

192
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"BUSQUEDA DE ANTICUERPOS DE REACCION
CRUZADA EN PACIENTES CON DIFERENTES
ENFERMEDADES EN CONTRA DE EXTRACTO CRUDO
DE LA LARVA INFECTIVA DE Trichinella spiralis"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA



MEXICO, D. F.

OCTUBRE DE 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.....	1
1. Antecedentes.....	2
2. Biología	
2.1 clasificación taxonómica de <i>Trichinella spiralis</i>	4
2.2 morfología de <i>T. spiralis</i>	5
2.3 ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	6
3. La enfermedad	
3.1 signos y síntomas.....	10
3.2 diagnóstico de la triquinosis.....	12
4. Respuesta inmune.....	14
5. Justificación.....	17
6. Objetivo.....	17
7. Hipótesis.....	17
8. Metodología	
8.1 Sujetos de estudio.....	18
8.2 Mantenimiento de la cepa de <i>T. spiralis</i>	20
8.3 Preparación del extracto crudo (antígeno).....	21
8.4 Técnicas inmunoenzimáticas	
8.4.1 ELISA.....	24
8.4.2 IET.....	26
9. Resultados	
9.1 Obtención de larvas infectivas.....	33
9.2 ELISA.....	35
9.3 IET.....	37
10. Discusión.....	44
11. Conclusiones.....	49
12. Bibliografía consultada.....	50

RESUMEN

La triquinelosis es una zoonosis causada por la larva infectiva (L₁) del nemátodo *Trichinella spiralis*. El hospedero potencial se infecta cuando consume carne cruda o insuficientemente cocida contaminada con la larva infectiva. Todos los estados de desarrollo de este parásito ocurren en el mismo hospedero y su ciclo de vida involucra dos fases: la fase entérica y la fase parenteral. En ambas fases se presentan signos y síntomas muy variados por lo que el diagnóstico clínico puede ser confundido con otras enfermedades infecciosas o parasitarias.

Se han empleado varios métodos para el inmunodiagnóstico, desde los más generales hasta los más sensibles y específicos, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET). Sin embargo, pocos son los estudios en los que se ha valorado la presencia de reacciones cruzadas en el suero de pacientes con diferentes enfermedades en contra de un extracto crudo de la larva infectiva.

El objetivo de este trabajo fué buscar anticuerpos de reacción cruzada en el suero de pacientes con diferentes enfermedades (brucelosis, fiebre tifoidea, oncocercosis, amibiasis, cisticercosis, toxoplasmosis y tricocefalosis) y en el suero positivo a la prueba de reacción febril en contra de extracto crudo de la larva infectiva por ELISA y por IET.

Los resultados por ELISA sugieren que no hay anticuerpos de reacción cruzada en los sueros ensayados, a excepción del suero de un paciente con oncocercosis. Por IET, los sueros de los pacientes con triquinelosis reaccionaron de acuerdo a su perfil inmunológico característico. Los sueros de los pacientes con oncocercosis reaccionaron con bandas de alto peso molecular (70-100 Kd), pero no reconocieron el perfil inmunológico que caracteriza al suero de los pacientes con triquinelosis, el suero positivo al ELISA reconoció una banda de 77 kd, la cual es reconocida por los sueros de los pacientes con triquinelosis. No se observaron bandas cuando se ensayó con los sueros de los pacientes con las otras enfermedades y los sueros de las personas sanas.

Bajo las condiciones en las que se efectuaron estos ensayos se observó que el ELISA y la IET son técnicas altamente sensibles y específicas para el inmunodiagnóstico de la triquinelosis; por lo que, la combinación de ambas técnicas para el diagnóstico y para estudios epidemiológicos sería de gran utilidad al utilizar el ELISA como prueba de "tamizaje" y la IET como prueba confirmatoria.

1. ANTECEDENTES

La triquinosis es una enfermedad causada por la larva infectiva (L₁) del nemátodo *Trichinella spiralis*, la cual infecta el músculo esquelético de un gran número de especies de mamíferos; se han registrado más de 100 especies silvestres infectados en la naturaleza, incluyendo por los menos 58 de carnívoros, 28 de roedores, 7 de insectívoros y otros ordenes en los que se encuentra el de los primates. El hospedero potencial adquiere la triquinosis cuando ingiere carne infectada, cruda o mal cocida (Despommier, 1983; Martínez-Marañón, 1985; Zarlenga y Gamble, 1990).

La incidencia de esta enfermedad ha disminuido en los países desarrollados (de 500 casos registrados por año en 1950 a 30 casos por año en 1991, según el Servicio Público de Salud de Estados Unidos) (MMWR. 40 (4): 57-60. 1991), debido a la vigilancia que tienen sobre las fuentes de infección, la cual incluye la prohibición de alimentar con desperdicios a los cerdos, el uso de refrigeradores caseros y el consumo de la carne de cerdo bien cocida (MMWR. 40 (4): 57-60. 1991); sin embargo, prevalece en los países en vías de desarrollo, debido a los problemas socioeconómicos y de higiene que presentan (Kolata, 1985; Kim, 1983). En México, aunque no existen datos precisos acerca de su prevalencia y distribución, existen algunos estudios en donde se ha informado la aparición de brotes de triquinosis, lo que sugiere que la incidencia de esta enfermedad es alta (Sarti y cols., 1986; Martínez-Marañón, 1985).

La triquinosis en la República Mexicana, es una zoonosis de tipo epidémica y de origen alimentario (Quiroz y Landeros, 1988) que solo se diagnostica clínica y oportunamente en algunos lugares de la República (Zacatecas y sus poblaciones vecinas Jerez y Guadalupe) (Cabral y cols., 1989); pero, por lo general, esta parasitosis es mal diagnosticada en muchos casos y es confundida por la similitud de su cuadro clínico con enfermedades como fiebre tifoidea, cisticercosis, faringitis, nefritis, reumatismo, glomerulonefritis, amigdalitis, escarlatina, pielonefritis o brucelosis (Martínez-Marañón y cols., 1979; Martínez-Marañón, 1985; Fragoso, 1981; Cabral y cols., 1989).

2. BIOLOGIA

2.1 CLASIFICACION TAXONOMICA DE

Trichinella spiralis

La clasificación taxonómica de Trichinella spiralis se enlista a continuación
(adaptado de Lamothe y García, 1988; Olsen, 1974)

REINO	Animalia
SUBREINO	Metazoa
RAMA	Eumetazoa
GRADO	Bilateria
DIVISION	Protostomia
SUBDIVISION	Pseudocoelomata
SUPERPHYLUM	Aschelminthes
PHYLUM	Nematoda
CLASE	Adenophorea
ORDEN	Enoplida
SUBORDEN	Enoplina
SUPERFAMILIA	Trichuroidea
FAMILIA	Trichinellidae
	<u>Trichinella spiralis</u> Owen 1835.

2.2 MORFOLOGIA de Trichinella spiralis

Trichinella spiralis es un helminto cuya parte posterior del cuerpo es ligeramente más ancho que la parte anterior. El esófago consiste de una parte anterior pequeña y musculosa y una parte posterior más ancha y glandular, llamada esticosoma cuyas células poseen gránulos secretores altamente antigénicos que descargan en la luz del esófago (Silberstein y Despommier, 1985). El intestino tubular se abre en un ano casi terminal.

Los machos miden entre 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40 μm de diámetro. Las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud por 60 μm de diámetro, éstas pueden diferenciarse de los machos por presentar el extremo posterior romo y redondeado, mientras que los segundos presentan dos apéndices caudales lobulados y, como carácter distintivo del grupo, no presentan espículas copultrices (Olsen, 1974; Lamothe y García, 1988).

La hembra presenta la vulva cerca de la mitad del esticosoma y posee un solo ovario localizado en la parte posterior, el cual, produce óvulos de aproximadamente 25 μm de diámetro, cada óvulo presenta 3 cromosomas. El macho produce espermatozoides no flagelados y su número cromosómico puede ser 2 ó 3, por lo que es éste quien determina el sexo de la descendencia: las células somáticas de las hembras tienen número cromosómico de 6 y las de los machos de 5 (Despommier, 1983).

2.3 CICLO DE VIDA

Trichinella spiralis es considerado un parásito intracelular en el que todos sus estados de desarrollo ocurren en un solo hospedero (Despommier, 1977; Stewart y Giannini, 1982). El ciclo de vida de este parásito se caracteriza por presentar dos fases: una fase entérica, donde pasa por cuatro estadios larvarios y el adulto; y la fase parenteral, que incluye la larva recién nacida (LRN) y la larva muscular enquistada o larva infectiva (L₁).

FASE ENTERICA

El hombre, al igual que otros hospederos potenciales, adquieren la triquinosis al ingerir carne infectada cruda o insuficientemente cocida, con la larva infectiva; en el estómago, estas larvas son liberadas del músculo esquelético mediante la acción de los jugos gástricos.

