskane od 1 osobnika zidentyfikowano jako *T. britovi*, pozostałe zidentyfikowano jako *T. spiralis*.

Gatunki referencyjne: ISS 569 i ISS 571. Dwoma gatunkami włośni, odzyska-



Ryc. 1. Rozmieszczenie dzików zarażonych *T. britovi* (czerwone kółka), *T. spiralis* (białe kółka) oraz świń domowych zarażonych *T. britovi* (czerwone kwadraty) i *T. spiralis* (białe kwadraty)

Tab. 2. *Trichinella spiralis* (genotyp T1) i *Trichinella britovi* (genotyp T3) u dzików (*Sus scrofa*) i świń domowych

Nr	Kod izolatu	Genotyp	Żywiciel i miejscowość	Nr	Kod izolatu	Genotyp	Żywiciel i miejscowość
1	ISS853	T1	Świnia, Białystok	44	ISS1063	T1	Świnia, Skórowo Nowe k. Słupska
2	ISS858	T3	Dzik, St. Rude, woj. podlaskie	45	ISS1050	T1	Dzik, Kampinoski Park Narodowy, Izabelin k. Warszawy
3	ISS858	T3	Dzik, Ostróda, woj. warmińsko-mazurskie	46	ISS1051	T1	Dzik, Lwówek, woj. wielkopolskie
4	ISS853	T3	Dzik, Popielno, woj. warmińsko-mazurskie	47	ISS1052	T1	Kiełbasa, Zspólno, masarnia GS Więcbork, woj. kujawsko-pomorskie
5	ISS854	T3	Dzik, Białowieża, woj. podlaskie	48	ISS1262	T1	Dzik, Browśk, woj. podlaskie
6	ISS856	T3	Dzik, Mońki, woj. podlaskie	49	ISS1263	T1	Dzik, ok. Bydgoszczy
7	nr	T1	Dzik, Bydgoszcz, woj. kujawsko-pomorskie	50		nd	Dzik, Miłomłyn k. Ostródy, woj. warmińsko-mazurskie
8	ISS897	T1	Dzik, Bydgoszcz	51		nd	Dzik, k. Olsztyna
9	ISS860	T1	Dzik, Wierchnino k. Gdyni, woj. pomorskie	52		nd	Dzik, Garbno, woj. zachodniopomorskie
10	ISS859	T1	Dzik, Bisztynek, woj. warmińsko-mazurskie	53	nr	T1	Dzik, Bisztynek, woj. warmińsko-mazurskie
11	ISS898	T1	Dzik, Małdyty, woj. warmińsko-mazurskie	54		nd	Dzik, Strzałowo, woj. warmińsko-mazurskie
12	ISS894	T1	Dzik, Białowieża, woj. podlaskie	55	ISS1240	T3	Dzik, Kurowo, woj. warmińsko-mazurskie
13	ISS571	T1	Świnia, Włochy k. Warszawy	56	ISS1241	T1	Dzik, Koszalin, woj. zachodniopomorskie
14	ISS852	T1	Świnia, Olsztyn, woj. warmińsko-mazurskie	57	ISS1242	T3	Dzik, Czerwony Dwór, woj. warmińsko-mazurskie
15	ISS850	T1	Świnia, Olsztyn	58	ISS1243	T1	Dzik, Pułtusk, woj. mazowieckie
16	ISS851	T1	Świnia, Olsztyn	59	ISS1244	T1	Dzik, Braniewo, woj. warmińsko-mazurskie
17	ISS849	T1	Świnia, Olsztyn	60		nd	Dzik, Piła, woj. wielkopolskie
18	ISS895	T1	Świnia, Olsztyn	61	ISS1264	T1	Dzik, Braniewo, woj. warmińsko-mazurskie