Una vez que las larvas han sido liberadas, ocupan aproximadamente 10 minutos en emigrar e invadir el epitelio columnar y lámina propia del intestino delgado. A pesar de que *T. spiralis* es capaz de ocupar cualquier parte del intestino delgado, generalmente se sitúa en el duodeno (Dick y Silver, 1980).

Treinta horas después de la infección, la larva infectiva sufre cuatro mudas hasta convertirse en adulto; durante esta etapa de cambio, pasa por una morfogénesis extensa, remodelando la cutícula, células glandulares hipodérmicas, músculos, sistema nervioso, primordio genital, aparato digestivo y esticosoma.

El habitat del adulto consiste de una hilera de células epiteliales columnares del intestino, por lo que a esta etapa se le conoce como intramulticelular. En los primeros cinco días después de la infección la hembra adulta llega a invadir de 415 a 425 células y el macho de 140 a 152, no habiendo desintegración de las células del hospedero como resultado de la penetración del helminto (Despommier, 1983).

La cópula se efectúa presumiblemente dentro del nicho intramulticelular entre las 37 y 40 horas. Se ha observado en estudios *in vitro*, que las hembras producen una feromona que atrae a los machos para realizar la cópula y que la atracción heterosexual es mayor que la atracción homosexual (Belosevic y Dick, 1980).

Los machos ocupan una hilera de células adyacentes a las que ocupa la hembra; se cree que el macho puede inseminar a dos hembras, ya que el promedio de adultos encontrados en infecciones experimentales es de 2 hembras por cada macho (Olsen, 1974). Después de la inseminación, los machos mueren y son expelidos, mientras que las hembras aumentan de tamaño y penetran más profundamente en la mucosa intestinal, llegando incluso al peritoneo o penetrando en los ganglios linfáticos mesentéricos. La embriogénesis dura alrededor de 90 horas, ya que las larvas son liberadas hasta el quinto día postinfección.

FASE PARENTERAL

Las larvas recién nacidas (LRN) se introducen en la lámina propia y entran a la circulación arterial vía conducto torácico, pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir las células del músculo esquelético, donde se establecen definitivamente. En estas células, las larvas inician un periodo de desarrollo postembrionario creciendo exponencialmente; la máxima diferenciación se alcanza entre los días 4 y 20 después de la penetración, ya que la invasión de la célula muscular induce cambios que culminan en una nueva unidad hospedera llamada célula nodriza (desaparición de las estrias y desorganización de los filamentos contractiles de la célula muscular; incremento en el número de mitocondrias y aumento de la actividad catalítica; aumento en tamaño del núcleo y su reubicación en el centro de la célula) (Stewart y Gianinni, 1982), en donde las larvas comienzan a enrollarse. En este periodo se desarrolla el esticosoma y los sexos ya se pueden diferenciar.

La formación del quiste a partir de componentes del hospedero, se completa en un mes aproximadamente. Se cree que la formación del quiste protege a la larva de la respuesta inmune del hospedero (Bagheri y cols, 1986), además de que le podría conferir resistencia al congelamiento (Pozio y cols, 1989).

El ciclo se inicia nuevamente cuando la larva infectiva es transmitida a otro hospedero de la misma u otra especie (figura 1) (Despommier, 1983; MMWR. 40 (4): 57-60. 1991).

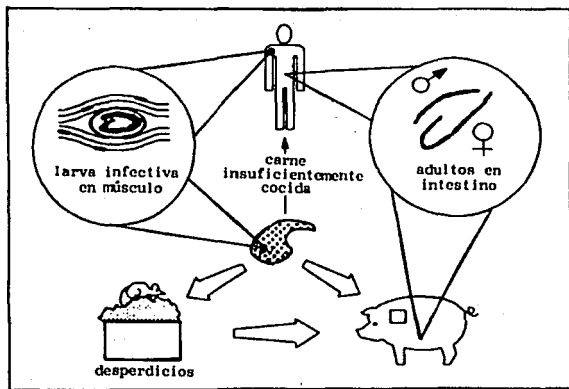


Figura 1.- Diagrama del ciclo de vida de *Trichinella spiralis* y su posible transmisión entre el hombre, el cerdo y la rata.
(Tomado de *MMWR*. 40 (4): 57-60. 1991.)

3. LA ENFERMEDAD

3.1 SIGNOS Y SINTOMAS

El cuadro clínico de la triquinelosis se presenta del primero al quinto día después de haber ingerido carne contaminada con la larva infectiva. Los principales signos y síntomas son dolor abdominal intenso, diarrea, cefalea, náuseas, vómito, astenia, fiebre, escalofrío, eosinofilia, malestar general y falta de apetito; algunos síntomas persisten durante los siguientes 10 a 15 días. Después de 20 a 30 días, el cuadro clínico se agrava y se presenta edema facial de predominancia palpebral, dolor muscular, astralgias, contracciones musculares, pérdida de peso, astenia, adinamia, sopor y coma en las infecciones severas (Biagi, 1985; Martínez-Marañón, 1979; Martínez-Marañón y cols, 1979; Fragoso, 1981).

Con base en la complejidad del cuadro clínico, la triquinelosis puede clasificarse según Martínez-Pantaleón y colaboradores (1986) en:

- a) asintomática o subclínica,
- b) oligosintomática,
- c) polisintomática

La triquinelosis polisintomática puede, a su vez, clasificarse en leve, moderada y severa de acuerdo a la intensidad de la infección. En el caso del ser humano, se consideran infecciones leves aquellas en las que existen de 1 a 50 larvas por gramo de músculo, moderadas de 50 a 100 y severas de 500 a más. (Olsen, 1974).

De manera general, el desarrollo de esta parasitosis en el hombre está consituido por tres periodos críticos (Olsen, 1974): incubación, migración y enquistamiento. La primera ocurre durante la fase intestinal y consiste en el desenquistamiento, la muda y la penetración más profunda de las hembras en la mucosa del duodeno y del yeyuno. En este periodo se presenta falta de apetito, pérdida de peso, mal absorción y mala digestión, inflamación del intestino, náuseas, vómito, diarrea, dolor intestinal y sudoraciones (Kilgore y cols, 1988).

El segundo periodo incluye el nacimiento de las larvas, su migración y la penetración de éstas en los tejidos musculares. Durante este periodo se asocia dolor muscular durante la respiración, la conversación, el movimiento ocular o durante la masticación; edema en los ojos e inflamación de los gánglios linfáticos y muchas veces se presenta fiebre intermitente.

El tercer período comprende el de enquistamiento con sus efectos físicos y tóxicos como deshidratación. En las infecciones graves, la presión sanguínea puede abatirse y pueden existir desórdenes nerviosos (encefalitis, parálisis e incluso coma) debidos probablemente al daño provocado en el sistema nervioso, ya que las larvas recién nacidas pueden dañar células nerviosas o nervios durante su migración.

3.2 DIAGNOSTICO DE LA TRIQUINELOSIS

El diagnóstico clínico de la triquinelosis humana es difícil porque puede presentarse como una infección individual o de grupo, porque puede tener varios grados de severidad y porque puede estar acompañada de un gran número de complicaciones que puede enmascarar la enfermedad (Alcántara y cols, 1992; Cabral y cols, 1989; Fragoso, 1981; Martínez-Marañón y cols, 1979); además, las pruebas de laboratorio como la biometría hemática (mayor a 500 eosinófilos/mm³), las enzimáticas (presencia de 1,6-difosfofructoaldosa y deshidrogenasa láctica), así como las serológicas (hemaglutinación, ensayos enzimáticos e inmunofluorescencia indirecta) son positivas hasta 15 días después de haberse iniciado la infección, ya que durante los primeros 15 días de infección el parásito cursa por la fase enteral de su ciclo de vida (Cabral y cols, 1989; Pawlowski, 1983). Algunos de los aspectos que orientan al diagnóstico de la triquinelosis, son los antecedentes epidemiológicos de la región (existencia de otros casos o brotes anteriores); el consumo de carne o productos de cerdo, crudos o insuficientemente cocidos; el cuadro clínico; la detección de parásitos o inflamación del músculo en biopsia y el análisis de laboratorio (Cabral y cols., 1989). En los lugares donde el diagnóstico de la triquinelosis se basa exclusivamente en el cuadro clínico puede ser confundida con otras enfermedades infecciosas o parasitarias.

Aunque la demostración de las larvas de T. spiralis en el músculo esquelético es el diagnóstico definitivo de la infección, no siempre es posible obtener muestras de biopsia, debido a lo traumático del procedimiento y al riesgo de infecciones posteriores en ó a través de la herida (Cabral y cols., 1989; Kolata, 1985; Mazzotti y Pastrana, 1943; Zimmermann, 1983).

El inmunodiagnóstico ha sido de gran valor para identificar la enfermedad durante la etapa aguda, para confirmar la infección y como herramienta para los estudios epidemiológicos. Por ello se han empleado varios métodos inmunológicos sensibles y específicos para determinar la presencia de anticuerpos anti-T. spiralis en suero (pruebas intradérmicas, floculación de bentonita, fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta, contraelectroforesis, ensayos inmunoenzimáticos) (revisado en Alcántara y cols, 1992).

Si embargo, el uso de extractos crudos puede revelar muestras falso positivos debido a la presencia de anticuerpos de reacción cruzada (Barriga, 1977; Gamble, 1984), tal como lo indican los estudios que realizaron Weiner y Price (1956), en los que un suero de conejo anti-T. spiralis reaccionó a títulos de 1:100 y de 1:1000 con los antígenos O y H de Salmonella thypi, y, por el contrario, el suero antitifoideo de un conejo fué capaz de reaccionar con el antígeno crudo de T. spiralis a títulos de 1:800. Estos mismos autores sugieren que el suero anti-T. spiralis puede además aglutinar S. parathypi A, B y C y Klebsiella pneumoniae. Clinard (1978) no observó estas reacciones cuando empleó suero de cerdo anti-T. spiralis y los antígenos somáticos de E. coli o S. thypi.

4. RESPUESTA INMUNE

Debido a la diversidad y a la estadi-especificidad de los antígenos que presenta, así como por su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a varios mecanismos de inmunidad (Ortega-Pierres y cols, 1989; Parkhouse y Ortega-Pierres, 1984; Philipp y cols, 1980; Silberstein, 1983), T. spiralis constituye un estímulo antigénico complejo para el hospedero, quien monta una respuesta inmunológica específica (Wakelin y Denham, 1983). Por ello, la respuesta inmune celular y humoral hacia T. spiralis ha sido estudiada en diferentes modelos experimentales (principalmente ratas y ratones).

El estudio de la respuesta inmune celular se ha enfocado principalmente hacia la forma en que actúa sobre los estados entéricos de la infección. Se ha observado que los linfocitos T cooperadores, al producir interleucinas (IL) 2, 3 y 4 e interferon gama, regulan la reacción de inflamación intestinal provocando la infiltración y el aumento del número de células cebadas y eosinófilos en el intestino delgado, así como elevación de la concentración de histamina, leucotrienos y enzimas asociadas a la reacción de inflamación, las cuales dañan la mucosa al actuar directamente sobre ella. Esta respuesta da como resultado la expulsión acelerada de los helmintos preadultos y de los adultos, la prevención del crecimiento de los estados enterales, la disminución de fecundidad de la hembra y el bloqueo de la larva recién nacida para sobrevivir (Despommier y cols, 1977; Wakelin y Wilson, 1980).

La respuesta inmune humoral ha sido ampliamente estudiada en diferentes especies. En el suero de pacientes con triquinosis ha puesto de manifiesto anticuerpos de las clases IgG, IgA, IgM e IgE, siendo la IgG la principal clase de inmunoglobulina que permanece durante toda la infección (Ljungstrom y cols, 1988). Mediante inmunoelectrotransferencia se ha observado que los pacientes con triquinosis presentan un perfil inmunológico altamente homogéneo, en el que reconocen principalmente ocho antígenos de alto peso molecular (figura 2) (Alcántara y Correa, enviado a publicación) los cuales parecen corresponder a antígenos de superficie-estícosoma detectados por anticuerpos policlonales o monoclonales de cerdos, ratas y ratones (revisado en Alcántara y cols, 1992; Arriaga y cols, 1989; Ortega-Pierres y cols, 1989).

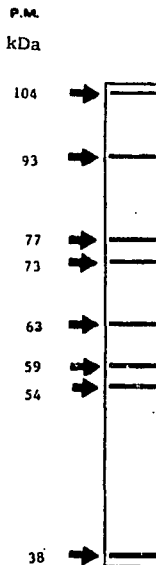


Figura 2.- Esquema del perfil antigénico de extracto crudo de la larva infectiva (L_1) reconocido por los anticuerpos del suero de pacientes con triquinosis. (Tomado de Alcántara y cols, 1992.)

5. JUSTIFICACION

A pesar de que existen varios métodos inmunológicos para la detección de anticuerpos anti-T. spiralis, no se han valorado las reacciones cruzadas ni por el ensayo inmunoenzimático (ELISA), ni por la técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) en pacientes con diferentes enfermedades en contra de un extracto crudo de la larva infectiva

6. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fué analizar la presencia de anticuerpos de reacción cruzada en el suero de pacientes con diferentes enfermedades en contra del extracto crudo de la larva infectiva (L₁) de Trichinella spiralis mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y por la inmunoelectrotransferencia (IET).

7. HIPOTESIS

La triquinelosis es una enfermedad causada por la larva infectiva (L₁) de Trichinella spiralis, que por lo general es confundida con otras enfermedades infecciosas y parasitarias.

Si los sueros de pacientes con diferentes enfermedades tienen anticuerpos que reaccionan cruzadamente con T. spiralis, entonces reaccionarán con un extracto antigénico de la larva infectiva.

8. METODOLOGIA

8.1 SUJETOS DE ESTUDIO

Los sueros de los sujetos de estudio se clasificaron en tres grupos: a) 57 de individuos aparentemente sanos, b) 25 de individuos con triquinosis y c) 94 de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas o parasitarias. Dentro de este grupo se capturaron 31 muestras de pacientes con brucelosis, 17 con oncocercosis, nueve con cisticercosis, 12 con fiebre tifoidea, ocho con amibiasis, 13 con toxoplasmosis, una con tricocefalosis. Además, se obtuvieron 14 muestras positivas a la prueba de reacción febril.

Las muestras de suero del primer grupo se obtuvieron de voluntarios instruidos en el objetivo de este proyecto. Los pacientes del segundo y tercer grupo fueron diagnosticados por examen clínico y/o por pruebas de laboratorio. Los sueros fueron obtenidos por donación de los centros donde se atendieron a los pacientes. Personal calificado tomó la muestra sanguínea y separó el suero. A cada muestra se le asignó un número de identificación. Finalmente se almacenaron a -20°C para ser utilizadas posteriormente en el estudio (TABLA 1).

TABLA 1.- PROCEDENCIA DE CADA GRUPO DE SUEROS

SUERO	NUMERO DE MUESTRAS	PROCEDENCIA
SANOS	17	INDRE-SSa
SANOS	40	Centro de Salud "Dr. M. González R." DGSPDF-DDF
TRIQUINELOSIS	25	INDRE-SSa
BRUCELOSIS	13	INDRE-SSa
BRUCELOSIS	18	Hospital de Infectología CMR-IMSS
CISTICERCOSIS	9	INDRE-SSa
ONCOCERCOSIS	17	Provenientes de Africa y de Guatemala, donados por los Dres. Allan y Lujan
FIEBRE TIFOIDEA	12	Hospital de Infectología CMR-IMSS
TOXOPLASMOSIS	16	INST. NAC. PEDIATRIA-SSa
AMIBIASIS	8	INST. NAC. PEDIATRIA-SSa
TRICOCEFALOSIS	1	INST. NAC. PEDIATRIA-SSa
REACCION FEBRIL	16	Hospital Juárez-SSa

8.2 MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE Trichinella spiralis

La cepa de Trichinella spiralis se mantuvo en ratas macho Wistar de 3 meses de edad y 250-300 gramos de peso, donados por el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina-IPN. Los animales se mantuvieron en el laboratorio en jaulas de plástico con aserrín, se alimentaron con agua y alimento condensado estériles.

La cepa de T. spiralis que se usó para la primera infección de las ratas provenía de la cepa de ratón NIH, también mantenida en laboratorio.

Para conocer el número óptimo de larvas infectivas (L_1) recuperadas de cada infección, se hicieron infecciones con 400, 5,000, 10,000 y 15,000 L_1 .

Las ratas se mantuvieron de 5 a 6 semanas después de la infección. Una vez que se cumplió el periodo, se adormecieron con cloroformo y se sacrificaron de manera humanitaria; mediante la técnica de necropsia, a cada animal le fué retirada la piel, la cabeza y las vísceras, los cuales se incineraron. El músculo esquelético y huesos se pesaron y se procesaron para la obtención de larvas infectivas (L_1).

8.3 PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO (ANTIGENO)

El antígeno de Trichinella spiralis se preparó como lo describe Parkhouse y colaboradores, (1981). Las larvas se aislaron a partir del músculo esquelético por el método de digestión en pepsina-ácido clorhídrico 1% (Thornbury, 1897): Cada 20 g de carne se digirieron con 2 g de pepsina, 2 ml de ácido clorhídrico concentrado y 200 ml de agua destilada a 37°C durante 4 horas en agitación continua.

La mezcla de digestión se virtió a través de un tamiz de gasa colocada en la boca de una o varias copas de precipitación, la gasa se utilizó para detener los restos de carne de rata no digerida. Se esperó una hora aproximadamente para descartar el sobrenadante y coleccionar las larvas sedimentadas.

Se hicieron lavados repetidos con una solución amortiguadora salina de fosfatos 0.01 M pH 7.2 (PBS). Se centrifugó a 1,613 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante.