19	ISS892	T3	Dzik, Olsztyn	62	ISS1265	T1	Dzik, Świdwin, woj. zachodniopomorskie
20	ISS891	T3	Dzik, Olsztyn	63	ISS1246	T3	Dzik, Rajgród, woj. podlaskie
21	ISS899	T1	Dzik, Olsztyn	64	ISS1247	T1	Dzik, Czerwony Dwór, woj. warmińsko-mazurskie
22	ISS893	T1	Dzik, Olsztyn	65	ISS1248	T1	Dzik, Srokowo, woj. warmińsko-mazurskie
23	nr	T1	Dzik, Olsztyn	66	ISS1249	T3	Dzik, Biesiekierz k. Koszalina, woj. zachodniopomorskie
24	ISS1046	T1	Dzik, Olsztyn	67	ISS1250	T1	Dzik, Kętrzyn, woj. warmińsko-mazurskie
25	ISS978	T1+T3	Kiełbasa z dzika, Sępólno Krajeńskie woj. kujawsko-pomorskie	68	ISS1251	T1	Dzik, Giżycko, woj. warmińsko-mazurskie
26	ISS896	T1	Dzik, Kujan, woj. zachodniopomorskie	69	ISS1252	T1	Dzik, Drawsko, woj. zachodniopomorskie
27	ISS900	T1	Dzik, Dzierżążnio k. Kwidzyna, woj. pomorskie	70	ISS1253	T3	Dzik, Gruszki, woj. podlaskie
28	nr	T1	Dzik, Wiatrołom, woj. pomorskie	71	ISS1254	T1	Świnia, Natulin, woj. lubelskie
29	nr	T1	Świnia, Szczecin, woj. zachodniopomorskie	72	ISS1255	T1	Świnia, Natulin, woj. lubelskie
30	nr	T1	Dzik, Balczewo, woj. kujawsko-pomorskie	73	ISS1256	T1	Świnia, Natulin, woj. lubelskie
31	nr	T3	Dzik, Strzałowo, woj. warmińsko-mazurskie	74	ISS1257	T1	Świnia, Natulin, woj. lubelskie
32	nr	T3	Dzik, Hajnówka, woj. podlaskie	75	nr	T1	Świnia, Janowiec, woj. wielkopolskie
33	ISS1044	T1	Dzik, Wejsuny, woj. warmińsko-mazurskie	76	nr	T1	Świnia, Janowiec, woj. wielkopolskie
34	ISS1045	T1	Dzik, Sójka, Bisztynek, woj. warmińsko-mazurskie	77	nr	T1	Świnia, Janowiec, woj. wielkopolskie
35	ISS1236	T3	Dzik, Lesko, woj. podkarpackie	78	ISS1322	T1	Dzik, Murowana Goślina, woj. wielkopolskie
36	nr	T1	Dzik, Ciechanów, woj. mazowieckie	79	ISS1321	T1	Wyroby z dzika, Murowana Goślina
37	ISS1047	T1	Dzik, Osówka k. Piły, woj. wielkopolskie	80	ISS1267	T1	Dzik, Puławy, woj. lubelskie
38	ISS1048	T1	Dzik, Gródek, woj. podlaskie	81	ISS1268	T1	Dzik, Puławy
39	nr	T1	Dzik, Babimost k. Zbąszyna, woj. lubuskie	82	ISS1269	T1	Dzik, Puławy
40	ISS1049	T1	Dzik, Włodawa, woj. lubelskie	83		nd	Dzik, Puławy
41	ISS 1237	T3	Świnia, Sulęcín k. Rzepina, woj. lubuskie	84	ISS1323	T1	Dzik, Zbąszynek, woj. lubuskie
42	ISS1060	T1	Świnia, Skórowo Nowe k. Słupska, woj. pomorskie	85	ISS1270	T3	Dzik, Kostrzyń, woj. lubuskie
43	ISS1058	T1	Świnia, Skórowo Nowe k. Słupska	86	ISS1271	T1	Dzik, Raków k. Świebodzina, woj. lubuskie