Finalmente, las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 80 %), para purificarlas de los restos de tejido del hospedero. Las larvas se obtuvieron en la interfase de 20-40%. Se repitieron los lavados con PBS para eliminar el exceso de dextrosa (figura 3). Las larvas se resuspendieron en un volumen aproximado de 10 ml de PBS y se tomaron porciones de 10 µl para contarlas, se extrapoló para conocer el número total de larvas.

Una proporción de ellas se utilizó para hacer nuevas infecciones, y la otra proporción se resuspendió en 4.0 ml de TRIS (hidroximetil) aminometano (Tris-base) 10 mM pH 8, que contenía 200 μ g de L-1-tosilamida 2-feniletíl clorometil cetona (TPCK) y 200 μ g de N-alfa-p-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK) y 40 μ l de Fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF) 100 mM.

Las larvas se homogenizaron con un triturador de tejidos manual en hielo por 15 minutos, se agregaron 960 μ l de desoxicolato de sodio 10% (p/v) en Tris base 10 mM pH 8 y se homogenizó durante 15 minutos. Se dejó reposar en frío durante 20 minutos y finalmente se centrifugó a 15,000 x g a 4°C durante 30 minutos. Se tomó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bio-Rad o por el de Lowry.

El antígeno se almacenó en porciones de 50 μ l y se congeló primero a -20°C y luego a -70°C hasta su uso.

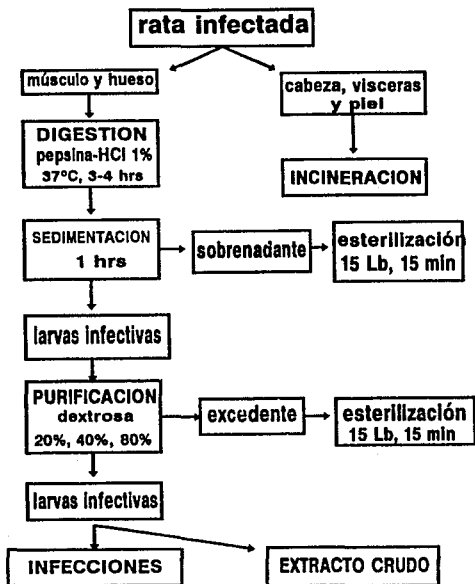


Figura 3.- Diagrama de la obtención de las larvas infectiva de *Trichinella spiralis* a partir de carne de rata infectada experimentalmente.

8.4 TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

8.4.1 ENSAYO INMUNO-ENZIMATICO (ELISA)

Esta técnica se realizó de acuerdo a la estandarizada por Alcántara y cols (1989). El antígeno se diluyó en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, siendo la concentración óptima de 5 $\mu\text{g/ml}$: Las placas de ELISA (Costar), se sensibilizaron con 100 μl por pozo de la solución de antígeno durante toda una noche a 4°C.

Se bloquearon los sitios libres con una solución de albúmina sérica humana (Gerencia General de Biológicos y Reactivos) diluida al 1% en PBS Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween) a 37°C durante 2 horas.

Se colocaron 100 μl /pozo de cada suero problema así como testigos negativos y positivos por duplicado a una dilución 1:1000 en PBS-Tween y se incubaron durante toda una noche a 4°C o a 37°C durante 2 horas.

Se colocaron 100 μl /pozo del conjugado de chivo anti-gamaglobulinas de humano acoplados a peroxidasa (KPL) y se incubó a 37°C durante 2 horas. A diferencia de la técnica de Alcántara y cols (1989) la dilución del conjugado que se usó fué de 1:3000 en PBS-Tween.

Entre cada incubación los pozos se se lavaron 4 veces durante 4 minutos en cada ocasión, con 200 μl /pozo de PBS-Tween.

Finalmente se agregaron 100 μ l/pozo de una solución de sustrato que contenía 100 μ l de H_2O_2 (Merck) al 1.2%, 5 mg de orto-fenilendiamina (Sigma), 500 μ l de una solución amortiguadora de citratos 0.1 M pH 5 y 10 ml de agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 100 μ l/pozo de H_2SO_4 2N cuando los testigos negativos viraron (suero de las personas sanas). Los valores de absorbancia se leyeron a 490 nm utilizando un lector para placas de ELISA de 96 pozos (Behring).

Para diferenciar entre muestras negativas y positivas se obtuvo un valor de corte el cual es la suma del promedio de la absorbancia de los sueros de las personas sanas y tres desviaciones estándar. Todas las muestras con valores mayores al valor de corte se consideraron positivas.

8.4.2 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

El extracto crudo se sometió a electroforesis en geles preparativos de poliacridamida-dodecil sulfato de sodio (SDS) al 11% en condiciones reductoras (Laemli, 1970). El sistema discontinuo que se utilizó consistía de dos geles. El primer gel por el que pasaba la muestra (gel superior) concentraba la muestra, y el segundo gel (gel inferior) separaba las proteínas.

En un matraz Erlen-Meyer se mezclaron las siguientes soluciones para preparar el gel separador:

GEL SEPARADOR	
SOLUCION	VOLUMEN (ml)
ACRILAMIDA 30%-N,N'-METILENO-BIS-ACRILAMIDA (BIS 0.8%)	11.00
AMORTIGUADOR DE TRIS - BASE 2M pH 8.8	6.00
SDS AL 10%	0.30
AGUA DESTILADA	11.75
*PERSULFATO DE AMONIO (10 mg/ml)	0.50
*N,N,N'-TRETAMETILENDIAMINA (TEMED)	0.030

* reactivos que se agregaron rápidamente a la mezcla al final.

Se vertieron aproximadamente 30 ml de esta mezcla entre dos cristales de 16 x 20 x 0.3 cm, usando separadores de 1.5 mm de espesor evitando la formación de burbujas. Después de la polimerización del gel, se eliminó el exceso de agua con papel filtro y se colocó un peine de plástico de 2 carriles, uno para el marcador de pesos moleculares y el otro para el extracto crudo.

El gel concentrador se preparó mezclando en un matraz Erlen-Meyer las siguientes soluciones:

GEL SEPARADOR	
SOLUCION	VOLUMEN (ml)
ACRILAMIDA 30% - BIS 0.8%	3.50
Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (TRIS - HCl) 2M pH 6.8	0.65
SDS AL 10%	0.10
AGUA DESTILADA	11.50
*PERSULFATO DE AMONIO (10 mg/ml)	0.20
*TEMED	0.010

* reactivos que se agregaron rápidamente a la mezcla al final.

La mezcla se vertió sobre el gel separador, procurando evitar la formación de burbujas. Después de la polimerización se quitó el peine y se eliminó el exceso de agua, dejando secos los carriles para colocar las muestras.

Se empleó 1 mg de extracto crudo, diluido en un volumen igual de la solución digestora (SDS 10%, ácido etilendinitrilotetraacético =EDTA=, glicerol, Tris-HCl 2M pH 6.8, azul de bromofenol y agua destilada) el cual contenía 10 μ l de β -mercapto-etanol por cada mililitro de la solución digestora), esta mezcla se dejó hervir por 5 minutos.

Se usaron marcadores de bajo peso molecular preteñidos (Bio-Rad).

La electroforesis se efectuó en una cámara para electroforesis Protean II (Bio-Rad), en presencia de una solución amortiguadora (PAGE: Tris-Base, glicina, SDS, agua destilada) y aplicando una corriente de 10 mAmp y 190 volts durante toda una noche a temperatura ambiente con un sistema de enfriamiento (figura 4).

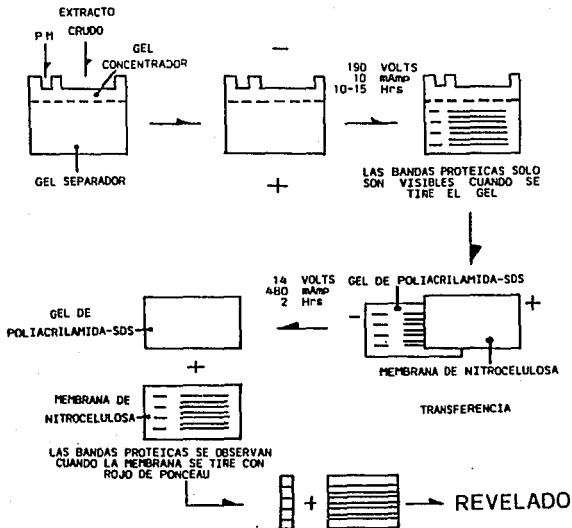


Figura 4.- Diagrama de la separación de proteínas de extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* por electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS al 11% y su transferencia a membrana de nitrocelulosa

TRANSFERENCIA

Después de la electroforesis, el gel se colocó en un recipiente con la solución amortiguadora de transferencia (Tris, glicina, metanol, agua destilada) durante 30 minutos. En el mismo recipiente se colocó la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) de 16.5 x 12 cm y aditamentos de la cámara de transferencia (figura 5).

La transferencia se llevó al cabo según el método estandar (Towbin y cols., 1979) durante dos horas a temperatura ambiente en una cámara de transferencia (Idea Scientific) con una corriente de 480 mAmp y 14 volts.

Después de la transferencia, se cortó la tira con los marcadores de peso molecular y la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 0.3% (TCA) (Merck) para observar si la transferencia de las bandas proteicas del extracto crudo fué adecuada. Después, la membrana se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó con leche descremada (Sveltes, Nestle®) al 5% en PBS-Tween toda una noche a 4°C.

La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween y 2 veces con PBS 10 minutos en cada ocasión.

Se cortaron tiras de 0.5 cm de ancho y cada tira se incubó en una cámara para microincubaciones (Bio Rad) con cada uno de los sueros, diluidos 1:50 en PBS-Tween durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua o toda la noche a 4°C. Se repitieron los lavados como se describió anteriormente.

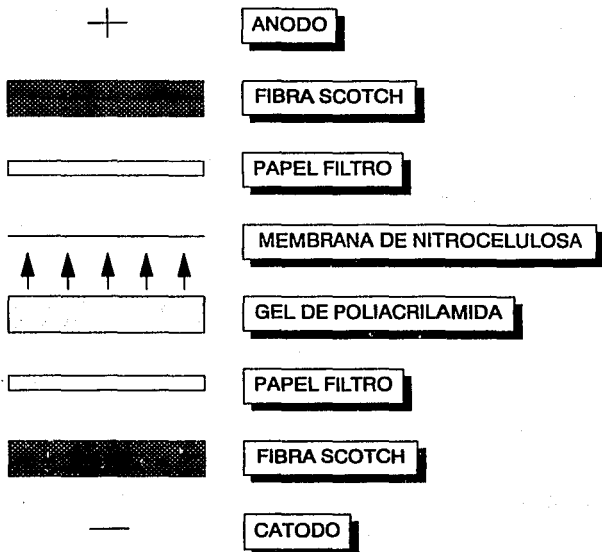


Figura 5.- Diagrama del método para transferir proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa.
 La flechas indica el sentido en que se efectuó la transferencia.
 (Adaptado de Pedraza, 1988.)

Se hizo una modificación al método estandar para fijar los anticuerpos a las bandas antigénicas con glutaraldehído al 0.25% en PBS frío por 15 minutos; las tiras se lavaron una vez más con PBS y se bloqueó con albúmina sérica bovina a 0.1% en PBS pH 8.5, durante 20 minutos (Ikegaki y Kennett, 1989).

Se hicieron 2 lavados con PBS durante 5 minutos, las tiras se incubaron con un conjugado de suero de chivo anti-gamaglobulinas totales de humano acoplados a peroxidasa (KPL) 1:2000 en PBS-Tween, en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

La reacción se reveló empleando como sustrato 50 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) diluidos en 10 ml de metanol, 50 ml de PBS y 50µl de H₂O₂ al 3%.

Una vez que aparecieron bandas, se retiró el sustrato y se paró la reacción con agua destilada.

Las tiras se pusieron a secar en papel filtro o estrasa.

Si las tiras presentaban el perfil inmunológico que caracteriza la respuesta humoral hacia *T. spiralis*, la muestra se consideraba positiva.

9. RESULTADOS

9.1 MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE Trichinella spiralis

Se hicieron varias infecciones con larvas infectivas en rata macho Wistar. La primera infección se realizó con 400 L₁, las cuales provenían de la cepa de ratón NIH; de esta primera infección se obtuvieron 99 L₁ por gramo de carne. La figura 6 muestra que el número de larvas infectivas recuperadas de cada infección aumentaba, no importando si el número de larvas inoculadas era el mismo que la inoculación anterior; así, para la segunda infección con 10,000 larvas/animal ya se había obtenido 27.55 veces más larvas que en la infección de 400 L₁.

En un intento por aumentar el número de larvas recuperadas se hizo la infección con 15,000 L₁; sin embargo esta inoculación no fué exitosa, ya que las ratas murieron a los 24 días post-infección. El examen microscópico del diafragma reveló gran cantidad de "pequeñas" larvas, en las cuales no se apreciaba que se hubiesen enquistado. El conteo de las "pre"-larvas infectivas reveló que había 17,857 larvas por gramo de carne. Por lo que suponemos que esta rata pereció al no poder soportar la carga parasitaria.

La tercera infección de 10,000 L₁, tampoco fué exitosa, ya que las dos ratas infectadas perecieron a los 18 días postinfección. El examen microscópico del diafragma no reveló larvas de T. spiralis; por lo cual suponemos que las ratas perecieron al no tolerar la carga parasitaria que en ese momento debería estar circulando por el torrente sanguíneo.

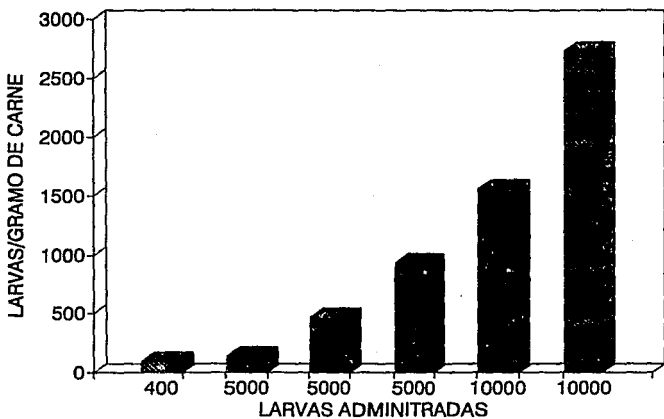


Figura 6.- Número de larvas infectivas (L_1) recuperadas por gramo de carne de rata Wistar por el método de pepsina-HCl 1%.

9.2 ENSAYO INMUNOENZIMATICO (ELISA)

Se probaron 57 sueros de personas sanas, 25 de pacientes con triquinosis, 31 con brucelosis, 17 con oncocercosis, nueve con cisticercosis, 12 con fiebre tifoidea, ocho con amibiasis, una con tricocefalosis, 13 con toxoplasmosis y 14 positivos a la prueba de reacción febril.

Para poder decidir si una muestra era positiva o negativa para esta prueba, se tomó como valor de corte, el promedio de la absorbancia del grupo de sueros de personas sanas (0.135) y se le sumó el producto de tres desviaciones estándar ($3 * 0.090$); este valor fué de 0.405.

El análisis de las muestras de suero (figura 7) no reveló anticuerpos de reacción cruzada, a excepción del suero de un paciente con oncocercosis (absorbancia= 0.485). El promedio de los sueros de los pacientes con triquinosis fué de 0.810 ± 0.270 , mientras que el de los otros grupos fué menor al de valor de corte.

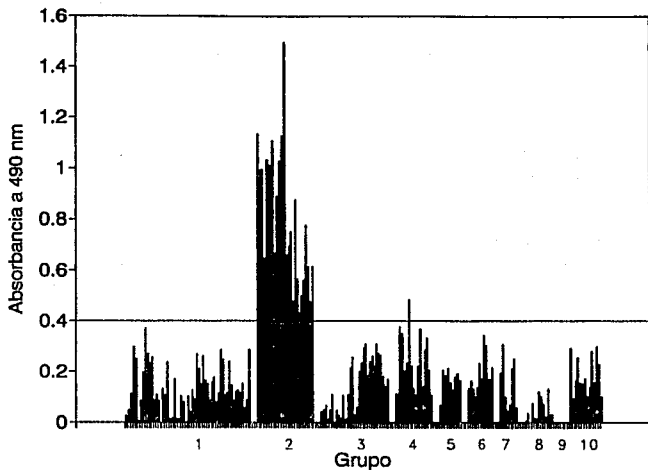


Figura 7.- Absorbancia de los sueros de pacientes con diferentes enfermedades probados por ELISA contra un extracto crudo de la larva infectiva (L_1) de *Trichinella spiralis*.
La línea continua representa el valor de corte.

- 1= personas sanas
- 2= pacientes con triquinelosis
- 3= pacientes con brucelosis
- 4= pacientes con oncocercosis
- 5= pacientes con cisticercosis
- 6= pacientes con fiebre tifoidea
- 7= pacientes con amibiasis
- 8= pacientes con toxoplasmosis
- 9= pacientes con tricocefalosis
- 10= pacientes positivos a la prueba de reacción febril

9.3 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IBT)

De los sueros probados por ELISA se tomaron 36 sueros de personas sanas, 20 con triquinelosis, 22 con brucelosis, 17 con oncocercosis, cinco con cisticercosis, siete con fiebre tifoidea, ocho con amibiasis, 16 con toxoplasmosis, uno con tricocefalosis y 16 sueros positivos a la prueba con reacción febril (en las fotografías solo se muestran 18 tiras reveladas con suero de personas sanas y 14 reveladas con sueros de pacientes con triquinelosis).