Objaśnienia: *T. spiralis (ISS 571), gatunek referencyjny włośnia utrzymywany w pasażu na myszach; nd – izolat nie zidentyfikowany, nr – izolat nie zarejestrowany

Tab. 3. Porównanie RCI oraz indeksu płodności samic *T. spiralis* (ISS 571) i *T. britovi* (ISS 569)

Gatunek włośnia	Współczynnik reprodukcyjności (RCI)	Płodność samic po	
		3 godz. inkubacji	66 godz. inkubacji
<i>T. britovi</i>	19,6	0,99	0,98
<i>T. spiralis</i>	265,4	7,12	–

zarazić myszy i stanowią one nasze gatunki referencyjne. Rokrocznie ich „czystość” gatunkowa jest kontrolowana w ITRC. Wybrane właściwości biologiczne, takie jak RCI w teście *in vivo* oraz płodność samic w teście *in vitro* w pierwszym pasażu na myszach po wyizolowaniu, zostały przedstawione w tab. 3. Zarówno wskaźnik RCI, jak i wskaźnik płodności samic przedstawiony jako liczba larw NBL urodzonych przez 1 samicę w czasie 1 godziny inkubacji w medium hodowlanym w temp. 37°C, są zdecydowanie niższe dla gatunku *T. britovi* (ISS 569).

Uzyskane wyniki badań wskazują, że w Polsce, w środowisku naturalnym występują dwa gatunki włośni, tj. *T. spiralis* oraz *T. britovi*. Nicień *T. britovi* jest gatunkiem dominującym u takich drapieżników, jak wilki i lisy. Interesujący wydaje się fakt zbliżonej ekstensywności zarażenia lisów włośniami obserwowanej w prezentowanych badaniach (6,3%) w porównaniu z wynikami uzyskanymi 38 lat wcześniej (6). Istotne jest, że badania prowadzono na liczbowo podobnej populacji lisa. Nieco wyższą ekstensywność zarażenia włośniami (10,2%) wykazują pierwsze badania epizootologiczne (5), jednakże objęły one tylko jedno województwo i były prowadzone na znacznie mniejszej populacji lisów. Z danych literaturowych wiadomo, że w Polsce larwy włośnia znaleziono również w zwłokach rysia (*Felis lynx*) zabitego z urzędu (12), a całkiem niedawno u trzech jenotów (*Nyctereutes procyonoides*) oraz u kuny leśnej (*Martes martes*). Niestety, nie przeprowadzono badań identyfikujących gatunek włośnia odzyskanego od rysia. Wytrawione larwy z fragmentów tuszek kuny i trzech jenotów nie zostały zidentyfikowane ze względu na złą jakość DNA pasożyta. Degradacja spowodowana została najprawdopodobniej przez wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie tuszek upolowanych zwierząt lub niewłaściwe przechowywanie tkanek przed użyciem do badań molekularnych. Podobne wyniki uzyskano w ITRC w Rzymie. Prezentowane wyniki stanowią pierwszy udokumentowany i zarejestrowany przypadek włośnicy u tych gatunków zwierząt z terenu Polski. Do tej pory głównie dziki, świnie i lisy były wyszczególnione na liście w ITRC w Rzymie.

Z kolei u dzików gatunkiem dominującym jest *T. spiralis*. Interesujący jest fakt znalezienia osobników, zarówno lisów, jak i dzików, zarażonych dwoma gatunkami włośni. Może to świadczyć o dostępie tych zwierząt do resztek poubojowych, powstałych w wyniku działalności człowieka. Dwa gatunki włośni zawierała kielbasa z dzika upolowanego w 1999 r. w okolicach Sępólna Krajeńskiego. Wyrób ten stanowił źródło za-

razenia i był przyczyną hospitalizacji blisko 200 osób (ognisko epidemiczne). Opierając się tylko na tym jednostkowym przypadku, można przypuszczać, że ludzie w Polsce mogą być również zarażeni larwami *T. britovi*. Dane z dochodzeń epidemiologicznych w ogniskach włośnicy w całym kraju w 1999 r. podają liczbę 263 zachorowań (11), a w 2000 r. – 36 zachorowań (9). W 2002 r. doszło do zarażenia włośniami ponad 50 osób po zjedzeniu wędlin i innych przetworów mięsnych z dzika upolowanego w okolicach Murowanej Gośliny (okolice Poznania). Na początku 2003 r. ponad 50 osób – też w okolicach Poznania – trafiło do szpitala z podejrzeniem zarażenia włośniami. I w tym przypadku mięso z upolowanego dzika stanowiło źródło zarażenia ludzi. W obu przypadkach mięso było badane przez lekarza weterynarii na obecność larw włośni metodą kompresorową. Zgodnie z obowiązującymi zaleceniami Międzynarodowej Komisji Włośnicowej, tylko metoda wytrawiania daje gwarancję wykrycia inwazji o niskiej intensywności i będących we wczesnej fazie rozwoju tego nicienia (jeszcze przed otorbieniem larw w mięśniach). Powszechne stosowanie tej metody na dzień dzisiejszy jest jedyną skuteczną metodą eliminującą możliwość zarażenia się ludzi.

Podziękowania

Autorzy dziękują pracownikom ITRC, a w szczególności dr. Edoardo Pozio oraz Marco Amati za współpracę, identyfikację gatunkową przesłanych izolatów i ich rejestrację oraz dr. Romanowi Guli z Międzynarodowego Centrum Ekologii PAN, Oddział Karpaty w Ustrzykach Dolnych, za przesłanie fragmentów tkanek wilków (grant KBN Nr 6P04F 0017).

Piśmiennictwo

- Bandi C., La Rosa G., Bardin M. G., Damiani G., Comincini L., Tasciotti L., Pozio E.: Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology*, 1995, 110, 401-407.
- Borsuk P., Moskwa B., Pastusiak K., Cabaj W.: Molecular identification of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* by diagnostic multiprimer mtLrDNA amplification. *Parasitol. Res.* 2003 (w druku).
- Cabaj W., Przyjalkowski Z.: Biological characteristics of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections in mice. *Acta Parasitol. Pol.* 1987, 32, 195-204.
- Cabaj W., Pozio E., Moskwa B., Malczewski A.: *Trichinella britovi* and *T. spiralis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Poland. *Acta Parasitol.* 2000, 45, 340-344.
- Furmaga S., Wysocki E.: Helmintofauna lisów województwa lubelskiego. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D.* 1951, 6, 97-123.
- Kozar Z., Ramisz A., Kozar M.: Incidence of *Trichinella spiralis* in some domestic and wild living animals in Poland. *Wiad. Parazytol.* 1965, 11, 285-298.
- Mehlhorn H. (ed.): *Encyclopedic Reference of Parasitology, Biology, Structure, Function*, Springer Berlin, Heidelberg 2001, s. 667.
- Nowosad P., Pozio E.: First report of *Trichinella britovi* in wildlife from Poland. *Acta Parasitol.* 1998, 43, 236-237.
- Przybylska A.: Włośnica w 2000 roku. *Przegl. Epidemiol.* 2002, 56, 353-356.
- Ramisz A., Szymborski J., Balicka-Ramisz A.: Epidemiological studies on *Trichinellosis* among swine, wild boars and humans in Poland. *Parasite*, 2001, 8, S90-S91.
- Seroka D.: Włośnica w 1999 roku. *Przegl. Epidemiol.* 2001, 55, 155-158.
- Skrzynecki E.: Przypadek włośnicy u rysia (*Felis lynx*). *Życie Wet.* 2001, 74, 94-95.
- Whu Z., Nagano I., Pozio E., Takahashi Y.: Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology* 1999, 118, 211-218.
- Zarlenga D. S., Chute M. B., Martin A., Kapel C. M. O.: A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 1859-1867.