Los sueros de los pacientes con triquinelosis reaccionaron principalmente con las ocho bandas de su perfil inmunológico (figuras 8 a la 13). Los sueros de los pacientes con oncocercosis reaccionaron heterogéneamente con bandas de alto peso molecular (70 a 100 Kd), pero no se observó el patrón que caracteriza la respuesta inmune humoral de los pacientes con triquinelosis. De manera particular, el suero del paciente con oncocercosis que dió lectura positiva a la prueba de ELISA fué el único que reconoció una banda de 77 Kd la cual es reconocida por los sueros de los pacientes con triquinelosis (figura 9).

Cuando se emplearon los sueros de los pacientes con las otras enfermedades o el suero de las personas sanas no se observaron bandas, y cuando las hubo eran de baja intensidad.

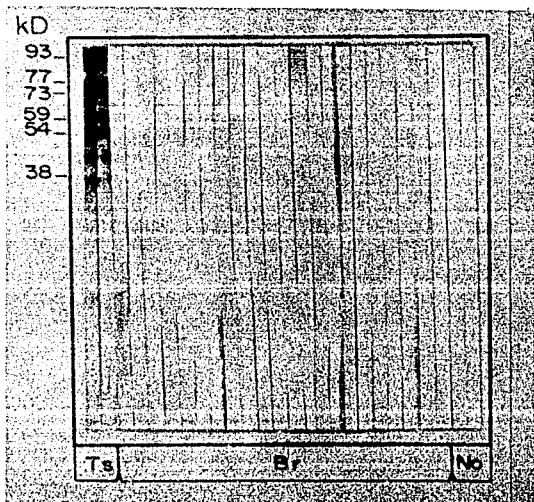


Figura 8.- Inmunoelctrotransferencia de los sueros de los pacientes con brucelosis en contra de extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*.

No= personas sanas

Ts= pacientes con triquinelosis

Br= pacientes con brucelosis

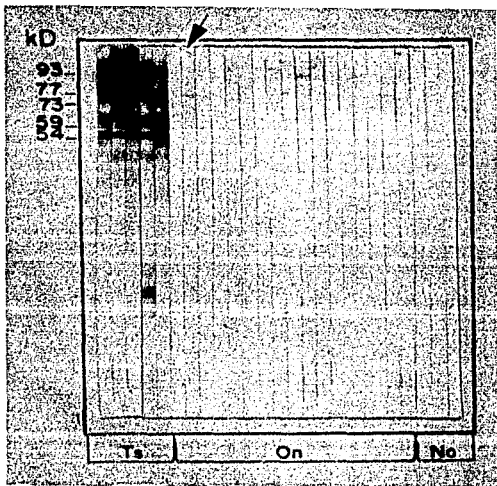


Figura 9.- Inmunolectrotransferencia de los sueros de los pacientes con oncocercosis en contra de extracto crudos de la larva infectiva de Trichinella spiralis.

La flecha indica el suero que fué considerado como positivo para el ELISA y que reconoció una banda de 77 kD que también es reconocida por el suero de los pacientes con triquinelosis.

No= personas sanas

Ts= pacientes con triquinelosis

On= pacientes con oncocercosis

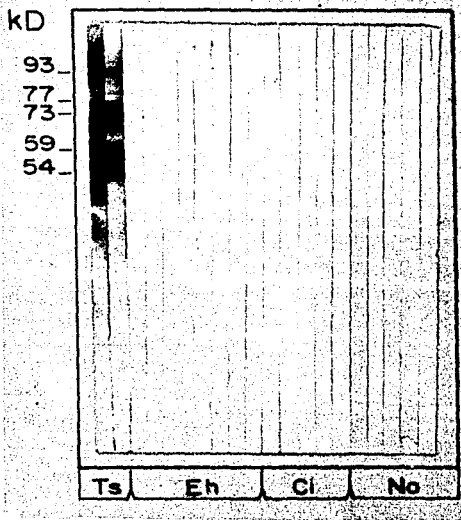


Figura 10.- Inmunoelctrotransferencia de los sueros de los pacientes con diferentes enfermedades en contra de extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*.

No= personas sanas
 Ts= pacientes con triquinelosis
 Eh= pacientes con amibiasis
 Ci= pacientes con cisticercosis

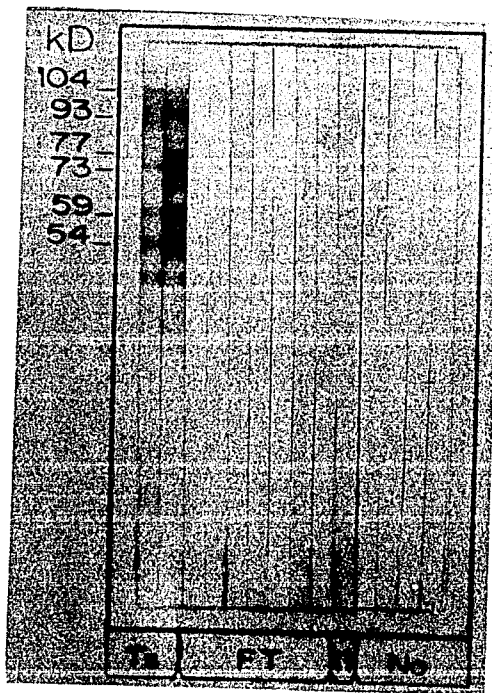


Figura 11.- Inmunoelctrotransferencia de los sueros de los pacientes con diferentes enfermedades en contra de extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*.

No= personas sanas

Ts= pacientes con triquinelosis

FT= pacientes con fiebre tifoidea

T1= pacientes con tricocéfalois

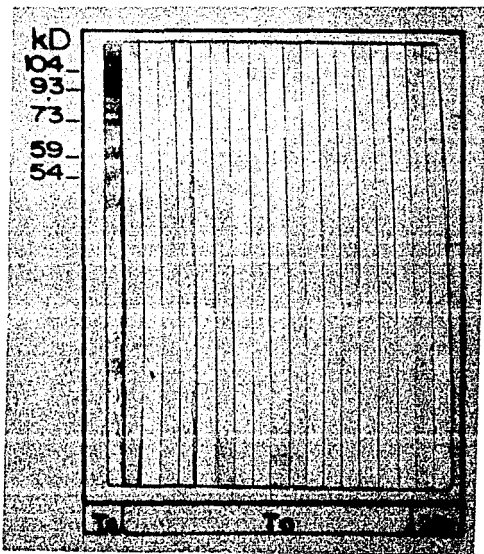


Figura 12.- Inmunoelectrotransferencia de los sueros de los pacientes con toxoplasmosis en contra de extracto crudo de la larva infectiva de Trichinella spiralis.

No= personas sanas

Ts= pacientes con triquinelosis

To= pacientes con toxoplasmosis

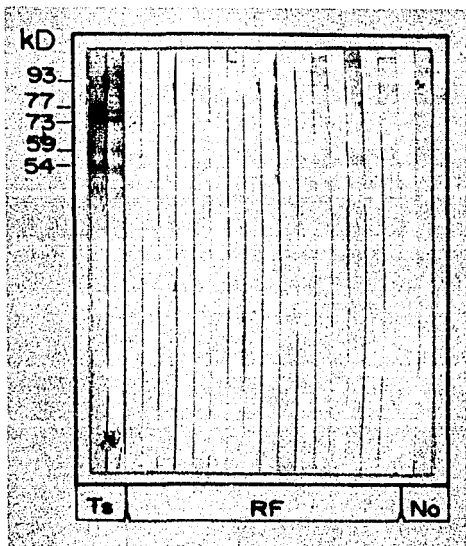


Figura 13.- Inmunoelctrotransferencia de los sueros de los pacientes positivos a la prueba de reacción febril en contra de extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*.

No= personas sanas

Ts= pacientes con triquinosis

RF= pacientes positivos a la prueba de reacción febril

10. DISCUSION

Ya que *Trichinella spiralis* puede parasitar casi a cualquier mamífero (a excepción del hamster chino *Cricetulus griseus*) (Despommier, 1977, 1983; Stewart y Larsen, 1989), se pudo montar el ciclo de vida de *T. spiralis* en rata macho de la cepa Wistar. En la figura 6 se puede observar que la cantidad de larvas recuperadas de cada nueva infección aumentaba sin importar que el número de larvas administradas fuese el mismo que en la inoculación previa. De la infección de 15,000 L₁ la carga parasitaria fué mayor a 17,000 larvas por gramo de carne, tal vez demasiada para que la rata la pudiera soportar, ya que murió antes de que se completara el enquistamiento de la larva. Para las últimas infecciones, la carga parasitaria debió ser tal, que las ratas perecieron a los 18 días post-infección; la observación microscópica del diafragma no reveló larvas, lo cual concuerda con la etapa del ciclo de vida en que se encontraban, ya que en este día las larvas recién nacidas deberfan encontrarse en el torrente sanguíneo; desafortunadamente no fué posible tomar muestra de sangre para corroborar este hecho.

Existen numerosas publicaciones y revisiones sobre la respuesta inmune hacia los estados enterales de *T. spiralis* (Ahmad y cols, 1991; Appleton y McGregor, 1985; Wakelin y Denham, 1983), en los que se ha observado la resistencia que provoca cuando se hacen inmunizaciones previas con extractos de helmintos de los estados adultos y larvarios o sus productos de excreción-secreción, además de la respuesta que tiene el hospedero para expulsar a los helmintos rápidamente, o sobre el papel que juega la

respuesta celular o humoral para evitar el establecimiento de adultos y preadultos; pero, al parecer no hay referencia en la que se aprecie o al menos se comenten resultados parecidos a los que se obtuvieron en esta serie de infecciones.

Trichinella spiralis es un parásito altamente exitoso que puede establecerse, desarrollarse y reproducirse en una amplia variedad de hospederos, lo que implica que puede adaptarse a una gran variedad de condiciones (Wakelin y Denham, 1983); por lo que no sería extraño que el parásito tendiera a adecuarse en infecciones continuas sobre un mismo tipo de hospedero. Para eso, quizá T. spiralis se ayuda de algún mecanismo de evasión o sean seleccionadas características que le confieran resistencia a la respuesta del hospedero; o, por otro lado, que el número de larvas hembras inoculadas fuera más grande en cada infección, de esa manera el número de hembras que los machos pudieran inseminar sería mayor, lo que finalmente se traduciría como un aumento en el número de descendientes por infección. De cualquier manera, el número de larvas infectivas aumentó en cada nueva infección, hasta que los hospederos no toleraron la carga parasitaria y perecieron.

Cuando se analizaron los sueros de los diferentes grupos por ELISA e IET, se encontró que no había anticuerpos de reacción cruzada en el suero de pacientes con enfermedades como brucelosis, cisticercosis, amibiasis, fiebre tifoidea, tricocefalosis y toxoplasmosis, así como el suero de los pacientes positivos a la prueba de reacción febril, bajo las condiciones empleadas.

Los sueros de los pacientes con oncocercosis, a excepción de uno, fueron negativos por ELISA. Por IET, reaccionaron heterogéneamente con bandas de alto peso molecular (70-100 Kd), pero no reconocieron las bandas que caracterizan la respuesta humoral de los pacientes con triquinelosis. Sin embargo, el suero positivo al ELISA reconoció una banda de 77 Kd (figura 9) la cual es reconocida por los pacientes con triquinelosis. Cabe mencionar que este suero dió lectura positiva cuando se probó en un ensayo inmunoenzimático para cisticercosis (Antonio Meza, comunicación personal), por lo que se sugiere que este paciente estaba multiparasitado con *Onchocerca* sp., con el cisticerco de *Taenia solium* y posiblemente con la larva infectiva de alguna otra especie del género *Trichinella*, ya que el suero provenía de una zona endémica de cisticercosis y oncocercosis en Guatemala, aunque se diagnosticó solamente para oncocercosis en el lugar de procedencia (Jim Allan, comunicación personal).

Hasta donde sabemos, son pocos los estudios acerca del estudio de reacciones cruzadas en contra de un extracto crudo de la larva infectiva de *T. spiralis*.

Despommier y colaboradores (1974), encontraron que el suero de pacientes con triquinelosis, algunos sueros de pacientes con otras parasitosis (filariasis, esquistosomiasis, equinococosis, larvas vicerales migrantes y amebiasis) y algunos de individuos aparentemente sanos, reconocían en un 90, 24 y 7% respectivamente antígenos asociados a partículas derivadas de la larva infectiva de *T. spiralis* cuando emplearon la técnica de inmunodifusión en gel de agarosa, mientras que cuando usaron contrainmunolectroforesis encontraron que el mismo porcentaje de los sueros de

Para tratar de eliminar las reacciones falso positivas por ELISA, se tomó como valor de corte el promedio de las absorbancias de los sueros de las personas sanas más tres desviaciones estándar, lo que nos hacía la prueba más estricta al considerar al 99.74% de la población (DeGroot, 1988); si hubiésemos tomado como valor de corte el promedio de las absorbancias de los sueros de las personas sanas más una o dos desviaciones estándar (0.226 y 0.316, respectivamente), se tendría aproximadamente el 25% del total de sueros como falso positivos para una desviación estándar y el 10% de falso positivos para dos desviaciones estándar. Estos sueros al ser ensayados por IET, revelarían su condición de falso positivos.

Para la IET, la presencia del patrón de bandedo característico de la respuesta humoral de los pacientes con triquinosis fué considerado como una respuesta positiva, por lo que, al no presentar dicho patrón los sueros de las personas sanas y los de las personas con otras parasitosis, se consideraron como negativos (revisado en Alcántara y Correa, enviado a publicación; Arriaga y cols, 1989, Ortega-Pierres y cols, 1989).

Por lo tanto, ya que el ELISA es un método en el que se pueden ensayar varias muestras al mismo tiempo, se podría utilizar como prueba diagnóstica de "tamizaje" y la IET se podría utilizar como prueba confirmatoria de todas aquellas muestras positivas y dudosas al ELISA; de esa manera, la combinación del ELISA y la IET serían una herramienta eficaz en el inmunodiagnóstico y en los estudios epidemiológicos de la triquinosis humana y la determinación de triquinosis porcina o en animales sinátrópicos.

pacientes con triquinelosis y únicamente el 5% de las personas con otras parasitosis y el 5% de los sueros de las personas sanas respondían a estos antígenos. Los autores supusieron que los sueros que resultaron falso positivos presentaban una proteína alterada que producía una precipitación inespecífica con el antígeno de *T. spiralis* por inmunodifusión, ya que todos los sueros positivos dieron un solo arco de precipitación común y no dieron arcos de identidad con una mezcla de suero de conejo hiperinmune. La disminución de falso positivos del mismo grupo de sueros en contraelectroforesis, podría explicarse si lo anterior estuviera sucediendo, ya que esta proteína alterada podría migrar en dirección opuesta de las inmunoglobulinas y por lo tanto no formarían un arco de precipitación mediante esta técnica.

Por otro lado, Au y colaboradores (1983) encontraron que el 94% de los pacientes con triquinelosis, el 9% de los sueros de los pacientes con otras parasitosis (clonorchiasis, ascariasis, tricomoniasis, tricocefalosis, enterobiasis, cisticercosis y uncinuriasis) y el 5% de los sueros de personas sanas, reaccionaron cruzadamente con un extracto crudo soluble de *T. spiralis* cuando se detectó IgG mediante ELISA.

Como se ha observado, el empleo de antígenos crudos puede producir reacciones cruzadas o falso positivas con el suero de personas sanas o con el suero de pacientes con diferentes parasitosis; sin embargo, en este trabajo y bajo las condiciones empleadas, no encontramos reacciones cruzadas o falso positivas por ELISA o por IET.

11. CONCLUSIONES

- No se observaron anticuerpos de reacción cruzada en el suero de pacientes con enfermedades como brucelosis, fiebre tifoidea, amibiasis, toxoplasmosis, tricocefalosis, ni en el suero positivo a la prueba de reacción febril, por ELISA e IET en las condiciones en las que se realizó este trabajo.

- Aunque los sueros de pacientes con oncocercosis reaccionaron con el extracto crudo de la larva infectiva de *T. spiralis* por IET, no reconocieron el perfil inmunológico altamente homogéneo que caracteriza a los sueros de los pacientes con triquinelosis.

- La combinación del ELISA y de la IET harían una herramienta útil para el inmunodiagnóstico de la triquinelosis utilizando la primera como prueba de "tamizaje" y la segunda como prueba confirmatoria.

12. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- AHMAD A. WANG C.H. BELL R.G. 1991. A role for IgE in intestinal immunity, expression of rapid expulsion of Trichinella spiralis in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. J. Immunol. 146 (10): 3563-3570.
- ALCANTARA P. CORREA D. The human humoral immune response against Trichinella spiralis is highly homogeneous (ENVIADO A PUBLICACION).
- ALCANTARA P. DE-LA-ROSA J.L. CORREA D. 1992. Triquinelosis: una parasitosis fuera de serie. Publicación Técnica del INDRE-SSa. #16. México. 56 pp.
- ALCANTARA P. GORODEZKY C. CORREA D. MARTINEZ M. MAGOS C. OLIVO A. 1989. Diagnosis of human trichinosis by the enzyme linked immunosorbent assay. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 31 (3): 227-230.
- APPLETON J.A. MCGREGOR D.D. 1985. Life-phase specific induction of rapid expulsion in rats suckling Trichinella spiralis-infected dams. Immunology. 55: 225-232.
- APPLETON J.A. SCHAIN L.R. MCGREGOR D.D. 1988. Rapid expulsion of Trichinella spiralis in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. Immunology. 65: 487-492.

ARRIAGA C. MUÑIZ E. MORILLA A. ORTEGA-PIERRES G. 1989.

Trichinella spiralis: recognition of a muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis.

Exp. Parasitol. 69: 363-372.

AU A.C.S. KO R.C. SIMON J.W. RIDELL N.J. WONG F.W.T. TEMPLER M.J.

1983. Study of acute trichinosis in ghurkas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to Trichinella larval antigens in diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77 (3): 412-415.

BAGHERI A. UBELAKER J.E. STEWART G.L. WOOD B. 1986. Muscle fiber selectivity of Trichinella spiralis and Trichiuella pseudospiralis.

J. Parasitol. 72: 277-282.

BARRIGA O.O. 1977. Reactivity and specificity of Trichinella spiralis fractions in cutaneous and serological test. J. Clin. Microbiol. 6 (3): 274-279.

BIAGI F. 1985. Enfermedades Parasitarias. 2a. La Prensa Médica Mexicana.

México, D. F. pp 376.

BELOSEVIC M.Y. DICK T.A. 1980. Chemical attraction in the genus Trichinella.

J. Parasitol. 66: 88-93.

CABRAL S.J. VILICAÑA F.H. FRAGOSO U.R. CONTRERAS A. 1989. Triquinosis

en Zacatecas: perfil epidemiológico 1978 a 1988. Infectología. (10): 627-636.

- CLINARD E.H. 1978. Serum fractions associated with positive and false positive reactions on the ELISA test for trichinellosis in swine. EN: Trichinellosis, proceedings of the 4th International Conference on Trichinellosis 26-28 August, 1976; Poznan, Poland. KIM C.W. PAWLOWSKY Z.S. (ed). University Press of New England. USA.
- DEGROOT M.H. 1988. Distribuciones Especiales. EN: Probabilidad y Estadística. 2a. SITESA. México, D.F. pp 231-295.
- DESPOMMIER D.D. 1977. Immunity to Trichinella spiralis.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 68-75.
- DESPOMMIER D.D. 1983. Biology. EN: Trichinella and trichinosis. CAMPBELL W.C. (ed). Plenum press. New York. pp 75-142.
- DESPOMMIER D.D. CAMPBELL W.C. BLAIR L.S. 1977. The in vivo and in vitro analysis of immunity to Trichinella spiralis in mice and rats. Parasitology. 74: 109.
- DESPOMMIER D.D. MULLER M. JENKS F. FRUITSTONE M. 1974. Immunodiagnosis of human trichinosis using counterelectrophoresis and agar gel diffusion techniques. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23: 41-44.
- DICK T.A. SILVER B.B. 1980. Intestinal distribution of Trichinella spiralis in rats. J. Parasitol. 66 (3): 472-477.
- FRAGOSO U.R. 1981. Un brote de triquinosis en Villanueva, Zacatecas. Salud Pub. Mex. 23 (1): 25-41.

- GAMBLE H.R. 1984. Application of hybridoma technology to the diagnosis of parasitic diseases. Vet. Parasit. (14): 251-261.
- IKEGAKI N. KENNETT R.H. 1989. Glutaraldehyde fixation of the primary antibody-antigen complex on nitrocellulose paper increases the overall sensitivity of immunoblot assay. J. Immunol. Methods. (24): 205-210.
- KILGORE M.W. STEWART G.L. SMATRES K.N.J. 1988. Oxygen uptaken in mice infected with Trichinella spiralis. J. Parasitol. 74: 721.
- KIM C.W. 1983. Epidemiology II: Geographic distribution and prevalence. EN: Trichinella and trichinosis. CAMPBELL W.C. (ed). Plenum Press. New York. pp 445-487.
- KOLATA G. 1985. Testing for trichinosis. Science. 227: 621-624.
- LAMOTHE A.R. GARCIA L. 1988. Helminthiasis del Hombre en México. AGT Editores. México D. F. pp 74.
- LAEMLLI U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 22 (15): 680.
- LJUNGSTROM I. HAMMARSTROM L. KOCIECKAW. SMITH C.I.E. 1988. The secuencial appearance of IgG subclasses and IgE during the course of Trichinella spiralis infection. Clin. Exp. Immunol. 75: 230.
- MARTINEZ-MARAÑON R. 1979. Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan México. Salud Publ. Mex. 21: 161-165.

- MARTINEZ-MARAÑÓN R. 1985. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ser una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo?
Salud Pub. Mex. 27 (1): 40-51.
- MARTINEZ-MARAÑÓN R. RUIZ F.M. FLORES M.O. GALLARDO H.J. LONGORIA M.A. ROJAS C.F. CORTES C.A. ESCOBAR L.M. DIAZ C. 1979. Triquinosis en Zacatecas, Zac. Estudio Epidemiológico y Clínico.
Prensa Med. Mex. (11-12): 278-287.
- MARTINEZ-PANTALEON O. VIGUERAS-RENDON A. CARVAJAL-GUTIERREZ M. FLORES-PEREZA A. ABRAHAM-JALIL A. 1986. Triquinosis.
Bol. Med. Hosp. Med. Infant. Mex. 43: 181-183.
- MAZZOTTI L. PASTRANA A. 1943. La investigación de triquinosis en tejidos musculares por el método de digestión. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. 4: 337-339.
- MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. 1991. Trichinella spiralis infection-United States, 1990. 40 (4): 57-60.
- OLSEN O.W. 1974. Animal Parasites, Their Life Cycles and Ecology. University Park Press. Baltimore. pp 507-513.
- ORTEGA-PIERRES G. MUÑIZ E. CORAL-VAZQUEZ R. PARKHOUSE R.M.E. 1989. Protection against Trichinella spiralis induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitol. Res. 75: 563.

- PARKHOUSE R.M.E. ORTEGA-PIERRES G. 1984. Stage-specific antigens of Trichinella spiralis. Parasitology. 88: 623.
- PARKHOUSE R.M.E. PHILIPP M. OGILVIE B.M. 1981. Characterization of surface antigens of Trichinella spiralis infective larvae. Parasite Immunol. 3: 339-352.
- PAWLOWSKI Z.S. 1983. Clinical Aspects in Man. EN: Trichinella and trichinellosis. CAMPBELL W.C. (ed). Plenum Press. NEW YORK. pp 367.
- PEDRAZA S.S. 1988. Procesamiento de antígenos de Mycobacterium tuberculosis en macrófagos. Tesis BIOLOGO. ENEP-Zaragoza, UNAM. México, D. F. 70 pp.
- PHILIPP M. PARKHOUSE R.M.E. OGILVIE B.M. 1980. Biochemical characterization of stage-specific antigenic proteins on the surface of Trichinella spiralis EN: The host invader interplay. VRANDEN-BOSSCHE H. (ed). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp 147.
- POZIO E. LA ROSA G. ROSSI P. FICO R. 1989. Survival of Trichinella muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. J. Parasitology. 75: 472-473.
- QUIROZ R.H. LANDEROS R.R. 1988. Valoracion del tiempo de sobrevivencia de larvas de Trichinella spiralis en chorizo de cerdo. Rev. Mex. Parasitol. 1 (1): 22-24.
- SARTI G.E.J. GUTIERREZ O.I. KOOPMAN J.S. 1986. Brote de triquinosis ocurrido en una oficina de gobierno, México, D.F. 1985. Salud Pub. Mex. 28 (1): 41-47.
- SILBERSTEIN D.S. 1983. Antigens. EN: Trichinella and trichinosis. CAMPBELL W.C.(ed). Plenum press. New York. pp 309.

- STEWART G.L. GIANNINI S.H. 1982. Sarcocystis, Trypanosoma, Toxoplasma, Brugia, Ancylostoma and Trichinella spp.: A review of intracellular parasites of striated muscle. Exp. Parasitol. 53: 406-447.
- STEWART G.L. LARSEN E. 1989. Infection of the chinese hamster with Trichinella pseudospiralis. J. Parasitol. 75: 1006.
- THORNBURY F.J. 1897. The pathology of trichinosis: original observations. Univ. Med. Mag. 10: 64-79.
- TOWBIN H.T. STAEGELIN T. GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76 (1): 4350-4354.
- WAKELIN D. DENHAM D. 1983. The immune response. EN: Trichinella and trichinosis. CAMPBELL W.C. (ed). Plenum Press. New York. pp 265.
- WAKELIN D. WILSON MM. 1980. Immunity to Trichinella spiralis in irradiate mice. I. J. Parasitol. 10: 37.
- WEINER L.M. PRICE S. 1956. A study of antigenic relationships between Trichinella spiralis and Salmonella thypi. J. Immunol. 77: 111-114.
- ZARLENGA D.S. GAMBLE H.R. 1990. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53 kD excretory-secretory antigen from Trichinella spiralis muscular larvae. Mol. Bioch. Parasitol. 41: 165-174.

ZIMMERMANN W.J. 1983. Control II: Surveillance in swine and other animals by muscle examination. EN: Trichinella and trichinosis. CAMPBELL W.C. (ed). Plenum Press. New York. pp 515-528.